

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention
du grade de

**DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ
de STRASBOURG**

Par

Jérôme KLEIN

Développement d'une nouvelle famille d'amphiphiles fluorés pour la
délivrance d'agents thérapeutiques.

Présentée en février 2009 devant la commission d'examen :

Professeur	M. Goeldner	Rapporteur interne
Docteur	E. Magnier	Rapporteur externe
Docteur	P. Vierling	Rapporteur externe
Docteur	L. Lebeau	Directeur de thèse

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention
du grade de

**DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ
de STRASBOURG**

Par

Jérôme KLEIN

Développement d'une nouvelle famille d'amphiphiles fluorés pour la
délivrance d'agents thérapeutiques.

Présentée en février 2009 devant la commission d'examen :

Professeur	M. Goeldner	Rapporteur interne
Docteur	E. Magnier	Rapporteur externe
Docteur	P. Vierling	Rapporteur externe
Docteur	L. Lebeau	Directeur de thèse

« Nous nous prenons pour les architectes de la matière mais nous n'en sommes souvent
que les maçons »

S. Mons

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, sous la Direction du Dr Luc Lebeau. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir formé à la recherche.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le Laboratoire de Biovectorologie, dirigé par le Dr Benoit Frisch, et le Laboratoire Administration, Vectorisation, Physico-Chimie du Généthon à Évry, dirigé par le Dr Antoine Kichler.

J'exprime ma gratitude à la région Alsace et le CNRS pour leur soutien financier.

Je remercie Mia Ciobanu et Valérie Machi pour avoir effectué les tests biologiques.

Je tiens également à remercier Thierry Vandamme pour nous avoir permis d'accéder à son appareil de Langmuir.

Je remercie tous ceux qui ont collaboré à ce travail, en particulier Franck Camerel, pour sa gentillesse, son enthousiasme et pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer afin de combler mes lacunes en physique. Il nous a permis d'accéder à différents appareils comme la DSC, un microscope à lumière polarisée et permis d'obtenir des clichés de diffraction de rayon X.

Je remercie Emmanuel Klein qui a travaillé sur ce sujet en y apportant tout son savoir-faire et un dévouement sans faille au laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma plus profonde reconnaissance pour m'avoir supporté pendant plus de deux ans. Je garderai un très bon souvenir des discussions interminables que nous avons eu tant du point de vue scientifique que totalement imbécile.

Je remercie également Stéphane Mons pour avoir répondu à mes questions après le départ de Manu.

Je remercie Guy Zuber pour sa patience, son professionnalisme et pour le temps qu'il a pu m'accorder pour l'écriture de la partie transfection.

Je remercie également tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces trois ans de thèse : Gaëlle Creusat, Thomas Spangenberg, Étienne Airiau, Émilie Verguet, Mathieu Bui, Nicolas Girard, Pascale Buisine, Jean-Sébastien Thomann, Steve Tisserand. Ainsi que toute ma famille pour son soutien inconditionnel.

Pour terminer, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes que je n'ai pas citées nommément.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATION ET SYMBOLES	1
INTRODUCTION GENERALE	5

CHAPITRE 1

LES VECTEURS LIPIDIQUES.....	9
1 INTRODUCTION.....	11
2 LES LIPOSOMES.....	15
2.1 Structure des liposomes	15
2.1.1 <i>Les différents types de liposomes</i>	15
2.1.2 <i>Propriétés physicochimiques des liposomes</i>	16
2.1.3 <i>Les liposomes furtifs</i>	18
2.2 <i>Le ciblage</i>	18
2.3 Applications biomédicales	19
2.3.1 <i>Vectorisation de principes actifs</i>	20
2.3.2 <i>Système de délivrance pour la vaccination</i>	22
2.3.3 <i>Système de délivrance d'acides nucléiques</i>	23
3 LES LIPOPLEXES	23
3.1 Définition.....	23
3.2 La thérapie génique.....	23
3.3 Les obstacles au transfert de gène.....	26
3.4 Les vecteurs utilisés	27
3.4.1 <i>Les vecteurs viraux</i>	27
3.4.2 <i>Les vecteurs non viraux</i>	29
3.5 Vers une utilisation <i>in vivo</i>	35

CHAPITRE 2

LE FLUOR ET LES LIPIDES FLUORES	37
1 LE FLUOR GENERALITE	39
2 LES COMPOSES LIPIDIQUES FLUORES.....	39
2.1 Les perfluoroalcanes	39
2.2 Les hydrocarbures hémifluorés.....	41
2.3 Les surfactants fluorés.....	41
2.4 Biocompatibilité-Toxicité	42
3 LES AUTO-ASSEMBLAGES LIPIDIQUES FLUORES	43
3.1 Les phospholipides hémifluorés.....	43
3.2 Les membranes hémifluorées	44
3.2.1 <i>Structure des membranes hémifluorées</i>	44
3.2.2 <i>Les propriétés relatives aux membranes fluorées</i>	45
3.2.3 <i>Les liposomes hémifluorés</i>	46
3.3 Les lipoplexes hémifluorés	48
4 CONCLUSION	50

CHAPITRE 3

CONCEPTION DE PHOSPHOLIPIDES FLUORES POUR	
L'ENCAPSULATION DE PRINCIPES ACTIFS.....	
	51
1	INTRODUCTION.....
	53
2	DEVELOPPEMENT DE VECTEURS LIPOSOMIAUX FLUORES.....
	53
2.1	Contexte et objectifs.....
	53
2.2	Conceptions de nouveaux amphiphiles fluorés.....
	55
2.2.1	<i>Phospholipides linéaires</i>
	55
2.2.2	<i>Phospholipides Ramifiés</i>
	58
2.3	Propriétés physicochimiques.....
	59
2.3.1	<i>Comportement en monocouches</i>
	59
2.3.2	<i>Analyse en DSC (calorimétrie différentielle à balayage)</i>
	65
2.3.3	<i>Microscopie en lumière polarisée</i>
	74
2.3.4	<i>Diffraction de rayons X</i>
	76
2.3.5	<i>Conclusion</i>
	87
2.4	Fabrication de liposomes et propriétés.....
	89
2.4.1	<i>Mise en place d'un protocole</i>
	89
2.4.2	<i>Formulation de liposomes à partir de phosphatidylcholines pures</i> ..
	91
2.4.3	<i>Formulation de liposomes à partir de mélanges PC/PG</i>
	93
2.4.4	<i>Les composés ramifiés</i>
	96
2.5	Conclusion.....
	96

CHAPITRE 4

CONCEPTION DE LIPIDES CATIONIQUES FLUORES POUR LE	
TRANSFERT DE GENES.....	
	98
1	CONCEPTION DES LIPIDES CATIONIQUES FLUORES.....
	101
1.1	Contexte et objectifs.....
	101
1.2	Lipides monocationiques.....
	101
1.3	Lipides polycationiques.....
	103
1.4	Adjuvant lipidique (« helper lipid »).....
	104
2	FABRICATION ET PROPRIETES DES LIPOPLEXES FLUORES.....
	105
2.1	Lipides monocationiques.....
	105
2.1.1	<i>Propriétés physicochimiques des complexes</i>
	105
2.1.2	<i>Propriétés en transfert de gène</i>
	111
2.2	Les composés polycationiques.....
	118
2.2.1	<i>Propriétés physicochimique des complexes</i>
	118
2.2.2	<i>Propriétés en transfert de gène</i>
	121
2.3	Conclusion.....
	123

CHAPITRE 5

SYNTHÈSE DES LIPIDES FLUORES	125
1 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	127
1.1 Phosphates et esters phosphoriques	127
1.1.1 Généralités	127
1.1.2 Protection des phosphates	127
1.2 Phosphatidylcholines	130
1.3 Phosphatidyléthanolamines	131
1.4 Composés hémifluorés	132
1.4.1 Fluoroalkylation d'alcènes	132
1.4.2 Acides gras hémifluorés	134
2 SYNTHÈSE DES PHOSPHOLIPIDES FLUORES	136
2.1 Synthèse des acides gras hémifluorés	136
2.1.1 Acides gras hémifluorés linéaires	137
2.1.2 Acide gras linéaire 2,2,3,3-tétrahydroperfluoré	139
2.1.3 Acides gras hémifluorés ramifiés	139
2.1.4 Acide gras hémifluoré insaturé	140
2.2 Synthèse des précurseurs des têtes polaires	141
2.3 Synthèse des phosphatidylcholines	146
2.3.1 À partir de phosphates de bromoéthyle	146
2.3.2 À partir de la glycérophosphocholine	148
2.3.3 Phosphocholine monocaténaire 20	149
2.3.4 Phosphocholine 14	150
2.4 Synthèse des phosphatidylglycérols	151
2.4.1 Phosphatidylglycérols à chaînes linéaires	151
2.4.2 Phosphatidylglycérol 15	151
2.4.3 Phosphatidylglycérols ramifiés	152
2.4.4 Synthèse de l'analogue de dioléoylphosphatidyléthanolamine	152
3 SYNTHÈSE DES LIPIDES CATIONIQUES FLUORES	153
3.1 Lipides monocationiques	153
3.2 Lipides polycationiques	155
4 CONCLUSION	156

CONCLUSION GÉNÉRALE	159
---------------------------	-----

PARTIE EXPÉRIMENTALE	165
----------------------------	-----

1. PARTIE EXPÉRIMENTALE DE CHIMIE	167
1.1 Solvants et réactifs	167
1.2 Matériel et méthodes	167
1.2.1 Chromatographie	167
1.2.2 Spectroscopie Infrarouge	168
1.2.3 Résonance magnétique nucléaire	168
1.3 Mode Opérateur et analyses	170

2	TESTS PHYSIQUES	254
2.1	Préparation des échantillons pour les études en monocouche.....	254
2.2	Préparation des échantillons pour les études en DSC.....	255
2.3	Préparation des échantillons pour observation en microscopie à lumière polarisée.....	255
2.4	Préparation des échantillons pour les études par diffraction de rayons X	255
2.5	Microscopie électronique	255
3	TESTS BIOLOGIQUES	256
3.1	Liposomes	256
3.1.1	<i>Formulation de liposomes.....</i>	256
3.1.2	<i>Dosage de la carboxyfluoresceine.....</i>	256
3.2	Lipoplexes	257
3.2.1	<i>Préparation des complexes</i>	257
3.2.2	<i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	257
3.2.3	<i>Mesure de tailles.</i>	257
3.2.4	<i>Détermination du potentiel zêta.</i>	258
3.2.5	<i>Culture cellulaire.....</i>	256
3.2.6	<i>Transfection classique.....</i>	259
3.2.7	<i>Analyse de la luciférase.....</i>	257
3.2.8	<i>Tests MTT.</i>	259
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	261

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Å	Angström
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	"Acide désoxyribonucléique
BnBr	Bromure de benzyle
nBuLi	nButyl lithium
Bz	Groupement protecteur benzoyle ester
BzCl	Chlorure de Benzoyle
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyl
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(diméthylamino) phosphonium
CBr ₄	Tétrabromure de carbone
CCM	Chromatographie sur couche mince
Chol	Cholestérol
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
cpm	Coups par minute
Cq	Carbone quaternaire
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DDC	Cellules dendritiques dermales
DIBAL	hydrure de Diisobutylaluminium
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	4,4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
Et ₂ O	Ether
Et ₃ N	Triéthylamine
HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonate
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
Hz	Hertz
IR	Infra-rouge
li.v.	Intra-veineuse
kDa	Kilodalton
KI	Iodure de potassium
λ	Longueur d'onde
LUV	"Large unilamellar vesicle"
MeOH (D)	Méthanol (méthanol deutéré <i>d-4</i>)
MHz	Mégahertz
MLV	"Multilamellar vesicle"
PBS	"Phosphate buffered saline"
PC	L-α-Phosphatidylcholine de jaune d'œuf
PCl ₅	Pentachlorure de phosphore
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylèneglycol
PG	L-α-Phosphatidyl-DL-glycérol de jaune d'œuf
ph	Groupement phényl
PM	Poids moléculaire
PPh ₃	Triphényl phosphine
ppm	Partie par million
p/v	Poids par volume
Rdt	Rendement
Rf	Rétention frontale
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SUV	"Small unilamellar vesicle"
SVFd	Sérum de veau fœtal décomplémenté
t.a.	Température ambiante
tBu	<i>Tert</i> -butyl
TEA	Triéthylamine

TFA	Acide trifluoroacétique
Tf ₂ O	Anhydride triflique
TfOH	acide triflique (acide trifluorométhane sulfonique)
THF	Tétrahydrofurane
TMSOTf	Triméthylsilyl trifluorométhane sulfonate
TrCl	Chlorure de trityle
pTsOH	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
vs.	Versus
v/v	Volume à volume

Introduction générale

Introduction générale

L'efficacité d'un médicament est essentiellement conditionnée par les propriétés physicochimiques du principe actif, des excipients qui lui sont associés et de la forme galénique utilisée. Le choix de cette forme galénique (comprimé, solution, pommade...) découle de celui de la voie d'administration préconisée (non invasive ou parentérale).

Compte tenu de la spécificité croissante des agents thérapeutiques et de l'impact grandissant des produits issus des biotechnologies, une part importante de la recherche en pharmacie galénique s'est portée sur la vectorisation (libération spécifique) des principes actifs et ce, principalement par voie non invasive. La vectorisation est une opération visant à maîtriser la distribution du principe actif dans l'organisme en l'associant à un vecteur spécifique. Cette distribution doit être aussi indépendante que possible des propriétés du principe actif et découler des propriétés physicochimiques du vecteur.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit se place dans le contexte de l'élaboration de nouveaux vecteurs lipidiques permettant de vectoriser des agents actifs. Il concerne plus précisément l'élaboration de vecteurs localement fluorés qui, compte tenu d'une utilisation originale des propriétés du fluor, devraient présenter des propriétés d'usage également originales.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous présenterons un certain nombre de rappels bibliographiques concernant les vecteurs lipidiques. Les lipides amphiphiles sont une famille de molécules possédant un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile. Ces molécules possèdent des capacités d'auto-assemblages particulières pouvant donner lieu à différents types d'organisations. Nous les passerons en revue et les détaillerons en fonction de la géométrie des lipides, puis nous nous focaliserons sur deux types d'auto-assemblages lipidiques particuliers : les liposomes et les lipoplexes.

Dans le second chapitre, nous présenterons les propriétés particulières du fluor, des composés perfluorés ou localement perfluorés, et des assemblages supramoléculaires qui peuvent en résulter. Nous mentionnerons également différentes applications qui peuvent en découler.

Dans le troisième chapitre, nous exposerons nos hypothèses de travail et présenterons les travaux réalisés pour la mise au point de systèmes lipidiques fluorés destinés à l'encapsulation de principes actifs « conventionnels » (petites molécules, peptides ou protéines). Nous présenterons les résultats obtenus sur la préparation de liposomes et leur caractérisation. Le chapitre suivant sera, quant à lui, dédié à la description des efforts que nous avons développés pour concevoir des lipides cationiques fluorés spécifiquement destinés à des applications en transfert de gènes. Nous exposerons et discuterons les résultats obtenus en transfert de gènes.

Le cinquième chapitre sera dévolu à la présentation des stratégies synthétiques mises en œuvre pour accéder aux différents composés fluorés dont les propriétés sont présentées

dans les deux chapitres précédents. Après quelques rappels bibliographiques sur la synthèse des fluoroalcanes, nous détaillerons les démarches que nous avons suivies pour atteindre nos différentes cibles.

Les cinq précédents chapitres feront l'objet d'une conclusion générale dans laquelle seront retracés les moments forts de notre travail et dégagés les résultats les plus importants. Cette conclusion s'achèvera sur la présentation des perspectives ouvertes par le travail réalisé.

La deuxième partie de ce manuscrit est dédiée à la description des protocoles expérimentaux utilisés tout au long du travail réalisé et à la description analytique de chaque composé préparé.

Le manuscrit s'achève sur la liste des références bibliographiques mentionnées tout au long du mémoire.

Chapitre 1

Les vecteurs lipidiques

1 Introduction

Les lipides naturels ont une fonction énergétique fondamentale, notamment par l'intermédiaire des triglycérides. Ils jouent également un grand rôle dans le maintien de l'intégrité des structures cellulaires : les membranes biologiques qui compartimentent les différentes parties de la cellule sont ainsi constituées d'une bicouche lipidique à laquelle sont associées, de façon plus ou moins étroite, de nombreuses protéines aux fonctions très diverses. Les lipides biologiques sont en général des molécules amphiphiles, c'est-à-dire constituées d'une partie polaire (hydrophile) et d'une partie apolaire (hydrophobe). Il en résulte une tendance de ces molécules à s'accumuler aux interfaces et à s'auto-associer en solution. Ces composés présentent donc des propriétés tensio-actives et ils peuvent d'ailleurs intervenir dans la stabilisation d'émulsions alimentaires ou médicales. Les lipides les plus répandus au niveau des membranes biologiques sont les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

Les glycérophospholipides sont construits à partir de glycérol dont deux fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras qui confèrent ses propriétés d'hydrophobie à la molécule. La troisième fonction alcool permet l'ancrage de la « tête polaire » du lipide qui est le plus souvent un groupe porteur d'une ou plusieurs charges électrostatiques. Il s'agit généralement d'un phosphate qui peut porter différents groupements (Figure 1.1).

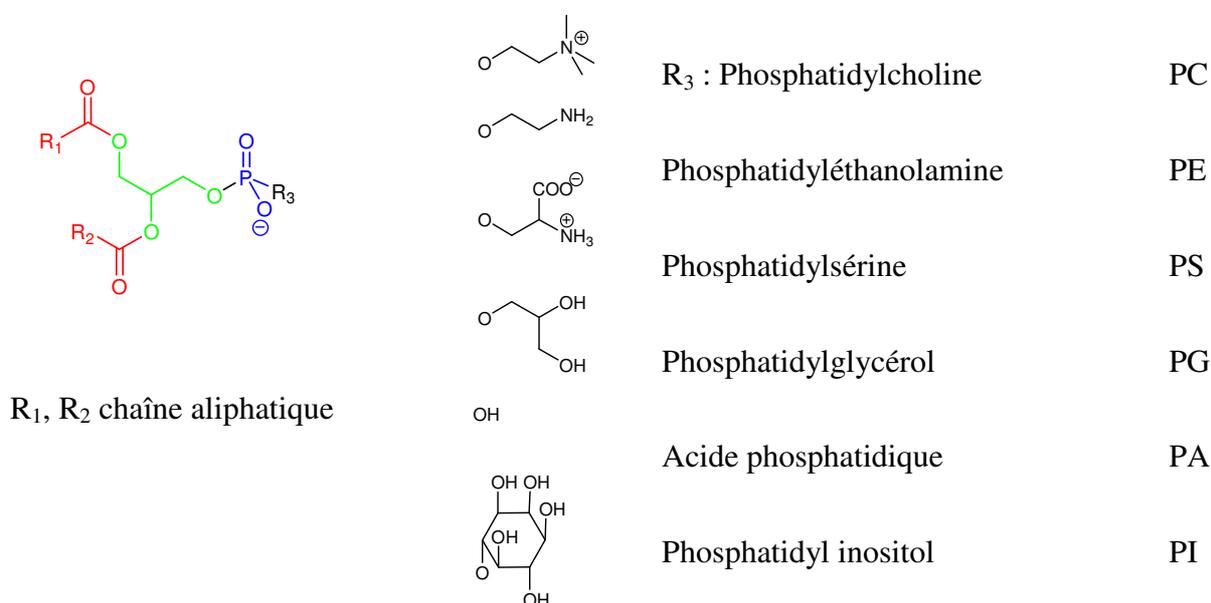


Figure 1.1. Structure des différents phospholipides naturels. Les couleurs représentent respectivement en vert le glycérol, charpente de la molécule, en rouge les acides gras responsables des propriétés hydrophobes de la molécule et en bleue l'ion phosphate qui sert d'accrochage à la partie hydrophile.

Les acides gras naturels sont constitués d'un nombre pair d'atomes de carbone. Ils peuvent comporter de 0 à 3 doubles liaisons ce qui permet de les séparer en deux classes : les acides gras saturés et les insaturés. Les insaturations influent sur les propriétés des acides ainsi que sur celles des phospholipides qui les incorporent. Les acides gras insaturés sont plus facilement oxydés que les saturés et les membranes qui en sont composées voient leurs propriétés de fluidité améliorées.

Les sphingolipides (SPL) sont des molécules ubiquitaires présentes chez les eucaryotes et certaines bactéries.¹ Ils ont une base commune, la sphingosine (Figure 1.2). Lorsque la sphingosine est liée à un acide gras par une liaison amide, on obtient une sphingosine N-acylée, communément appelée céramide. L'acide gras constitutif du céramide est une chaîne carbonée, généralement saturée, comprenant de 14 à 26 atomes de carbone. Les deux chaînes carbonées (sphingosine et acide gras) forment la queue apolaire des SPL, leur tête polaire étant un sucre ou un groupement phosphate lié à un alcool. En fonction de la nature de leur tête polaire, le groupe des SPL se divise en deux sous-groupes : les glycosphingolipides et les sphingophospholipides.²

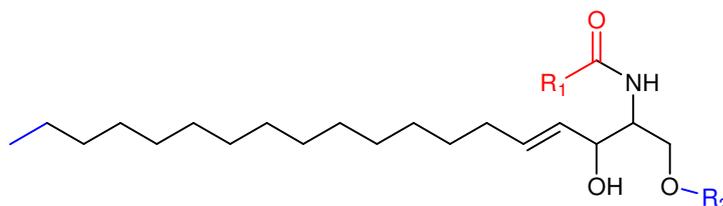


Figure 1.2. Structure de sphingolipides. Le squelette sphingosine est représenté en noir. Ce lipide est constitué d'une chaîne à 18 atomes de carbones. Celle-ci porte deux groupements OH en position 1 et 3, un groupement NH₂ en position 2 et une insaturation en position 4. L'ancrage d'un acide gras, en rouge, *via* une liaison amide donne naissance à un céramide. Si une tête polaire (R₂ en bleu) se lie au céramide par le groupement OH en position 1, on obtient un glycosphingolipide ou un sphingophospholipide.

Enfin, les stérols sont des lipides comportant un noyau tétracyclique. Le chef de file de cette famille est le cholestérol (Figure 1.3). Ils sont spécifiques des eucaryotes, où ils sont présents principalement dans la paroi extérieure de la membrane plasmique. Les stérols constituent des tampons de fluidité : de même que certains acides faibles constituent des tampons de pH, ils permettent de conserver des propriétés de fluidité de la membrane à peu près constantes et ce, dans une gamme de température large.

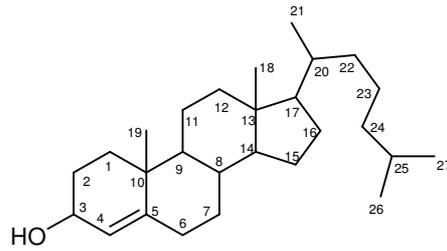


Figure 1.3. Structure du cholestérol.

Le cholestérol contient 4 cycles, qui constituent le noyau stérol, et une longue queue aliphatique. Ce composé présente aussi un groupement hydroxyle en position 3 qui permet une fonctionnalisation par différents motifs.

De manière générale, les composés amphiphiles présentent tous des propriétés d'auto-assemblage. La forme (sphères, tubes, lamelles...) et les propriétés des édifices supramoléculaires qui résultent de l'association de ces molécules entre-elles, dépendent de la géométrie de ces dernières. Par exemple, des lipides bicaténaires comme la lécithine forment des vésicules, tandis que la lysolécithine (qui n'a qu'une chaîne) forme plutôt des micelles allongées à corps cylindrique.³ La structure de l'agrégat peut être prédite empiriquement à partir d'un nombre sans dimension appelé paramètre d'empilement P . Purement géométrique, ce paramètre est construit en combinant l'aire (optimale) par tête polaire a_0 de la molécule (à l'interface eau-huile), le volume V et la longueur l_c de la chaîne aliphatique (Figure 1.4).

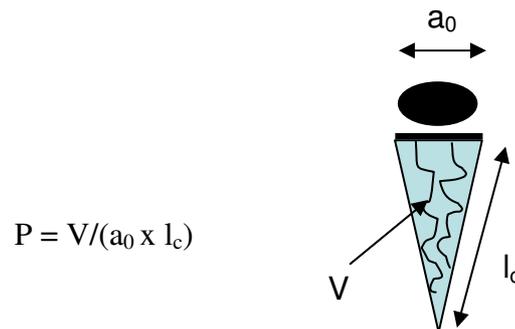


Figure 1.4. Représentation schématique d'une molécule amphiphile et calcul du paramètre d'empilement P .

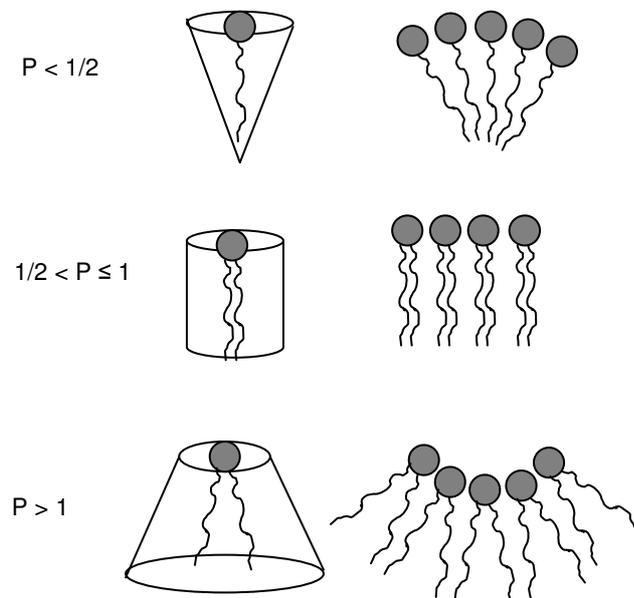


Figure 1.5. Représentation schématique des différentes phases obtenues suivant la valeur du paramètre d'empilement P .⁴

Ainsi pour $P < 1/2$, un assemblage de monomères va former une courbe positive et ainsi conduire à des micelles cylindriques ou sphériques, ou à une phase hexagonale H_1 . Pour $1/2 < P \leq 1$, la courbe engendrée par l'auto-assemblage des amphiphiles est quasi nulle et conduit à la formation d'une phase lamellaire. Enfin, pour $P > 1$, les monomères s'assemblent sur une surface présentant une courbure négative et forment des micelles inverses ou une phase hexagonale inverse H_2 .

Les phospholipides, de par la diversité de leurs structures, peuvent conduire à différents types d'organisation en phase aqueuse. Les formes « lyso » ne contenant qu'une chaîne grasse forment préférentiellement des micelles, alors que les structures bicaténaires de type phosphatidylcholine ou sphingomyéline s'arrangent plutôt en bicouches se refermant sur elles-mêmes (liposomes). D'autres structures bicaténaires, comme la phosphatidyléthanolamine, forment des phases lamellaires en présence de calcium.⁵ Les différents assemblages possibles de ces lipides sont utilisés dans de très larges gammes d'applications. Parmi celles-ci, nous allons essentiellement nous intéresser à celles qui visent à modifier le transport et la distribution d'un principe actif, quel qu'il soit. Plus précisément, nous allons nous intéresser aux assemblages lipidiques destinés à vectoriser :

- des principes actifs « classiques » (petites molécules, peptides ou protéines) par le biais de leur capacité à s'auto-assembler sous forme de liposomes.

- de l'ADN *via* la présentation de têtes polaires cationiques capables de complexer et condenser cet oligomère anionique au sein de particules appelées lipoplexes.

2 Les liposomes

2.1 Structure des liposomes

Les liposomes ont été décrits initialement par Bangham et Horne,⁶ suite à des travaux de microscopie électronique effectués sur une suspension de phospholipides d'origine cellulaire. Ces vésicules lipidiques artificielles, ou liposomes, dont la membrane est constituée d'une ou de plusieurs bicouches de lipides résultent de l'auto-assemblage spontané des molécules amphiphiles dans un excès de solution aqueuse (Figure 1.6).

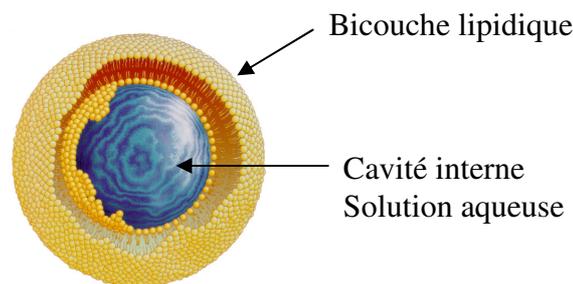


Figure 1.6. Schéma d'assemblage d'un liposome.

Les liposomes peuvent être préparés à partir de toute une variété de lipides d'origine naturelle ou synthétique, ou encore à partir d'un mélange de ces lipides. Ils sont utilisés en cosmétologie et en pharmacologie pour transporter des principes actifs jusqu'à leurs cibles.

2.1.1 Les différents types de liposomes

Les liposomes se différencient en premier lieu par leur composition chimique. Les propriétés telles que la perméabilité de la membrane, sa charge de surface et sa fluidité dépendront des molécules lipidiques qui la constituent.

La taille du liposome va, en grande partie, dépendre de la technique utilisée pour sa fabrication. Le diamètre peut varier entre quelques dizaines de nanomètres et quelques dizaines de microns.

On peut séparer les liposomes en trois catégories :

- -les SUV (Small Uni-lamellar Vesicles) présentent un diamètre aux alentours de 100 nm. Ce sont les plus petites structures vésiculaires qui peuvent être obtenues.
- -les LUV (Large Uni-lamellar Vesicles) présentent un diamètre compris entre 200 et 800 nm.
-  -les MLV (Multi-lamellar Large Vesicles) présentent un diamètre allant de 0.8 μm à 5 μm . Ils sont constitués de bicouches lipidiques superposées, concentriques. La coupe transversale de cette structure ressemble à celle d'un oignon.

Différentes méthodes peuvent être employées pour la préparation de liposomes. La plus classique consiste à ajouter une solution aqueuse tamponnée à un film lipidique sec recouvrant les parois d'un tube en verre, suivi d'une agitation vigoureuse. Cette technique, la plus simple, conduit à la formation d'une suspension de liposomes multi-lamellaires (MLV) caractérisés par une grande hétérogénéité de taille. Cependant, beaucoup d'applications nécessitent l'obtention de petits liposomes, ou des liposomes de taille bien définie. D'autres techniques, plus sophistiquées, doivent alors être utilisées.

La majorité des techniques de préparation des liposomes ont comme point de départ la formation de MLV comme décrit précédemment. Afin de réduire le diamètre de ces vésicules, la suspension obtenue peut être soumise à des ultra-sons. Une population homogène de petits liposomes uni-lamellaires (SUV) est alors obtenue. Une préparation de SUV peut également être obtenue par extrusion des MLV à travers plusieurs filtres de polycarbonate, de porosité décroissante et bien contrôlée. En règle générale, les SUV obtenus par ces différents procédés ont une taille comprise entre 25 et 100 nm.

Les liposomes peuvent être conservés soit par congélation, soit par lyophilisation en présence d'agent cryoprotecteurs comme des sucres (tréhalose, sorbitol, glucose, maltose) ou du glycérol. Selon l'application visée, il est néanmoins nécessaire de veiller à ce que le matériel éventuellement encapsulé ne s'échappe pas des vésicules lors de la décongélation ou réhydratation.

2.1.2 Propriétés physicochimiques des liposomes

L'état physique de la bicouche lipidique influe de manière importante sur les propriétés des liposomes. Les vésicules composées uniquement de phospholipides, maintenues à une température inférieure à la température de transition de phase principale de ces phospholipides (T_c), sont considérées comme « solides » (état « gel », dans lequel les

chaînes acyles ont un aspect rigide) (Figure 1.7). À l'inverse, si la température du milieu ambiant est supérieure à T_c , ces liposomes sont considérés « fluides » (état cristal liquide dans lequel les chaînes acyles ont une certaine liberté de mouvement).

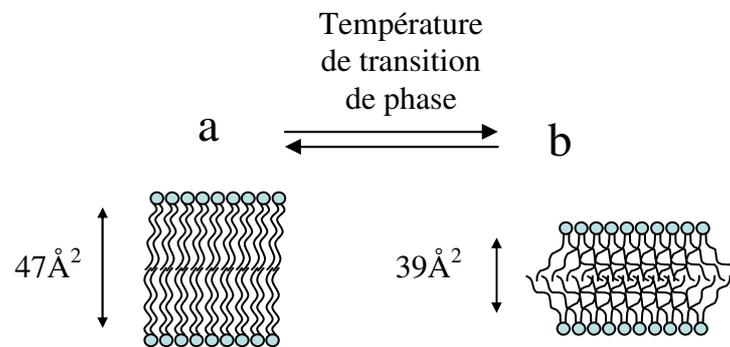


Figure 1.7. Représentation schématique de la structure des deux états d'une bicouche de phospholipides. a : Phase gel (solide). b : Phase cristal liquide (fluide).⁷

Cette température de transition de phase principale est fonction de la longueur des chaînes acyles. Ainsi, pour un phospholipide présentant les deux mêmes chaînes acyles, plus ces chaînes grasses seront longues, plus la valeur de T_c sera élevée. La présence d'insaturation, ainsi que de chaînes ramifiées ou incorporant des cycles (cyclopropane par exemple), induit une baisse considérable de T_c . D'autres facteurs, intrinsèques, tels que la polarité des lipides, ou extrinsèques, tels que l'adsorption d'ions ou de protéines, peuvent aussi provoquer une modification de la valeur de T_c .⁸

La connaissance préalable de la température de transition de phase d'un lipide permet de faciliter sa formulation en liposomes. En effet, il convient d'hydrater le lipide préalablement avec une solution aqueuse à une température supérieure à T_c . Ainsi les lipides peuvent se dissocier-associer plus facilement entre-eux et présentent une meilleure capacité à s'auto-assembler au sein de vésicules. La perméabilité d'un liposome à un soluté encapsulé est relativement faible lorsque la température est inférieure à T_c . Par contre, lorsque l'on s'approche de cette température ou qu'on la dépasse, la membrane des liposomes devient très perméable aux ions.⁹

Le cholestérol joue un rôle fondamental dans la stabilité des liposomes. C'est un composé important des membranes biologiques des cellules eucaryotes. Il a ainsi été démontré que l'introduction de ce composé au sein de membranes constituées de phospholipides à chaînes courtes (jusqu'à C_{16}) entraîne une augmentation de l'épaisseur de la bicouche alors qu'on observe l'effet inverse lorsque les chaînes sont plus longues (à partir de C_{18}).¹⁰ En dessous de la température de transition de phase d'un lipide (état solide), le cholestérol a un effet faiblement fluidifiant de la bicouche alors que, au dessus de cette température (état fluide), il provoque l'effet inverse et diminue la fluidité.¹¹ De plus, le cholestérol réduit la facilité qu'ont certaines protéines à pénétrer dans la bicouche lipidique. Il

confère donc aux liposomes une augmentation de leur stabilité *in vitro* (en présence de plasma, par exemple) et *in vivo* (après injection par voie intraveineuse, par exemple).^{12,13}

2.1.3 Les liposomes furtifs

Le problème de la stabilité des liposomes en milieu biologique vient d'être évoqué et constitue souvent un frein à l'utilisation de ces derniers dans des applications touchant à la biologie. Différentes stratégies ont été développées pour augmenter la stabilité –*i.e.* la durée de circulation– d'un liposome dans l'organisme. L'une de ces méthodes consiste à recouvrir le liposome d'une couche inerte, par exemple à l'aide d'un polymère biocompatible tel que le polyéthylène glycol (PEG). On dispose ainsi une couche protectrice autour du liposome qui diminue les interactions avec les protéines circulantes et donc retarde les phénomènes de reconnaissance de la particule liposomiale par les opsonines qui induisent naturellement leur élimination.^{14,15} Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des liposomes dans le sang passe ainsi de 30 minutes, pour une formulation à base de phosphatidylcholine et de cholestérol, à 5 h pour une même formulation sur laquelle on a greffé des molécules de PEG. Une relativement faible quantité de polymère flexible greffé à la surface du liposome suffit à former une couche protectrice et rendre le liposome « furtif ». ¹⁶ Depuis leur découverte, les liposomes furtifs ont été étudiés en détails et utilisés à de nombreuses fins médicales.¹⁷ Même si le polyéthylène glycol est le polymère le plus utilisé pour formuler des liposomes furtifs, il en existe d'autres possédant des caractéristiques similaires (poly-*N*-vinylpyrrolidones,¹⁸ alcool polyvinylique¹⁹).

Malgré les propriétés très utiles des liposomes pégylés qui ont été, dans un premier temps, décrits comme inertes et non toxiques, il faut mentionner des travaux récents qui tendent à montrer qu'ils induisent des réactions en activant le système du complément.²⁰

2.2 Le ciblage

Une des particularités très intéressante des liposomes est leur capacité à cibler certaines cellules. En effet, nous avons vu plus haut que, de manière passive, les liposomes vont être phagocytés par les macrophages. Ce phénomène peut être mis à profit, par exemple, dans le cadre d'applications en vaccination.

Il existe un autre type de ciblage, également passif, concernant des tumeurs solides à croissance rapide. Il a été constaté que des grosses molécules peuvent s'accumuler de façon passive dans les tumeurs. On parle d'effet EPR (enhanced permeability and retention)²¹. En effet, une tumeur solide est souvent le siège d'une angiogenèse importante, les nouveaux vaisseaux croissent de façon anarchique et sont très perméables afin d'alimenter les cellules en croissance. Cette perméabilité accrue ne permet pas cependant le passage des molécules les plus grosses et des particules. Il en résulte une rétention d'origine purement mécanique qui peut effectivement être mise à profit avec des liposomes.

Enfin, un des aspects les plus prometteurs du ciblage est sans doute le ciblage actif. Certaines cellules peuvent présenter une expression sélective ou une surexpression de certaines protéines à la surface de leur membrane. En fixant un élément de reconnaissance spécifique de ces protéines à la surface des liposomes, on peut être en mesure de déclencher le ciblage des cellules en question. On parle dans ce cas de ciblage actif. On pourra prendre comme exemple le cas des récepteurs à l'acide folique qui sont fréquemment surexprimés dans les cellules tumorales. De plus, ces mêmes récepteurs sont internalisés dans le cytoplasme lors de leur activation.²² Ceci a été mis à profit pour augmenter l'activité antitumorale de formulations liposomiales de doxorubicine en greffant des molécules d'acide folique à la surface des liposomes²³. Les récepteurs à la transferrine ont également été décrits comme étant surexprimés par certaines cellules tumorales et ont donc été ciblés en conséquence.²⁴

La recherche de nouveaux ligands pour induire un ciblage efficace passe par l'identification d'éléments exprimés sélectivement ou surexprimés par les cellules cibles. Des vitamines et des facteurs de croissance ont ainsi été identifiés, ainsi que des peptides comme, par exemple, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) qui cible spécifiquement le cancer du sein chez le rat.²⁵

En pratique, dans le cas de liposomes furtifs, le ligand doit être fixé à un bras suffisamment long pour lui permettre de se dégager de l'encombrement stérique induit par le polymère et ainsi faciliter l'accès à son site de liaison sur la cellule cible.

2.3 Applications biomédicales

Depuis leurs premières apparitions sur la scène scientifique, les liposomes ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux visant à mettre en évidence et à promouvoir leur potentiel thérapeutique en tant que vecteurs de molécules médicamenteuses. L'utilisation des liposomes en cosmétologie est très répandue car ils favorisent le transport de principe actif à travers la peau (la couche cornée). La composition de la membrane des liposomes utilisés dans ce but est très voisine de celle des constituants lipidiques de la couche la plus superficielle de l'épiderme. Ces liposomes s'intègrent donc facilement entre les cellules de l'épiderme et permettent de restructurer la couche externe de la peau. L'application des liposomes en cosmétologie ne sera pas approfondie dans ce manuscrit. Nous développerons uniquement les capacités de ce vecteur à transporter un principe actif dans les milieux circulants.

2.3.1 Vectorisation de principes actifs

Pour pouvoir circuler dans l'organisme et éventuellement atteindre leur site d'action, les principes actifs classiques doivent posséder une certaine balance hydrophile/hydrophobe. Cette balance est caractérisée par le logarithme népérien du coefficient de partition P entre le 1-octanol et l'eau du composé considéré ($\log P$). En l'absence d'une partition "harmonieuse", un principe actif présenterait plusieurs inconvénients. Par exemple, s'il présente un caractère trop polaire, il sera facilement éliminé par les reins et traversera difficilement les barrières lipidiques des membranes plasmiques. À l'opposé, s'il est trop lipophile, il sera mal absorbé à partir du tractus gastro-intestinal. Même si il parvient à atteindre le torrent sanguin, il sera rapidement écarté et séquestré dans les adipocytes de l'organisme.²⁶

Les liposomes peuvent donc permettre la circulation de principes actifs en les encapsulant dans le volume intraliposomal. Ils seront alors plus ou moins étroitement associés à la bicouche lipidique du liposome selon qu'ils sont hydrophobes ou hydrophiles.

L'administration d'un principe actif sous forme liposomiale confère à ce dernier des propriétés pharmacocinétiques améliorées (grâce à la protection que lui procure la ou les bicouches lipidiques, protection dont la durée dans le temps va dépendre de la stabilité du liposome), une réduction de la toxicité (confinement du principe actif et réduction des doses administrées) et une forte potentialité de ciblage induite par l'éventuel greffage de ligands spécifiques à la surface des liposomes.

L'utilisation de liposomes pour la formulation d'un médicament est, à l'heure actuelle, restreinte aux administrations par voie parentérale. En effet, lors d'une utilisation par voie orale ou pulmonaire, ces derniers sont successivement en contact avec différents fluides physiologiques (milieu buccal, digestif, intestinal, mucus pulmonaire...). Ces différents fluides renferment des substances à propriétés tensioactives et peuvent présenter des pH qui conduisent à une destruction très rapide des vecteurs lipidiques, au relargage du principe actif et, par voie de conséquence, à une limitation de l'efficacité du traitement. Ainsi des efforts importants sont développés par les laboratoires pharmaceutiques pour améliorer la stabilité et les performances des formes galéniques à base de liposomes, augmenter l'efficacité et l'innocuité de la forme médicamenteuse administrée et ainsi laisser entrevoir la possibilité de l'utilisation d'une telle formulation par voie orale ou pulmonaire.

À notre connaissance, il existe actuellement 13 spécialités pharmaceutiques distribuées sous forme liposomiale et agréées par la FDA (Food and Drug Administration), l'EMA (European Medicines Agency) ou l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) (Tableau 1.1).

Toutes ces spécialités sont strictement réservées à l'usage en milieu hospitalier, et 6 d'entre-elles sont utilisées dans le cadre de traitement antitumoraux.

Nom de spécialité	Principe actif	Distributeur	Classe thérapeutique
AMBISOME	Amphotéricine B	Gilead Sciences	Antibiotique Antifongique
Abelcet	Amphotéricine B	Enzon pharmaceuticals	Antifongique
CAELYX	Doxorubicine, HCl	Schering Plough	Antitumoral
Collagran	Collagène et sel d'argent	Covalon Technologies	Pansement
DaunoXome	Daunorubicine	Gilead Sciences	Antitumoral
DepoCyte	Cytarabine	SkyePharma PLC	Antimétabolite
DOXIL	Doxorubicine, HCl	Sequus Pharmaceut.	Antitumoral
Marqibo	Vincristine sulfate	INEX and Enzon	Antitumoral
MYOCET	Doxorubicine, citrate	Elan Pharma	Antitumoral
Mylotarg	gemtuzumab ozogamicin	Wyeth Ayerst	Antitumoral
ONTAK	denileukin diftitox	Cambrex Bio Science	Antitumoral
PAXENE	Paclitaxel	Faulding Pharmaceut.	Antitumoral
Visudyne	Verteporfine	Novartis Pharma	Ophthalmologie, photothérapie

Tableau 1.1. Spécialités pharmaceutiques actuellement commercialisées sous forme liposomiale.

Les formulations liposomiales d'agents antitumoraux présentent plusieurs avantages par rapport aux solutés injectables « classiques », dont :

- un temps de demi-vie du principe actif multiplié par un facteur pouvant aller de 10 à 100 ;

- une fréquence d'administration pouvant être sensiblement diminuée. À titre d'exemple, dans le cas du DepoCyte[®] (formulation liposomiale de cytarabine), une administration de 50 mg est préconisée tous les 14 ou 28 jours pour 3 ou 4 doses, lors d'un traitement d'induction. L'Aracytine[®], une solution de cytarabine injectable « standard », est administrée à raison de 100 à 200 mg par jour pendant 5 à 10 jours, pour le même type de traitement ;

- un rapport efficacité sur effet indésirable généralement plus important qu'avec le soluté injectable correspondant (pour un service médical rendu équivalent ou supérieur) ;

Ces différentes propriétés découlent des caractéristiques intrinsèques du vecteur lipidique utilisé et, plus précisément, de sa stabilité dans le milieu circulant.

2.3.2 Système de délivrance pour la vaccination

Le développement d'approches vaccinales anti-tumorales est en pleine expansion depuis plusieurs années, suite à la découverte d'antigènes tumoraux en nombre croissant, permettant d'aborder l'immunothérapie du cancer sur des bases beaucoup plus rationnelles. Le but de ces approches vaccinales est d'induire des réponses immunitaires cellulaires et/ou humorales, spécifiques d'une tumeur donnée, de longue durée et générant une mémoire immunitaire, conduisant à la prévention contre les cancers dans le cas d'un vaccin prophylactique ou à l'élimination des tumeurs dans le cas d'un vaccin thérapeutique. Les vaccins peptidiques constituent une approche intéressante. Ils présentent l'avantage d'être moléculairement bien définis et comprennent les structures minimales indispensables au développement d'une réponse immunitaire spécifique. Cependant les sous-unités ou peptides antigéniques seuls sont faiblement immunogènes et nécessitent la présence d'adjuvants ou d'un système de transport pour induire une protection immunitaire efficace. Dans ce contexte les liposomes offrent de nombreux avantages qui peuvent être résumés de la façon suivante :

- ils sont capables de présenter différents antigènes au sein d'une même construction ;
- ils ne possèdent pas d'immunogénicité intrinsèque ;
- les formulations liposomiales sont dépourvues de toxicité ;
- les liposomes sont biodégradables ;
- ils peuvent accueillir diverses molécules, dont des adjuvants, au sein de leur structure.

De plus, les liposomes représentent des vecteurs de choix pour la vaccination dans la mesure où ils sont facilement endocytés (ou phagocytés) par les cellules dendritiques et les macrophages,²⁷ et par conséquent ciblent, de façon passive, le système immunitaire. Ils permettent ainsi d'amener des peptides ou des protéines exogènes vers la voie de présentation des CMH-I et des CMH-II.²⁸ Ils déclenchent la stimulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire contre différents antigènes, et ont la capacité d'accroître l'immunogénicité des peptides qui leur sont couplés.²⁹

L'encapsulation d'antigènes peptidiques dans l'intérieur aqueux des vésicules phospholipidiques les protège d'une hydrolyse enzymatique et peut les rendre plus efficaces. D'un autre côté, il a été émis l'hypothèse que l'ancrage de peptides dans les bicouches des liposomes peut mimer la présentation normale de l'antigène d'un agent infectieux et ainsi potentialiser la réponse immunitaire au peptide.³⁰

Outre leurs propriétés de porteurs d'antigènes, les liposomes s'avèrent être des immunoadjuvants efficaces dans la mesure où ils sont capables d'augmenter l'immunogénicité de protéines ou de peptides antigéniques faiblement immunogènes qui leur sont associés.^{31,32}

Enfin, les liposomes constituent des vésicules d'une grande souplesse d'emploi, ce qui crée une large gamme d'options quant à la conception de la formulation liposomiale synthétique peptidique pour l'induction d'immunités humorale et cellulaire.

2.3.3 Système de délivrance d'acides nucléiques

Les liposomes sont utilisés dans le cadre de la thérapie génique en tant que vecteurs non viraux. Ce système d'encapsulation protège les acides nucléiques des dégradations extracellulaires et peut donc assurer le transport de ces derniers vers les cellules cibles (les différentes méthodes de ciblage ont été évoquées précédemment). Les lipides cationiques utilisés dans ce cas présentent l'avantage d'être relativement bons marchés et non immunogènes mais ne répondent malheureusement pas aux critères d'efficacité demandé dans ce type d'application. De gros efforts sont consentis par de nombreux laboratoires depuis 3 décennies pour développer des stratégies qui permettraient de remédier à cela. Elles sont abordées dans ce qui suit.

3 Les lipoplexes

3.1 Définition

Les lipoplexes sont constitués d'un condensat de lipides (en général cationiques) qui, en fixant de l'ADN forment une particule stable. Cette construction lipidique a pour rôle de protéger et d'acheminer l'ADN jusqu'à sa cible cellulaire.

Avant de présenter les lipoplexes en détail, nous allons introduire la thérapie génique, les lipoplexes ne constituant qu'une des alternatives possible de cette thérapie.

3.2 La thérapie génique

L'ADN est un polymère qui contient l'information génétique nécessaire à la vie. L'unité structurale de l'ADN est le nucléotide, lui-même composé d'un sucre (pentose, le désoxyribose), d'un groupement phosphate et d'une base azotée. Il existe 4 bases azotées : la thymine (T), l'adénine (A), la guanine (G) et la cytosine (C). L'empilement des bases et la formation de liaisons hydrogènes spécifiques entre A et T, et G et C déterminent une structure tridimensionnelle en "double hélice" qui a été proposée par Watson et Crick en 1953 (Figure 1.8).³³

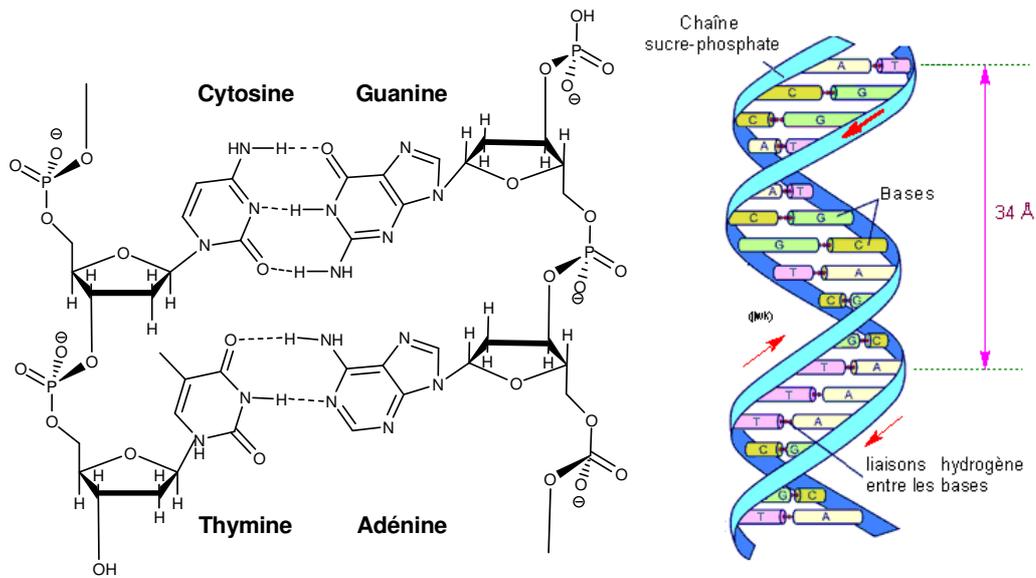


Figure 1.8. Structure de l'ADN

Chez les eucaryotes, le matériel génétique est localisé dans le noyau des cellules. La lecture de l'information génétique (portée par l'ADN) s'effectue lors d'un processus complexe qui regroupe plusieurs étapes. Il y a d'abord la transcription des gènes (avec une ARN polymérase) en ARN. Ces ARN subissent ensuite une étape de maturation (élimination des introns, capping) pour devenir des ARN messagers (ARNm). Ces ARNm sont ensuite traduits en séquences peptidiques par le ribosome, conduisant *in fine* à des protéines fonctionnelles *via* diverses étapes de maturations. Il faut noter que l'ensemble de l'ADN contenu dans le noyau ne code pas pour des protéines ; seul 3 % du génome humain est codant. Le reste, l'ADN non codant aussi appelé ADN intergénique, possède des fonctions encore mal connues. Il est de plus en plus étudié et semble être impliqué dans la structure de la chromatine.

Les maladies génétiques sont dues à une ou plusieurs anomalies sur un ou plusieurs chromosome transmises à la descendance et entraînant un défaut de fonctionnement de cellules précises de l'organisme. Par exemple, la mucoviscidose, encore appelée fibrose kystique, est la plus fréquente des maladies héréditaires mortelles des populations européennes et touche en France environ une naissance sur trois mille. Une mutation d'un gène sur le chromosome 7, la plus fréquemment identifiée (75% des cas), correspond à la délétion sur la protéine CFTR d'un seul acide aminé, une phénylalanine. La pathologie chez l'Homme se manifeste essentiellement au niveau des poumons, les voies aériennes étant progressivement obstruées par un mucus trop visqueux. Actuellement, on a identifié environ 4000 maladies d'origine génétique. La plupart de ces maladies sont rares et n'affectent que très peu de personnes. Ces maladies dites orphelines n'ont, dans la majorité des cas, aucun traitement curatif.

Parmi les pathologies acquises, certaines ont également une origine génétique. Ainsi, les cancers, issus de la division anarchique et incontrôlable des cellules tumorales, représentent les plus importantes causes de décès dans les pays développés. Au cours des multiples divisions cellulaires, le matériel génétique est théoriquement recopié à l'identique. Chaque cellule reçoit ainsi normalement la même information codant pour une protéine fonctionnelle. Mais, même si la polymérase recopie avec une grande fidélité l'ADN et qu'il existe des systèmes de correction d'erreurs qui sont là pour veiller à ce que l'intégrité du génome ne soit pas altérée, des erreurs peuvent subvenir, particulièrement en cas de « stress » (par exemple provoqué par une exposition à des agents mutagènes, oxydants...). Ces mutations sur la molécule d'ADN sont majoritairement muettes et n'ont aucune incidence sur l'intégrité des protéines produites. Cependant, il arrive qu'une mutation ou des facteurs exogènes (virus) perturbent les mécanismes de mort de la cellule conduisant ainsi à des cancers. Par exemple, certains virus codent pour des protéines qui empêchent la cellule infectée de mourir (d'entrer en apoptose) et qui peuvent même l'immortaliser, ce qui conduit alors au développement d'un cancer.

Les thérapies conventionnelles traitent les symptômes par l'administration répétée de petites molécules ou de protéines recombinantes. C'est pourquoi l'idée d'un traitement définitif a vu le jour avec la thérapie génique. Le concept, déjà imaginé il y a une trentaine d'années, consiste à traiter la base de l'anomalie génétique en utilisant le gène comme médicament. Cette thérapie représente un avantage certain par rapport à l'administration de protéines recombinantes comme dans le cas de l'hémophilie ou du diabète. Le gène directement inséré dans la cellule conduirait à l'expression continue de la protéine faisant défaut et permettrait d'obtenir des effets bénéfiques sur une longue période. Cette stratégie permet donc, *a priori*, de s'affranchir de l'administration répétée de protéines recombinantes qui sont éliminées rapidement et toxiques à haute dose.

Les récents progrès de la génomique, science qui cherche à cartographier le génome humain, ont permis d'établir de nombreuses cartes de liaisons génétiques de caractères. Ce travail scientifique colossal qui a commencé en 1990 et qui cherche à identifier les quelques 30000 gènes du corps humain, est arrivé à son terme en avril 2003.³⁴ Le potentiel représenté par cette accumulation de données pour la thérapie génique est énorme, à condition de transformer les gènes en médicaments, et de les insérer efficacement dans les cibles cellulaires. Actuellement, de nombreuses équipes de recherche dans le monde se mobilisent pour expérimenter et évaluer les applications de la thérapie génique dans des pathologies aussi diverses que les maladies génétiques, mais aussi les maladies acquises (cancer, SIDA, maladies neurodégénératives). Cependant, de nombreux obstacles ralentissent le cheminement vers une thérapie génique fiable et efficace. Citons par exemple la grande diversité des pathologies, qui impose une

application au cas par cas de la thérapie, ainsi que la fragilité et l'incapacité du gène à subsister dans les milieux biologiques ou à traverser les membranes cellulaires de par sa nature polyanionique et, enfin, le manque de spécificité pour un organe ou un type cellulaire. Malgré les nombreuses approches envisagées, la thérapie génique reste encore tributaire d'un système gène/vecteur fiable qui va permettre au transgène de migrer vers sa cible cellulaire afin de s'exprimer efficacement et durablement.

3.3 Les obstacles au transfert de gène

Comme pour l'utilisation d'un médicament classique, l'administration d'un gène comme médicament nécessite la connaissance des propriétés physiques et pharmacologiques de l'ADN. En premier lieu et pour être efficace, l'ADN doit être véhiculé jusque dans le noyau des cellules car sa taille et sa nature polyanionique n'autorise pas une diffusion passive à travers les membranes des cellules. Cette étape de transfert de l'ADN à un niveau cellulaire est primordiale et a été résolue avec succès grâce à l'utilisation de molécules chimiques. Une deuxième étape à franchir est ensuite d'accéder aux cellules cibles de l'organisme lui-même. Ce problème n'est pas encore solutionné de manière satisfaisante, même si l'administration locale a donné des résultats encourageants. L'ADN est une molécule fragile et biodégradable. De plus, on l'a déjà vu, sa nature polyanionique et sa taille l'empêchent de pénétrer de façon passive dans les cellules. Par conséquent les voies d'administrations utilisées vont présenter des obstacles pharmacologiques majeurs à son administration en tant que molécule isolée. L'ADN doit donc être associé à un système capable de le compacter, de le protéger des dégradations (particulièrement par les nucléases), et capable de l'acheminer jusqu'aux cellules cibles pour être ensuite libéré dans le noyau afin d'initier la traduction et la transcription des protéines d'intérêt. Les différentes barrières rencontrées dans le transfert de gènes (de la formulation du vecteur à la traduction en protéines dans la cellule) peuvent être résumées de la façon suivante (Figure 1.9).

- 1) formulation du système vecteur/gène et acheminement vers la cellule cible ;
- 2) entrée du complexe dans la cellule cible ;
- 3) entrée du complexe dans le noyau ;
- 4) utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle afin de produire les protéines d'intérêts.

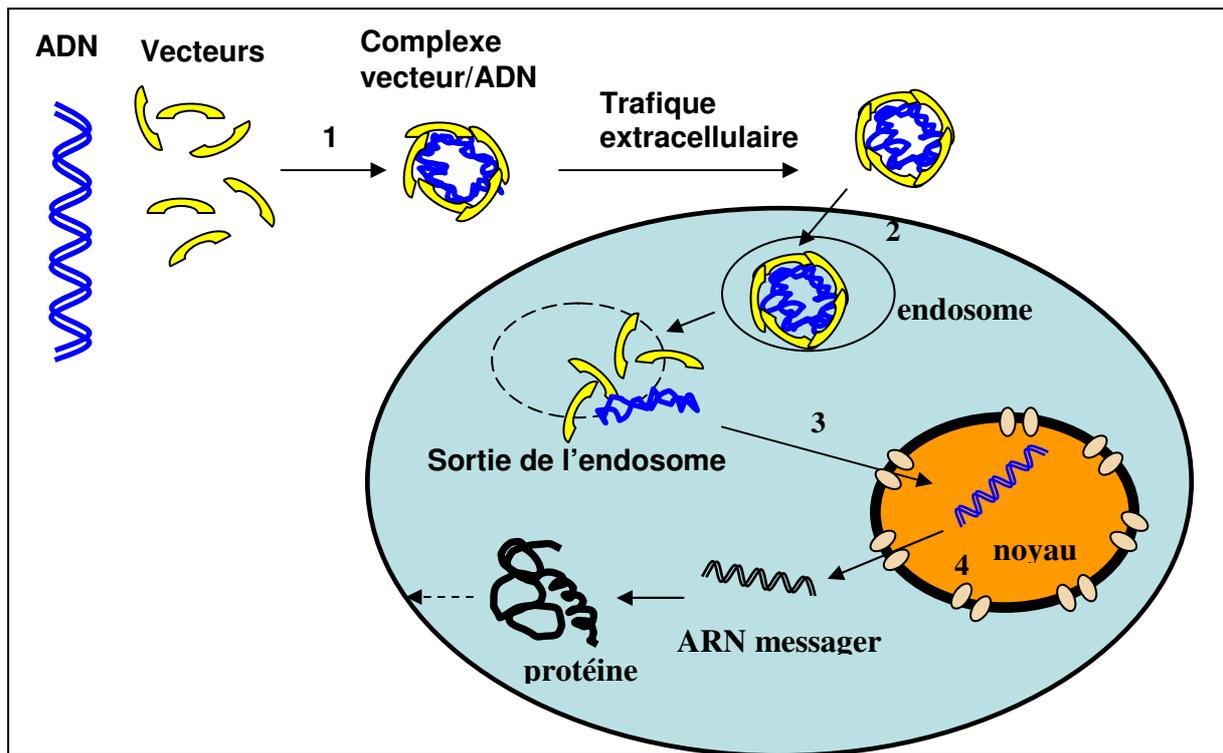


Figure 1.9. Barrières et étapes limitantes rencontrées dans le transfert de gène.

3.4 Les vecteurs utilisés

Les différents vecteurs utilisés jusqu'à aujourd'hui peuvent être répartis dans deux grandes catégories, les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. La barrière qui sépare ces deux catégories de vecteurs tend cependant à s'estomper car on observe l'apparition progressive de vecteurs hybrides possédant des structures à la fois virales et non virales.³⁵

3.4.1 Les vecteurs viraux

À ce jour, les principaux vecteurs utilisés en essais cliniques sont viraux. Les virus sont capables d'insérer efficacement leur patrimoine génétique dans les cellules afin de pérenniser leur cycle d'infection. Ces prédispositions acquises durant leur longue évolution en ont fait des outils de choix pour la thérapie génique. Afin de devenir un vecteur, le virus est modifié par génie génétique. Les gènes impliqués dans la réplication du virus (et de son infectivité) sont remplacés par le gène thérapeutique alors que sa structure protéique est conservée. Il garde néanmoins toutes les structures qui lui permettent d'infecter une cellule (protéine de l'enveloppe, protéine fusogène etc...). Les vecteurs viraux sont séparés en deux grands groupes, ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à celui de la cellule hôte (virus adénoassociés et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (virus adénoviraux et herpétiques).

- **Les virus adéno-associés (AAV)**

Les AAV sont des membres défectueux de la famille des parvovirus. Ils possèdent un simple brin d'ADN et sont non pathogènes pour l'homme. Pour cette dernière raison, leurs applications en thérapie génique n'ont cessé d'augmenter ces dernières années.^{36,37} L'avantage de ces virus est leur capacité à intégrer leur patrimoine dans la cellule hôte, permettant une expression prolongée du gène. Par ailleurs, ils sont capables d'infecter à la fois des cellules en division et quiescentes. Cependant, ces virus souffrent d'inconvénients majeurs, comme leur capacité de stockage d'un matériel génétique exogène limitée à 4,5 kb (kilobases) et leur difficulté de production.³⁸

- **Les rétrovirus incluant les lentivirus**

Les rétrovirus possèdent un patrimoine génétique particulier sous forme de simple brin d'ARN, ainsi qu'une enzyme spécifique, la transcriptase inverse (TI), qui permet la transcription inverse de l'ARN à l'ADN proviral. Ces virus sont impliqués dans de graves pathologies humaines (leucémies, SIDA). C'est pourquoi les rétrovirus recombinants servant de vecteurs sont modifiés de manière à conserver leur capacité d'intégration du génome de la cellule hôte, tout en éliminant toute fonction potentiellement oncogénique. Cependant, de nombreux inconvénients sont liés à leur utilisation avec, notamment, leur intégration qui ne semble pas aléatoire et se produit à des points chauds pouvant conduire à une prolifération non contrôlée de cellules (cancer). Enfin, la plupart de ces virus n'infectent que des cellules en division.

- **Les adénovirus**

Les adénovirus sont particulièrement adaptés aux protocoles de thérapie génique. Ils sont responsables chez l'homme d'infections bénignes (conjonctivites, gastroentérites...) et sont peu pathogènes. Actuellement, ces virus sont les outils les plus prometteurs et aussi les plus utilisés en thérapie génique. Ce sont des virus non enveloppés de forme icosaédrique possédant un double brin d'ADN de 36 kb. Après fixation et pénétration par endocytose dans la cellule, le génome viral migre vers le noyau mais ne s'intègre pas au patrimoine génétique de l'hôte, ne provoquant qu'une expression transitoire du gène thérapeutique, mais évitant les risques de mutagenèse. Par ailleurs, ces virus sont capables d'infecter à la fois des cellules en division et quiescentes. Leurs limitations résident dans la faible capacité d'incorporation d'un acide nucléique exogène (7,5 kb). Cependant, une nouvelle génération d'adénovirus a récemment vu le jour et possède une capacité d'incorporation allant jusqu'à 35 kb. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ces vecteurs est lié à la forte réaction immunogène

de l'hôte qui développe des anticorps anti-adénovirus empêchant ainsi une administration répétée de ces vecteurs.

- **Les virus herpétiques**

Le virus herpétique (HSV) est un virus à ADN neurotrophique peu pathogène pour l'homme. Les vecteurs utilisant ce virus sont capables d'infecter de nombreuses cellules, grâce aux multiples récepteurs reconnaissant les protéines de l'enveloppe. De plus, le virus modifié perd sa capacité répliquative et peut accepter des cassettes allant jusqu'à 25 kb. Son neurotropisme est particulièrement attractif pour le traitement des cancers cérébraux.

- **Limitations des vecteurs viraux**

L'utilisation de virus pour le transfert de gène présente des avantages indéniables. Leur succès dans les protocoles de thérapie génique repose sur leur important potentiel de transfection *in vivo*. De plus, nous disposons actuellement d'une grande variété de virus qui peuvent être choisis en fonction de la pathologie à traiter. Néanmoins, ils présentent également un certain nombre d'inconvénients. En effet, les virus possèdent une très forte capacité à muter, cette caractéristique intrinsèque rend très difficile la production en grande quantité d'entités bien définies. Il existe donc un risque de créer un nouveau virus à forte virulence et la maîtrise de ce risque exige une multiplication de contrôles coûteux.

3.4.2 Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux ou vecteurs synthétiques ont connu un essor considérable depuis une quinzaine d'années. Une multitude de vecteurs (poly)cationiques lipidiques ou polymériques ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*. Leur capacité à complexer l'ADN grâce aux interactions électrostatiques pour former des particules appelées lipoplexes ou polyplexes et l'aptitude de ces particules à transférer les cellules en culture ont permis d'explorer de nouvelles voies d'application de la thérapie génique. Ces complexes présentent l'avantage d'être facile d'utilisation, peu coûteux et sûr (pas de risque de contamination ou de réveil de virus). Cependant, ces systèmes ne sont pas encore compatibles pour des administrations *in vivo*. Ces limitations sont entre autres liées à leur nature cationique qui est à l'origine de nombreuses interactions non-spécifiques avec les composants des fluides biologiques et divers types cellulaires qui limitent l'accès de ces particules à la cible tissulaire.

Parmi les vecteurs de transfert de gènes les liposomes cationiques se sont révélés être efficaces et sans danger.³⁹ Depuis l'apparition du premier lipide cationique (chlorure de *N*-[1-(2,3,-dioléoxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium ou DOTMA),⁴⁰ beaucoup de structures différentes ont été développées. Elles peuvent être séparées en 5 catégories.

- **Les lipides cationiques**

Les lipides cationiques monovalents

La structure de base est constante. Elle consiste en deux régions, l'une hydrophobe et l'autre hydrophile. Par exemple, une charge cationique (ammonium) attachée par un bras (glycérol) à une double chaîne hydrocarbonée (Figure 1.10.).

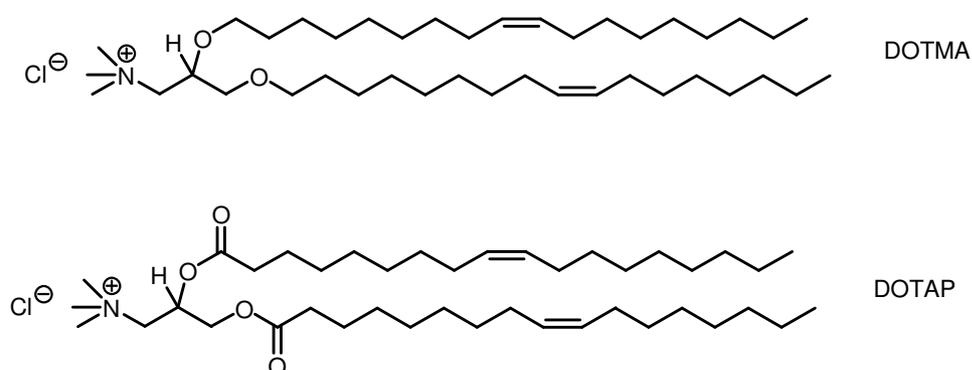


Figure 1.10. Exemples de lipides cationiques monovalents.

Dans le cas du DOTAP, les chaînes grasses sont liées au glycérol par l'intermédiaire de liaisons ester, alors que des liaisons éther lient ces deux motifs dans le DOTMA. Le DOTMA est le premier lipide cationique à avoir été utilisé en transfert de gène. Il a été développé par Felgner et al. en 1987.⁴⁰ Il est admis que des sels d'ammoniums quaternaires contenant une longue chaîne hydrophobe ne forment pas facilement de liposomes, alors que des composés comportant deux chaînes ont la propriété de former des structures en bicouche. Le fait d'interagir avec des particules d'ADN va énormément modifier les propriétés d'auto-assemblage, que ce soit du côté des lipides ou du côté de l'ADN. Ainsi, les interactions mises en jeu ne sont pas uniquement superficielles et expliquées par des liaisons électrostatiques entre les charges opposées de molécules. L'utilisation de lipides cationiques monocaténares tels que le CTAB (bromure de cétyl triméthylammonium bromide) a également été décrite dans des applications en transfert de gène.⁴¹ Ces composés sont en général plus toxiques et moins efficace que les lipides bicaténares tels que de le DOTMA. Cependant, l'ornithinate de 6-(lauroyloxy)hexyle (LHON) est un lipide monocaténaire qui a été décrit comme étant plus efficace et moins toxique que le DOTAP.⁴²

Les dérivés du cholestérol

Le chlorhydrate de 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthyl)carbamoyle] cholesterol (DC-chol) a été utilisé comme agent de transfection accompagné de dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE).⁴³ L'étude de la distribution intracellulaire d'un oligonucléotide antisens fluorescent par CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) a démontré que ce type de vecteur délivrait préférentiellement les oligonucléotides antisens dans le noyau des cellules cibles (cellules NIH3T3, COS-7 and HeLa). Il a ainsi été démontré que ce type de complexe lipide/ADN entrait dans la cellule par endocytose, puis que le lipide fusionnait avec la membrane de l'endosome permettant un relargage de l'ADN et des complexes dans le cytosol.⁴⁴

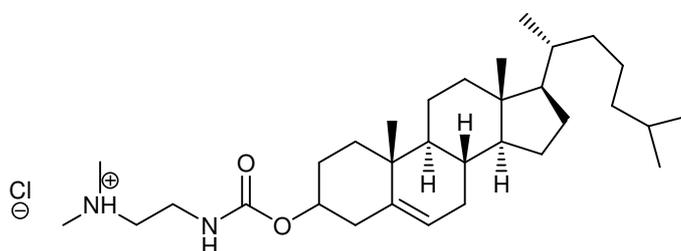


Figure 1.11. Structure du DC-Chol.

Les lipides polycationiques

Les lipides polycationiques tels que le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS ou Transfectam[®]) sont très utilisés en transfection.⁴⁵ D'autres exemples de lipides polycationiques sont présentés à la figure 1.12.³⁹ L'intérêt de ces lipides réside dans leur tête polaire polycationique qui peut induire la formation de phases lipidiques hexagonales ne rendant ainsi pas nécessaire la formulation avec un lipide fusogénique pour une transfection efficace.

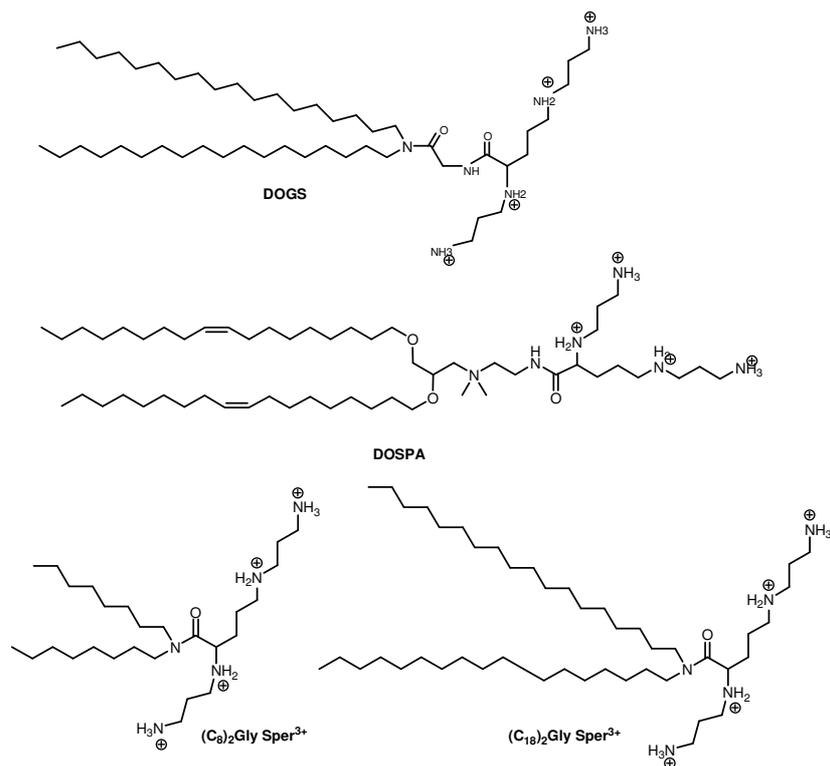


Figure 1.12. Lipides polycationiques utilisés pour la transfection.

- **Les dérivés de guanidine**

La guanidine et ses sels ont été utilisés comme tête polaire de lipides cationiques. Yingyongnarongkul et al.⁴⁶ ont synthétisé trois bibliothèques d'agents de transfection contenant des motifs guanidine dont deux se sont révélées efficaces *in vitro*. De plus, par rapport aux détergents qui présentent une haute toxicité, ces composés sont plus sûrs *in vivo*.

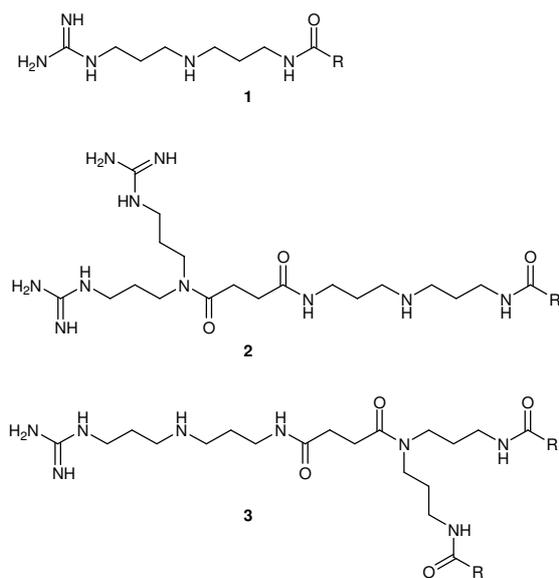


Figure 1.13. Têtes polaires utilisées pour les bibliothèques d'agents de transfection contenant de la guanidine.

- **Les peptides cationiques**

La connaissance des systèmes de libération d'ADN pour la transfection ne cesse d'augmenter. Ainsi, des sites actifs d'enzymes, des ligands de récepteurs et des anticorps impliqués ont été identifiés. De telles structures, comportant de 5 à 20 acides aminés, peuvent être synthétisées et utilisées pour formuler des complexes synthétiques d'ADN aussi efficaces que les virus mais ne présentant pas leurs limitations. Les peptides utilisés sont des peptides amphiphiles pouvant subir des changements conformationnels en fonction du pH et ainsi échapper aux voies de dégradation de l'endosome/lysosome. Ils contiennent des aminoacides chargés (histidine, arginine, lysine) de façon à condenser l'ADN. Le KALA, un peptide hélicoïdal (dérivé de la sous-unité de grippe HA-2, qui permet au virus de lyser la membrane des endosomes), est un peptide qui a été utilisé très tôt et avec succès *in vitro*.⁴⁷ L'avantage des peptides synthétiques pour le transfert de gène réside dans leur structure moléculaire définie et la pureté avec laquelle on peut les produire. De plus, leur flexibilité de synthèse est un atout important car elle permet, en fonction de la nature des expériences (*in vitro* ou *in vivo*), d'en adapter facilement la structure.

- **Adjuvants lipidiques et lipides fusogènes**

Les particules de transfections sont souvent formulées avec de la DOPE (Figure 1.14). Ce phospholipide naturel est connu pour déstabiliser les bicouches lipidiques. Il a tendance à former des phases hexagonales inverses (H_{II}), particulièrement à pH acide. Conjugué à la présence de chlorure de sodium, il diminuerait le potentiel de surface des complexes ce qui faciliterait les interactions intermembranaires et induirait des changements de phases.⁴⁸ La DOPE serait impliquée dans la destruction de l'endosome et permettrait ainsi la libération des complexes dans le cytoplasme.⁴⁹ Elle faciliterait la fusion membranaire avec les membranes des cellules facilitant ainsi l'entrée des lipoplexes dans la cellule et leur relargage dans le cytosol. On peut noter qu'un analogue partiellement fluoré de la DOPE a été développé et testé pour la transfection. Cette molécule augmente de manière significative la transfection lorsqu'elle est utilisée avec un lipide cationique. elle a aussi été évaluée *in vivo*.⁵⁰

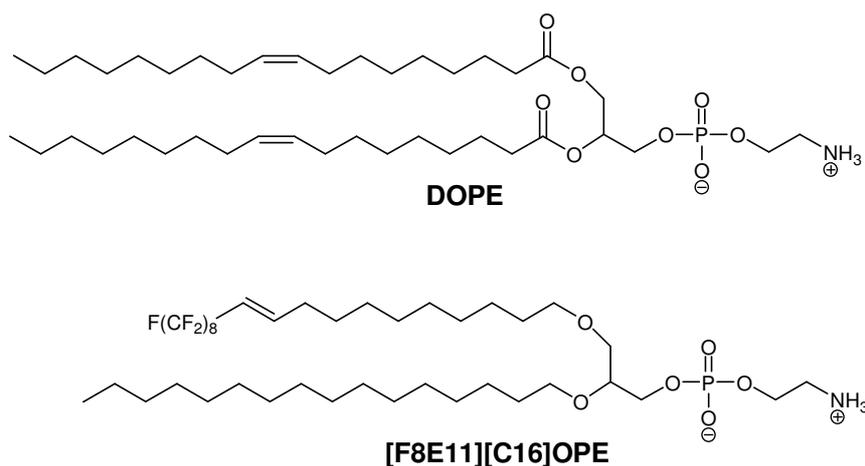


Figure 1.14. Structure des adjuvants lipidiques.

- **Les polymères cationiques**

Des polymères cationiques solubles condensent aussi l'ADN et certains d'entre eux se sont avérés avoir une bonne capacité de transfection.⁵¹ Il existe un grand nombre de polymères cationiques. Je ne citerai ici que les deux plus importants et les plus utilisés en transfection : la poly(L-lysine) PLL et le poly(éthylènimine) PEI.

Poly(L-lysine) PLL

Le polymère PLL est le premier polymère cationique utilisé pour le transfert de gène.⁵² Sa structure est celle d'un polypeptide linéaire constitué d'une répétition de motifs lysine. Il a la particularité d'être biodégradable, ce qui peut être un avantage pour les applications *in vivo*. Malheureusement, il est aussi rapidement lié aux protéines plasmatiques et éliminé de la circulation.⁵³ En fait, le PLL possède une faible capacité de transfection lorsqu'il est utilisé seul. Pour obtenir une bonne efficacité de transfection, il est nécessaire de l'administrer avec de la chloroquine, un agent qui, en tamponnant l'endosome, favorise son éclatement. Il a également été introduit des résidus histidines au sein du squelette polylysine, le but étant de conférer au polymère un caractère d'éponge à proton comme le PEI.⁵⁴ Ce nouveau vecteur s'est révélé meilleur qu'un mélange PLL/chloroquine.⁵⁵ La difficile reproductibilité des formulations avec ce polymère est principalement due à l'hétérogénéité de la longueur des chaînes de PLL commercial. Une forte hétérogénéité va compliquer d'autant les cinétiques d'interaction polymère/ADN et la stabilité thermodynamique du complexe. De plus, ce polymère adopte une configuration en pelote statistique à pH neutre, en hélice α à pH alcalin, et un mélange des deux à pH 7,4.⁵⁶

Poly(éthylènimine) PEI

Le PEI a fait suite à l'utilisation du PLL et en est une amélioration sensible car il possède, de manière intrinsèque, des propriétés endosomolytiques. Il est composé de groupements amines reliés par des groupements éthyle. Cette structure confère au polymère un pouvoir tampon sur une large gamme de pH. Cette capacité lui permet d'accumuler des protons et d'autres ions dans les endosomes et de favoriser leurs éclatements. Beaucoup de facteurs affectent son efficacité : le poids moléculaire, le degré de réticulation, la force ionique de la solution, le potentiel Zêta et la taille des particules.⁵⁷ Des études avec un polymère de faible poids moléculaire et faiblement réticulé ont démontré une bonne efficacité de transfection ainsi qu'une faible toxicité vis-à-vis du PEI de masse molaire élevé commercial.⁵⁸ Des polymères linéaires ont également été testés et ont révélé être plus efficaces que les polymères réticulés.⁵⁹ Par contre, des tests *in vivo* sur souris ont révélé des effets secondaires létaux dans les doses thérapeutiques.⁶⁰ Ceci illustre le fait que des études supplémentaires sont nécessaires afin d'obtenir un polymère possédant un rapport efficacité/toxicité satisfaisant.

3.5 Vers une utilisation *in vivo*

L'ensemble des vecteurs synthétiques présentés précédemment doivent, pour une application *in vivo*, pouvoir circuler dans l'organisme pendant le temps nécessaire pour parvenir aux cellules cibles. Ainsi, la modification chimique la plus répandue pour augmenter le temps de demi-vie des lipoplexes dans l'organisme est d'enrober les particules par une surface inerte de PEG. Comme pour les liposomes, ce polymère va recouvrir la particule et former une gaine hydrophile qui empêchera son opsonisation par des protéines circulantes et la phagocytose par les macrophages. Néanmoins, une augmentation de la durée de vie d'une particule n'est pas systématiquement un avantage. Après avoir atteint les cellules cibles, il faut que le complexe soit internalisé dans les cellules et que l'ADN soit relargué. Ces points très importants sont à l'origine d'un paradoxe qui fait que les résultats *in vitro* ne sont pas transposables *in vivo*. En effet, certaines caractéristiques vont s'avérer être un avantage *in vitro* et un inconvénient *in vivo*. La charge, par exemple, est un atout majeur pour qu'un complexe ADN/vecteur se fixe aux cellules et donc initie une endocytose *in vitro*. Par contre, cette même charge va permettre aux protéines du milieu extracellulaire de se fixer et d'induire une élimination des particules *in vivo*. De même, une taille particulière importante *in vitro* va permettre aux complexes de sédimenter sur les cellules lui permettant ainsi d'entrer en contact avec la cellule hôte et d'être internalisé. Alors que, *in vivo*, des complexes qui précipitent ne peuvent pas circuler dans l'organisme et ne peuvent délivrer leur ADN que dans la zone d'injection. Enfin, la furtivité apportée aux lipoplexes par conjugaison au PEG s'accompagne très souvent d'une inhibition de la transfection. Aussi, des techniques de relargage de ce PEG ont été élaborées. Différents liens clivables entre la partie hydrophile et l'ancre hydrophobe

ont été développés et permettent la séparation de ces deux entités en fonction du pH (milieu acide dans l'endosome), du potentiel d'oxydoréduction du milieu (milieu réducteur dans le cytoplasme), ou par clivage enzymatique par des protéases.⁶¹

Afin de présenter l'intérêt que peut apporter le fluor dans le cadre de la vectorisation de principe actif et d'ADN, nous allons nous intéresser au fluor, aux composés fluoroalkylés et à leurs propriétés singulières. Ceci fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2

Le fluor et les lipides fluorés

1 Le fluor généralité

Nous devons la découverte du fluor à **Henri Moissan** (1852-1907), pharmacien français qui obtint le prix Nobel de chimie en 1906. À l'état naturel, le fluor se trouve principalement dans trois minéraux : la fluorite ou spath fluor (CaF_2), la cryolithe ($\text{AlF}_3, 3\text{NaF}$) et la fluoroapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$). L'isolement du corps pur est difficile à cause de la très grande activité chimique du fluor et de la stabilité des composés qui en résultent. Toutefois, on y est parvenu par électrolyse du fluorure de potassium.

Le fluor (^{19}F) fait partie de la famille des halogènes et présente une abondance isotopique de 100 %. Avec une électronégativité de 3,95 et un rayon atomique de 57 pm, l'atome de fluor est l'un des éléments les plus électronégatifs couramment utilisés en chimie organique et la densité de son nuage électronique lui confère une faible polarisabilité.

2 Les composés lipidiques fluorés

2.1 Les perfluoroalcanes

Le fait de substituer les atomes d'hydrogène d'une chaîne alkyle par des atomes de fluor engendre des modifications des propriétés physicochimiques très importantes. Ainsi, les perfluorocarbures (molécules où tous les atomes d'hydrogène sont remplacés par des atomes de fluor) établissent de très fortes liaisons intramoléculaires et de très faibles interactions intermoléculaires. Les chaînes perfluorées surpassent leurs homologues hydrogénées en termes de stabilité, d'activité de surface et d'hydrophobie. Ils possèdent également une meilleure fluidité, une compressibilité et une capacité à dissoudre les gaz plus élevées. Les chaînes perfluorées ne sont pas seulement hydrophobes mais également **lipophobes**, ce qui leur confère de très bonnes capacités d'auto-assemblage. Ainsi, la plupart des composés amphiphiles fluorés ont la propriété de s'organiser en film, en bicouche ou de former des assemblages supramoléculaires tels que des vésicules, des tubules etc...⁶²

La liaison carbone fluor est plus stable qu'une liaison carbone hydrogène d'en moyenne 75 kJ mol^{-1} .⁶² Les forts effets inductifs du fluor contribuent à renforcer les liaisons C-C du squelette carboné. L'électronégativité du fluor, sa grande taille comparée à l'hydrogène et la densité de son nuage électronique qui forme une gaine électronique, protègent la partie perfluorée contre des attaques d'autres molécules ou réactifs. Tous ces phénomènes sont à l'origine des propriétés exceptionnelles de stabilité thermique et chimique des fluorocarbures. Ils résistent à des environnements extrêmement corrosifs et il n'a pas encore été rapporté de bactérie ou d'enzyme possédant la capacité de dégrader de tels composés.

Les chaînes perfluorées sont plus rigides et occupent un volume plus important que les chaînes alkyles. En effet, le nuage électronique d'un atome de fluor étant plus large qu'une liaison C-C, il va obliger le squelette carboné adopter une conformation en hélice *trans*.⁶³ Des études en monocouches ont démontré que la surface spécifique occupée par une chaîne perfluorée est de 30 \AA^2 , alors que celle d'une chaîne hydrogénée n'est que de 20 \AA^2 .⁶³

La faible polarisabilité du fluor se traduit, dans un liquide perfluoré, par de faibles interactions de Van der Waals. Ce dernier point est responsable des caractéristiques spécifiques des fluoroalcanes : faible tension de surface, fluidité élevée, hydrophobie extrême conjuguée à une forte lipophobie, pression de vapeur et compressibilité élevées, et capacité exceptionnelle à dissoudre les gaz. Il faut bien noter que les fluorocarbures sont beaucoup plus hydrophobes que leurs analogues hydrogénés. La solubilité du tétrafluorométhane dans l'eau est dix fois moins élevée que celle du méthane. L'effet hydrophobe d'une chaîne alkyle (une notion encore très complexe sur laquelle nous avons peu de certitudes) est communément considérée comme proportionnel à la surface en contact avec l'eau.⁶² Il a été mis en évidence que le potentiel hydrophobe d'un groupement CF_2 est, au moins dans certains cas, équivalent à celui de 1,5 groupements CH_2 .⁶⁴

La capacité des perfluoroalcanes à dissoudre les gaz et leur inertie biologique a conduit à les utiliser comme transporteur d'oxygène. Les fluorocarbures, non solubles dans le milieu aqueux, sont administrés sous forme d'émulsion stabilisée par des surfactants (souvent des phospholipides).⁶⁵ La dissolution d'oxygène dans une émulsion de fluorocarbure ne relève pas du tout des mêmes phénomènes que les liaisons de coordinations qui sont à l'origine du transport d'oxygène par l'hémoglobine (Hb). En effet, à pression atmosphérique, tous les sites de liaison de l'hémoglobine à l'oxygène sont saturés. La libération d'une première molécule d'oxygène par la protéine génère un changement allostérique qui provoque une diminution de l'affinité de cette dernière pour l'oxygène et facilite le relargage de O_2 par les trois autres sites. La délivrance d' O_2 va donc dépendre d'effecteurs allostériques, de la tension artérielle et de la température. Il est estimé que seul 5 % de l' O_2 transporté est relargué dans les tissus. Les perfluorocarbures (PFC) sont des porteurs passifs de gaz. La dissolution de gaz dans un liquide perfluoré se conforme donc à la loi de Henry, c'est-à-dire qu'elle est directement proportionnelle à la pression partielle du gaz. La dissolution et le relargage de gaz sont indépendants de l'environnement. Le contenu en O_2 peut être ajusté par simple contrôle de la pression du gaz et, pour des émulsions de PFC, la solubilité de l' O_2 est 20 fois plus grande que celle du plasma.⁶⁶

Les propriétés particulières des perfluoroalcanes ont également été mises à profit dans des domaines comme la vectorisation (*vide infra*), le traitement de surface^{67,68} et l'analyse structurale de protéines membranaires par microscopie électronique.⁶⁹

2.2 Les hydrocarbures hémifluorés

Les alcanes hémifluorés sont amphiphiles. Ils le sont, non pas dans le sens usuel, restrictif, qui entend une association entre un motif hydrophobe et un autre, hydrophile, mais au sens plus large, littéral. En effet, les alcanes hémifluorés possèdent deux motifs qui sont naturellement non miscibles entre-eux, l'un lipophile et l'autre fluorophile, et c'est ce qui leur confère leurs propriétés d'amphiphilie. L'activité de surface de ces composés qu'on peut qualifier de « diblocs » est illustrée par leur capacité à réduire la tension de surface des hydrocarbures.⁷⁰ Ils présentent un fort moment dipolaire et ont une constante diélectrique supérieure à leurs analogues fluorés ou hydrogénés. Le caractère amphiphile de ces composés est illustré par leur capacité d'auto-assemblage dans des hydrocarbures ou des fluorocarbures. Ainsi, par exemple, les composés de structure $C_8F_{17}C_{16}H_{33}$ forment des micelles présentant les chaînes alcanes face au solvant dans le toluène et des micelles présentant les chaînes fluorées face au solvant dans le perfluorooctane.⁷¹ Ce type de composé a été introduit dans des bicouches phospholipidiques pour en améliorer la stabilité par interdigitation (Figure 2.1). Dans ce cas, on observe un domaine fluoré (région grisée) correspondant à l'auto-assemblage des segments fluorés au centre de la bicouche.

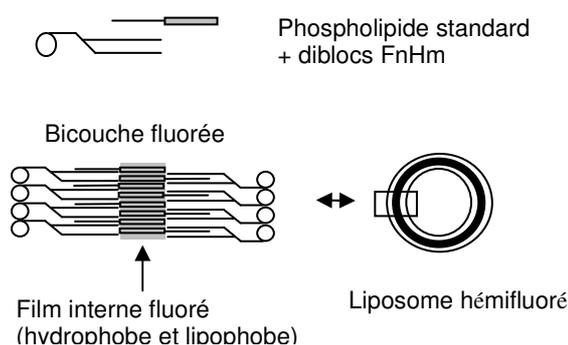


Figure 2.1. Schéma de bicouche fluorée et liposomes fluorés qui peuvent être obtenus à partir d'une association de phospholipides standard et de chaînes alkyles partiellement fluorées.

Les hydrocarbures hémifluorés constituent des composants souples pour la préparation de vésicules, fibres, tubules, rubans, spirales et autres agrégats supramoléculaires.⁷²

2.3 Les surfactants fluorés

Le fait de fluorer une molécule amphiphile va exacerber son caractère hydrophobe. Les fluorosurfactants possédant une ou plusieurs chaînes fluorées ont une activité de surface considérablement plus importante que leurs analogues hydrocarbonés. Des tensions de surface de 15 à 20 mN/m sont ainsi facilement atteintes (contre 28-35 mN/m pour les homologues

non fluorés).^{73,74} Les fluorosurfactants possèdent également une concentration micellaire critique (cmc) inférieure d'environ 2 ordres de grandeur à celle de leurs homologues hydrocarbonés.⁶² Les perfluorosurfactants présentent enfin la propriété d'être lipophobes, les mélanges de fluorocarbures et d'hydrocarbures étant peu ou pas miscibles (*vide supra*). Dans le domaine de la biochimie, les détergents sont utilisés pour déstructurer les membranes cellulaires et solubiliser les protéines membranaires. Cependant, cette solubilisation s'accompagne souvent d'une inactivation irréversible de ces protéines. Dans ce contexte, des surfactants fluorés possédant une faible affinité pour la phase lipidique ont été développés pour solubiliser les protéines membranaires tout en préservant leur activité enzymatique.⁷⁵

2.4 Biocompatibilité-Toxicité

La toxicité des liquides perfluorés est très documentée, ce qui est le résultat d'efforts importants mis en oeuvre pour le développement de transporteurs d'oxygène ou d'agents de contraste.⁶⁵ Les perfluorocarbures utilisés comme substituts sanguins ne sont pas métabolisés. Les gouttelettes d'émulsions sont dégagées de la circulation par phagocytose, puis les perfluorocarbures sont lentement libérés dans la circulation par l'intermédiaire de lipoprotéines à un taux qui dépend de la masse molaire et de la lipophobie du PFC. Ils sont éliminés, sans métabolisation, par les poumons avec l'air expiré.⁶⁵ Par contre, les études sur la pharmacocinétique et la toxicologie des fluorosurfactants sont plus limitées. L'introduction de segments fluorés dans des surfactants n'entraîne pas de toxicité aiguë. En dépit de leur plus forte activité de surface, les surfactants fluorés présentent une activité hémolytique plus faible que leurs homologues hydrogénés. Dans certains cas, elle est même inexistante.⁶² La DL_{50} chez la souris dépend fortement de la tête polaire et de la structure de la chaîne hydrophobe de ces surfactants. Ainsi, la DL_{50} calculée en g/kg est en général très largement supérieure pour un surfactant fluoré par rapport à son homologue hydrocarboné. Cette augmentation est, bien entendu, beaucoup moins prononcée si la DL_{50} est calculée en mol/kg.⁶²

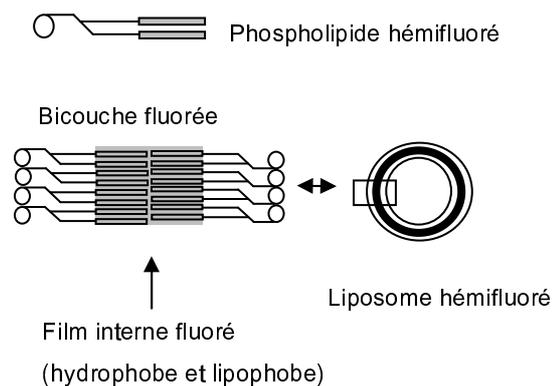
Suite à leur utilisation industrielle en catalyse dans certaines réactions de polymérisation, les acides perfluorés ont fait l'objet d'une attention particulière. Pour les acides perfluorodécanoïque (PFDA) et perfluorooctanoïque (PFOA), les DL_{50} sont respectivement de 40 mg/kg et 190 mg/kg.⁷⁶ La toxicité apparaît donc significativement différente pour ces deux acides. Ils induisent tous les deux une prolifération de peroxyosomes dans les hépatocytes qui est accompagnée d'un changement considérable de l'activité enzymatique. Aucun métabolite n'a été identifié. Les composés sont présents dans tous les organes, excepté dans le cerveau chez le rat. La majeure partie des composés est éliminée dans les urines et une plus faible quantité dans l'air expiré.⁷⁷

3 Les auto-assemblages lipidiques fluorés

Les différentes caractéristiques des chaînes perfluorées ou hémifluorées ont été mises à profit pour concevoir différents types de vecteurs à partir de phospholipides ou de lipides cationiques fluorés.

3.1 Les phospholipides hémifluorés

Le professeur Jean G. Riess, puis le docteur Pierre Vierling ont consacré de nombreux travaux à la synthèse de phospholipides fluorés et à l'étude de leurs propriétés d'auto-assemblage. Les propriétés spécifiques des chaînes perfluorées ont été mises à profit afin de préparer des vésicules plus stables et ainsi conférer à ce vecteur (et *a fortiori* au principe actif encapsulé) un temps de circulation plus élevé dans l'organisme. La mise en œuvre de cette stratégie a nécessité la synthèse de divers amphiphiles fluorés bicaténaires (phospholipides et glycolipides) (Tableau 2.1). Lorsque ces composés amphiphiles sont dispersés dans l'eau, ils s'auto-assemblent de façon à former des liposomes avec, au centre de la bicouche, les extrémités fluorées des chaînes grasses (Figure 2.2). Celles-ci forment un film fluoré qui a la particularité d'augmenter la stabilité des liposomes, de diminuer leur perméabilité vis-à-vis des molécules hydrophiles et lipophiles, et de stabiliser ainsi les liposomes en milieu biologique.⁷⁸ De tels liposomes sont plus résistants à l'action lytique des sels biliaire⁷⁹ et leur temps de demi-vie dans le sang est augmenté.



Figures 2.2. Schéma de bicouche fluorée et liposome fluoré qui peuvent être obtenus à partir d'une association de phospholipides fluorés à l'extrémité de leurs chaînes grasses.

Structure schématique	Structure semi-développée	Nom de code
	$\text{F-(CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P(=O)(O}^-\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3$	DFnCmPC n = 6,8; m = 11
	$\text{F-(CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{O-CH}_2\text{-O-P(=O)(O}^-\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3$	1,3 DFnCmOPC n = 6, 8; m = 11
	$\text{F-(CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P(=O)(O}^-\text{)}_2\text{-NH}_3^+$	DFnEmPC n = 6,8; m = 11
	$\text{F-(CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P(=O)(O}^-\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(CH}_3\text{)}_3$	[FnCm][Cq]OPC n = 8 ; m = 11; q = 16
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Segment hydrocarboné</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Segment fluoré</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Tête polaire</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Motif de liaison ester, éther, amide</p> </div> </div>		

Tableau 2.1. Présentation de quelques structures fluorées utilisées pour la formulation de liposomes.⁸⁰

Les différentes séries de molécules développées dans le laboratoire niçois ont permis d'aborder des études de relation structure/propriétés. Elles sont bicaténaires et le segment fluoré de longueur variable se situe en bout de chaîne. Il est directement lié à une partie alcane, saturée ou non. Ces chaînes mixtes sont liées par une liaison ester, éther ou amide, à différents « chassis » (glycérol, diaminopropanol, aminoéthanol, sérine) qui permettent l'ancrage de différentes têtes polaires (phosphocholine, phosphoéthanolamine, phosphoéthanolamine-*N*-polyéthylèneglycol).

3.2 Les membranes hémifluorées

3.2.1 Structure des membranes hémifluorées

Les différentes bicouches formées par les phospholipides hémifluorés ont été étudiées par diffraction de rayon X et mesure de potentiel dipolaire.⁸¹ L'analyse du profil de densité électronique des bicouches a révélé que la partie fluorée se situait effectivement au centre de la membrane et que celle-ci ne présentait pas d'interdigitation. Les clichés de diffraction de rayons X ont révélés que les distances entre les chaînes grasses étaient plus grandes que celles mesurées avec les analogues hydrogénés de ces lipides. Ceci est bien évidemment dû à la plus grande section d'une chaîne perfluorée ($n \text{ CF}_2 \approx 25\text{-}30 \text{ \AA}^2$) par rapport à une chaîne hydrogénée ($n \text{ CH}_2 \approx 16 \text{ \AA}^2$) ainsi qu'à la plus faible interaction globale entre les chaînes.

3.2.2 Les propriétés relatives aux membranes fluorées

Les liposomes fluorés ont été étudiés par les techniques classiquement utilisées pour l'analyse des liposomes (microscopie électronique par cryofracture), expériences d'encapsulation et de relargage, mesure de taille par diffusion de la lumière...^{82,83,84} La taille des liposomes est un point important pour les applications *in vivo* (*vide infra*). La formulation de liposomes stables à long terme et stérilisables par la chaleur constitue également un atout majeur pour une application pharmaceutique.

Les liposomes formulés à partir de phospholipides à chaînes hémifluorées se sont révélés être stables, de taille bien définie même après un long stockage.⁸⁰ Ces caractéristiques sont très différentes de celles obtenues avec leurs homologues hydrogénés. Ainsi, des vésicules ont pu être conservées 10 mois alors qu'après 6 à 7 jours de stockage dans les mêmes conditions, des dépôts se forment avec des liposomes classiques (DMPC, DPPC, DSPC, respectivement 1,2-dimyristoyl-, 1,2-dipalmitoyl-, et 1,2-distearoylphosphatidylcholine). La meilleure stabilité des liposomes fluorés et leur résistance à la stérilisation par rapport aux liposomes classiques sont attribuées à l'augmentation de l'hydrophobie de la membrane fluorée par rapport à une membrane hydrogénée.

Les films formés par des phospholipides hydrocarbonés forment généralement différentes phases, avec des transitions réversibles en fonction de la température. Ainsi, on observe une phase lamellaire cristalline (ou gel, L_{β}) ou une phase lamellaire liquide cristalline (ou fluide, L_{α}). La température de transition de phase est une des caractéristiques de la bicouche (et *a fortiori* du liposome). L'état physique de la membrane a un impact crucial sur la perméabilité et la libération de principe actif. Les bicouches formées par les phospholipides fluorés présentent également des transitions de phases. Ces phases ont été étudiées par microscopie optique, diffraction de rayon X et calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

La transition de phase gel-fluide d'une bicouche est un événement énergétique qui reflète la coopération des chaînes grasses d'un état ordonné à un état désordonné. Les fluctuations de la température de transition de phase (T_c) et de la variation d'enthalpie qui lui est associée (ΔH) sont attribuées aux différences de compactions résultant des conformations moyennes des chaînes grasses dans la bicouche, des interactions entre chaînes et des interactions hydrophobes.

L'étude d'une large gamme de composés fluorés a permis d'établir une relation structure/ T_c . Si l'on remplace les deux chaînes grasses d'un lipide par des chaînes hémifluorées linéaires comportant au moins 8 groupements CF_2 , une augmentation de T_c est observée. Par contre, l'introduction de deux chaînes linéaires courtes ne comportant que 4 à 6 CF_2 diminue ou n'a pas d'effet sur la T_c .⁸⁰ Enfin, si l'on ne remplace qu'une seule chaîne, on observe des effets inverses. En réalité, pour des lipides possédant un mélange

de chaînes fluorées et hydrogénées, une T_c nettement inférieure à leurs analogues bicaténaires hémifluorés ou hydrogénés est observées. Ceci est parfaitement cohérent avec le fait que des chaînes différentes introduites dans la même molécule induisent un désordre supplémentaire dans les phases organisées.

Les variations d'enthalpie ΔH mesurées lors des transitions de phases des lipides hémifluorés sont plus faibles que celles mesurées avec les homologues hydrocarbonés. Ces valeurs résultent d'un compromis entre :

- 1) la diminution de T_c et de l'enthalpie dues à l'augmentation du désordre au sein des monocouches ainsi qu'à la faible interaction inter- et intramoléculaire ;
- 2) l'augmentation de l'ordre au sein des monocouches, relatif à l'augmentation de l'hydrophobie des chaînes hémifluorées qui engendre une augmentation de T_c .

En série des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylcholines, une chaîne C_4F_9 n'est pas suffisamment longue pour contrebalancer les effets de répulsion alors que, pour une chaîne C_8F_{17} , les interactions hydrophobes prédominent et augmentent donc l'ordre et la rigidité membranaire.

3.2.3 Les liposomes hémifluorés

- ***Perméabilité et relargage de carboxyfluorescéine***

La capacité d'encapsulation d'un vecteur liposomal est un critère essentiel pour une application en biologie. Des études d'encapsulation et de relargage de 5(6)-carboxyfluorescéine (CF) ou de calcéine (CA) ont été faites sur ces nouveaux types de liposomes.^{78, 79, 85} Les études de stabilité de liposomes consistent à encapsuler une molécule fluorescente (par exemple CF ou CA), à une concentration suffisamment élevée pour provoquer une extinction totale de la fluorescence. Les molécules qui s'échappent du liposome vont être diluées dans le milieu extérieur et donc fluorescer. On peut ainsi suivre la fuite de ces molécules en mesurant la fluorescence émise. Le temps de demi-vie d'un liposome ($T_{1/2}$) sera égal au temps nécessaire au relargage de la moitié des molécules fluorescentes encapsulées. Pour des membranes dans un état fluide, le film fluoré au centre de la bicouche agit comme une barrière efficace contre la diffusion de CF. Les vésicules formées présentent ainsi une plus faible perméabilité par rapport à leurs analogues hydrogénés fluides. Il est intéressant de noter que même les vésicules formées par un mélange de chaînes fluorées et hydrogénées présentent une diminution de leur perméabilité.⁸⁰ Il a été montré en outre que la perméabilité d'une membrane fluorée fluide diminue avec l'augmentation de la fluoration. Ces résultats ont été attribués à la forte hydrophobie et à la forte lipophobie des segments fluorés qui augmentent l'ordre au sein des chaînes et diminuent la solubilité du fluorophore encapsulé. Dans ce cas, ces effets

compensent largement les faibles interactions inter- et intramoléculaires entre chaînes fluorées et fluorées/hydrocarbonées dans un état fluide. Cette explication est d'autant plus valable que, dans un état gel, la diminution de perméabilité des vésicules fluorées par rapport à leurs homologues hydrogénées est moins marquée.

- ***Stabilité vis-à-vis des fluides biologiques***

Lors d'une incubation dans du sérum humain, les vésicules fluorées qui sont dans un état fluide relarguent plus rapidement la CF que dans du tampon.⁸⁵ Ils résistent néanmoins plus longtemps que des liposomes conventionnels. Ces résultats seraient expliqués par une plus faible interaction entre ces vésicules et les composants du sérum. Ainsi, l'adsorption de protéines ou d'autres éléments plasmatiques à la surface du liposome serait limitée et/ou leur pénétration dans la bicouche serait gênée. Ainsi, par exemple, les échanges entre phospholipides fluorés et lipoprotéines présents dans le sérum seraient fortement ralentis à cause de la forte lipophobie des segments fluorés et de leur résistance à l'insertion de l'ancre hydrophobe de la protéine.⁸⁶ Par contre, les liposomes fluorés possédant une membrane dans un état gel présentent une plus grande stabilité dans le sérum par rapport au tampon physiologique. Ils sont également plus stables que des liposomes classiques dont la membrane est de type gel. Ces résultats sont attribués à la suppression des défauts généralement présents au sein d'une phase gel.

- ***Stabilité en présence de sels biliaires***

Le but « ultime » d'un vecteur de principe actif pourrait être de permettre à des molécules ou des protéines sensibles d'être administrées par voie orale. Un tel vecteur devrait alors résister au fluide gastro-intestinal. Pour cela, il devrait être stable sur une large gamme de pH et résistant aux lipases pancréatiques et aux sels biliaires (les liposomes étant particulièrement déstabilisés par ces derniers, compte tenu de leurs propriétés tensio-actives).

Dans le but d'étendre le potentiel des lipides fluorés à une administration par voie orale, des tests de stabilité en présence de sels biliaires ont été effectués.⁷⁹ Des vésicules formées à partir de deux phosphatidylcholines hémifluorées (DF8C11OPC et 1,3-DF6C11OPC) ont été testées en présence de taurocholate de sodium. Celles-ci se sont révélées être plus stables que des liposomes conventionnels, stabilisés ou non par du cholestérol. Cette meilleure résistance des liposomes fluorés par rapport aux liposomes classiques face à des composés à propriétés tensio-actives est attribuée à la faible affinité de la partie hydrophobe des détergents vis-à-vis de la membrane fluorée.⁷⁹

- ***Durée de vie dans le sang***

Les fortes hydrophobies et lipophobies conférées aux membranes par les segments fluorés permettent aux liposomes de présenter un temps de demi-vie dans le sang supérieur à celui des liposomes classiques formulés par de la DSPC en présence ou non de cholestérol.⁸⁰ Le fait de formuler ces liposomes avec des PE fluorées fonctionnalisées par du PEG augmente de manière significative leur temps de demie-vie. Par contre, Ils possèdent un temps de demi-vie inférieur à celui des liposomes pegylés classiques. Le film fluoré au centre des membranes semble donc jouer un rôle moindre pour stabiliser ces vésicules *in vivo*.

La clairance des liposomes dans le sang (la clairance est le volume de plasma artériel totalement débarrassé d'une substance, ici les liposomes, par unité de temps) résulte des interactions avec les protéines circulantes et les cellules du système immunitaire. L'introduction de PEG permet de limiter ces interactions. La capacité du film fluoré à limiter ces interactions a été démontrée dans des expériences *in vitro* en présence de détergent. Néanmoins, cette diminution d'interaction n'a eu que peu d'effet sur le temps de demi-vie *in vivo*.⁸⁰

3.3 Les lipoplexes hémifluorés

Le Dr. Vierling a également utilisé les propriétés du fluor dans le cadre de la transfection. Comme nous l'avons vu précédemment (§1.3.2), la thérapie génique nécessite des vecteurs spécifiques capables d'acheminer l'ADN médicament jusqu'au noyau. Des lipoplexes fluorés possédant des propriétés spécifiques sont donc une classe de vecteurs intéressants. Les lipides synthétisés sont des analogues de DOGS ou de transfectame[®] (Tableau 2.2).

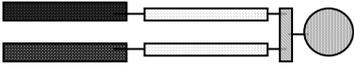
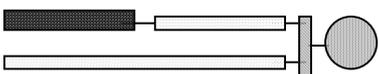
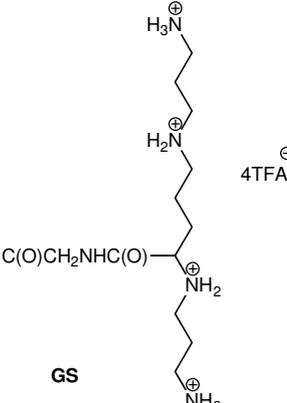
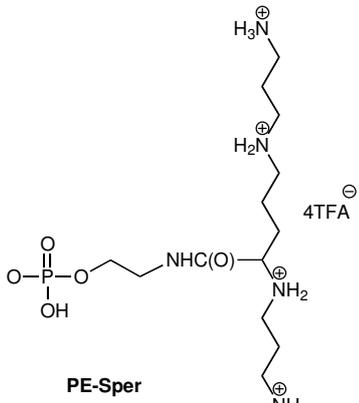
Structure schématique	Structure semi-développée	Code
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m \text{---} \text{N-GS} \\ \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m \end{array}$	DFnCmGS* n = 4, 6; m = 11
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m \text{---} \text{N-GS} \\ \text{F}(\text{CF}_2)_p(\text{CH}_2)_q \end{array}$	[FnCm][FpCq]GS n = 4; m = 11 p = 8; q = 2
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{m-2} \text{---} \text{N-GS} \\ \text{F}(\text{CF}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{m-2} \end{array}$	DFnEmGS n = 4, 6; m = 11
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m\text{O} \text{---} \text{PESper} \\ \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m\text{O} \end{array}$	DFnCmOPE-Sper n = 4, 6; m = 11
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m \text{---} \text{N-GS} \\ \text{H}(\text{CH}_2)_q \end{array}$	[FnCm][Cq]GS n = 4; m = 11; q = 14
	$\begin{array}{l} \text{F}(\text{CF}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{m-2} \text{---} \text{N-GS} \\ \text{H}(\text{CH}_2)_q \end{array}$	[FnEm][Cq]GS n = 4, 6; m = 11; q = 14
		<p>*analogues hydrocarbonés :</p> <p>DOGS ou Transfectam[®]: Fn = H; m = 18</p> $\begin{array}{l} \text{H}(\text{CH}_2)_m \text{---} \text{N-GS} \\ \text{H}(\text{CH}_2)_m \end{array}$

Tableau 2.2. Structure de lipides fluorés bicaténaires formant des complexes avec l'ADN.⁸⁰

Plusieurs de ces lipoplexes fluorés ont montré une efficacité de transfection supérieure au DOGS, avec une toxicité comparable⁸⁷. Les tests effectués sur ces lipoplexes semblent indiquer que plus la chaîne fluorée est longue (et la lipophobie accentuée), plus l'efficacité est importante. Cette augmentation d'efficacité est attribuée à une meilleure protection des particules d'ADN vis-à-vis des composés biologiques. Cette caractéristique est nettement mise en avant lors d'expériences de transfection en présence de sels biliaires. Comme pour les liposomes fluorés qui se sont avérés plus résistants face à des agents de dégradation amphiphiles, les lipoplexes fluorés conservent une activité de transfection en présence de

10 % de sel biliaire. Dans les mêmes conditions, la transfection par des lipoplexes classiques diminue de façon drastique.⁸⁰

4 Conclusion

Les liposomes formés à partir de phospholipides bicaténaires hémifluorés ainsi que les lipoplexes formés à partir de lipides polycationiques hémifluorés ont démontré des propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes. L'introduction d'un segment perfluoré améliore notablement les propriétés des auto-assemblages du type liposomes et lipoplexes. Toutefois, la stabilisation n'est souvent pas encore suffisante dans le milieu biologique où des agents tensio-actifs et des enzymes peuvent venir s'insérer dans la bicouche et conduire à une dégradation de la vésicule. Dans ce contexte, une augmentation de la stabilité des auto-assemblages lipidiques serait encore bienvenue et c'est ce qui constitue l'objectif de cette thèse.

Chapitre 3
Conception de phospholipides fluorés pour
l'encapsulation de principes actifs

1 Introduction

Malgré les améliorations introduites dans la vie des patients suite à l'utilisation de formulations liposomiales d'anti-tumoraux (ou d'autres agents thérapeutiques), ces traitements, lorsqu'ils sont appliqués, restent encore lourds et nécessitent toujours une hospitalisation. Ainsi, à titre d'exemple, dans le cas du DepoCyte[®] (formulation liposomiale injectable de cytarabine, un antimétabolite), une administration de 50 mg est préconisée toutes les deux semaines et requiert, à chaque fois, l'hospitalisation du patient. Afin d'alléger les traitements et améliorer la condition du patient, il est encore souhaitable et important de diminuer la fréquence d'injection et les doses injectées. Il serait bien entendu encore plus bénéfique de pouvoir passer d'un mode d'injection par voie parentérale en milieu hospitalier à une administration par voie orale. Pour en arriver là, des efforts importants sont bien entendu encore nécessaires afin d'améliorer la stabilité et les performances des formes galéniques à base de lipides et augmenter l'efficacité et l'innocuité de la forme médicamenteuse administrée.

Un des objectifs de cette thèse était de développer une nouvelle classe de composés lipidiques qui présentent des propriétés d'auto-assemblage originales, conférant aux associations en question une stabilité accrue dans les fluides biologiques. De telles formulations devraient permettre d'améliorer l'efficacité de principes actifs encapsulés, administrés par voie parentérale, et pourraient éventuellement laisser entrevoir leur administration par voie orale ou pulmonaire.

2 Développement de vecteurs liposomiaux fluorés

2.1 Contexte et objectifs

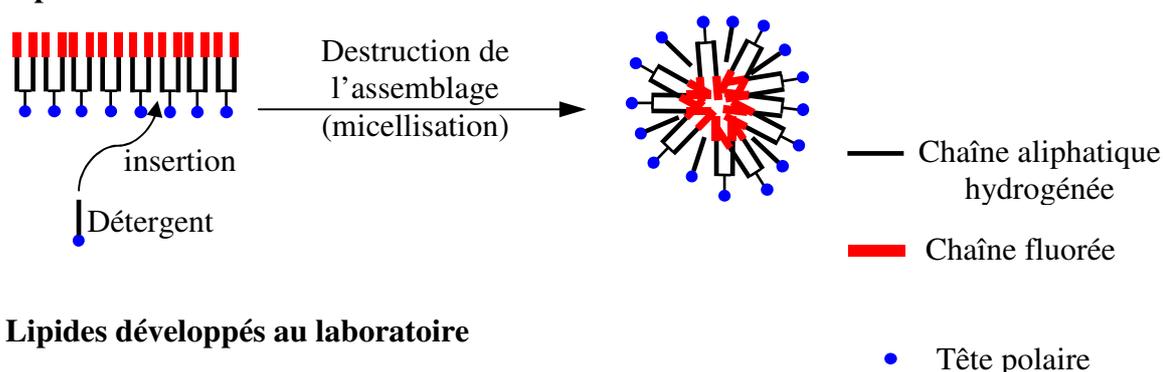
Dans le cadre de la mise au point de nouvelles formulations de médicaments, on peut envisager d'utiliser des composés amphiphiles localement perfluorés de façon à tirer profit des propriétés spécifiques des chaînes fluorées.⁸⁸ L'introduction d'une chaîne perfluoroalkyle dans un surfactant accroît sensiblement son caractère hydrophobe. Ainsi, par rapport à une bicouche lipidique non fluorée, une bicouche dont les chaînes grasses incorporent un segment fluorocarboné terminal présente une stabilité accrue et une meilleure résistance aux détergents (*vide supra*). Quand les lipides perfluorés sont dispersés dans l'eau pour former des liposomes, les segments fluorés se rassemblent pour créer un film hautement hydrophobe et lipophile au sein de la membrane.⁸⁹

Dans toutes les stratégies développées jusqu'à maintenant et visant à stabiliser des assemblages lipidiques par l'utilisation de motifs fluorés, le gain de stabilité résulte d'une augmentation de la cohésion hydrophobe globale du système (la cohésion hydrophobe

entre deux chaînes aliphatiques perfluorées est 1,5 fois plus élevée que celle entre des chaînes non fluorées de même longueur).⁹⁰ Comme on l'a vu précédemment, l'équipe du Dr P. Vierling à Nice a développé une série de lipides fluorés à l'extrémité de leurs chaînes grasses et évalué la stabilité de leurs assemblages en milieu biologique. Les liposomes qui ont pu être construits avec ce type de composés présentent des temps de demi-vie en milieu sanguin qui sont jusqu'à 20 fois supérieurs à ceux des liposomes non fluorés correspondants⁸⁰.

Dans les fluides biologiques ou en présence d'agents tensioactifs, ces assemblages restent néanmoins fragiles et sont détruits, à plus ou moins long terme. Ceci est dû essentiellement au fait que les liposomes administrés adsorbent rapidement certaines protéines plasmatiques (dont des opsonines, des phospholipases,...) ainsi que diverses petites molécules lipophiles (dont certaines avec des propriétés tensio-actives) de l'environnement biologique. Pour concevoir des constructions lipidiques qui devraient résister plus longtemps aux différents mécanismes de destruction, nous nous fondons sur des résultats obtenus au laboratoire et qui montrent que des molécules amphiphiles, *fluorées à proximité de leur tête polaire*, permettent de construire des monocouches à l'interface air-eau qui ont la remarquable propriété d'être imperméables aux composés hydrophobes ou amphiphiles non fluorés (Figure 3.2).⁹¹ Ainsi, il a été démontré par ellipsométrie (une technique non invasive servant à étudier les interfaces air/eau) qu'une monocouche formée de lipides bicaténaires fluorés à proximité de leur tête polaire n'était absolument pas perturbée par la présence de détergent dans la sous-phase. Cette propriété résulte en partie de la cohésion hydrophobe élevée de ces systèmes, comme c'est le cas pour les lipides développés par l'équipe du Dr. P. Vierling. Cependant, *un effet stabilisant supplémentaire et de magnitude beaucoup plus forte* provient du fait que les assemblages lipidiques en question sont imperméables aux composés hydrophobes ou amphiphiles non fluorés. Ainsi, en empêchant d'une part l'insertion des agents tensio-actifs dans ces couches lipidiques, mais également d'autre part l'adsorption des protéines plasmatiques à la membrane (adsorption qui se fait vraisemblablement, pour partie tout au moins, par insertion d'une ancre hydrophobe des protéines en question dans la membrane), il est possible de prévenir efficacement la destruction de l'édifice.

a) Lipides fluorés en bout de chaîne



b) Lipides développés au laboratoire

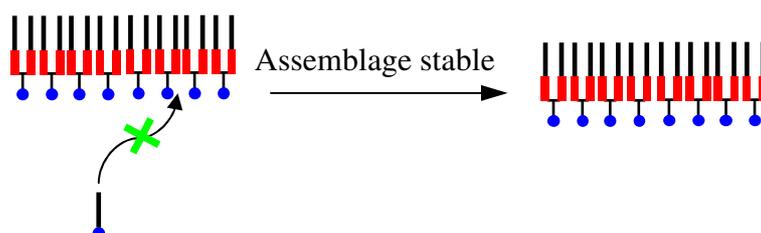


Figure 3.1. Schéma des constructions supramoléculaires et de leur vulnérabilité vis-à-vis d'agents tensio-actifs.

Nous proposons d'exploiter les propriétés particulières de ce type de structures lipidiques localement fluorées pour concevoir de nouvelles constructions de vecteurs synthétiques.

2.2 Conceptions de nouveaux amphiphiles fluorés

2.2.1 Phospholipides linéaires

Les phospholipides hémifluorés qui ont constitué nos premières cibles sont des phosphatidylcholines (PC) et des phosphatidylglycérols (PG) (Figure 3.3). En effet, les PC constituent les principaux composants des membranes cellulaires et leur utilisation en formulation est très fréquente. L'utilisation d'un mélange PC-PG, quant à elle, facilite la formulation des liposomes classiques (généralement formulés avec 80 % de PC et 20 % de PG), d'où notre intérêt à préparer des PG hémifluorés.

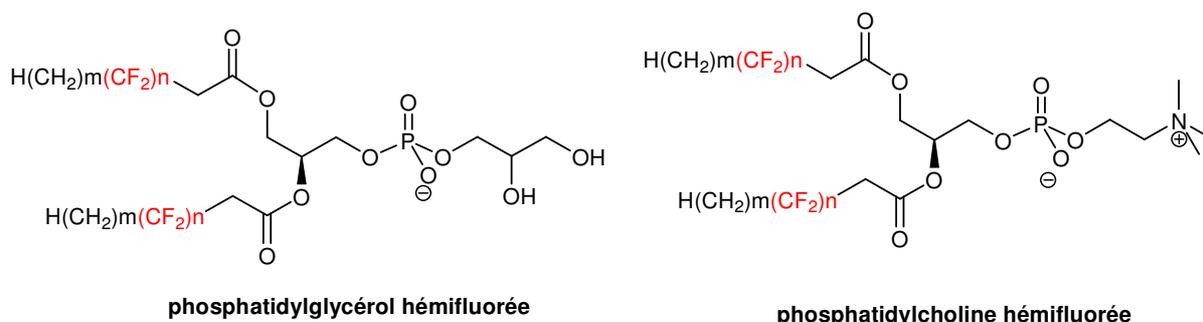


Figure 3.2. Présentation des premières molécules cibles localement fluorées.

Le choix des longueurs de chaîne fluorée a été fait en considérant les phospholipides homologues DMPC, DPPC et DSPC. La partie hydrophobe de ces molécules est suffisante et efficace pour induire la formation de monocouches à l'interface air/eau et de bicouches dans le cadre de liposomes. Les molécules hémifluorées destinées à la fabrication de liposomes doivent donc posséder le même « potentiel hydrophobe ». Comme nous l'avons vu précédemment (§2.2.1), celui d'un groupement CF_2 est égal à 1,5 fois celui d'un groupement CH_2 .⁹⁰ Ainsi, des chaînes hémifluorées comportant quatre groupes difluorométhylène ($n = 4$) et dix groupes méthylène ($m = 10$) que nous noterons C_{10}F_4 présenteront une hydrophobie comparable, en première approximation, à celle d'une chaîne hydrocarbonée à 16 atomes de carbone. Les chaînes C_6F_6 et C_{10}F_6 présenteront quant à elles une hydrophobie comparable à un C_{15} et C_{19} . Les forces d'origine hydrophobe mises en jeu seront *a priori* quantitativement identiques ou se rapprocheront de celles des composés de référence (DMPC, DPPC et DSPC). Nous pourrions donc étudier l'impact de l'emplacement du fluor dans les chaînes tout en limitant le gain d'hydrophobie engendré par l'utilisation de fluor. Les différentes structures synthétisées sont représentées dans le tableau 3.1. À titre de comparaison et afin de vérifier si la présence de segments hydrogénés sur nos constructions est effectivement nécessaire, nous avons également réalisé la synthèse de structures totalement fluorées (avec $n = 6$ et 9 et $m = 0$). *Pour permettre une lecture plus facile de ce manuscrit, les différentes molécules que nous avons synthétisées sont récapitulées, avec leur nom de code, sur une page dépliant à la fin de cette thèse.*

Certaines contraintes rencontrées lors de nos synthèses et qui seront développées plus loin nous ont également amenés à préparer des phosphatidylcholines α,β -insaturées (notées $\text{C}_m\text{F}_n\text{i-PC}$ composés 9 à 12). Nous les avons intégrées à notre chimiothèque et avons évalué leur potentiel d'auto-assemblage en monocouches et en liposomes.

Composé	Structure	Code
1		C₁₀F₄-PC
2		C₆F₆-PC
3		C₁₀F₆-PC
4		F₆-PC
5		C₁₀F₄-PG
6		C₆F₆-PG
7		C₁₀F₆-PG
8		F₆-PG
9		C₁₀F_{4i}-PC
10		C₆F_{6i}-PC
11		C₁₀F_{6i}-PC
12		F_{6i}-PC
13		Lyso-C₁₀F₆-PC
14		C₅F_{6β}-PC
15		C₅F_{6β}-PG

Tableau 3.1. Structures des phospholipides linéaires destinés à la préparation de liposomes.

Le composé **13**, de type lyso-, c'est-à-dire ne comportant qu'une chaîne grasse en position 3 du glycérol, a également été préparé au cours de notre travail. Des dérivés dénommés « bêta » **14** et **15**, comportant deux groupes méthylène entre la fonction carbonyle et le segment fluoré, ont eux aussi été synthétisés, pour des raisons qui seront développées plus largement dans le chapitre dédié à la description de nos travaux de synthèse. Ces composés nous permettent en particulier d'évaluer l'impact du décalage du segment fluoré au sein de la chaîne grasse sur la stabilité des assemblages.

2.2.2 Phospholipides Ramifiés

L'aire spécifique occupée par une chaîne hydrocarbonée au sein d'une couche monomoléculaire oscille, selon les publications, entre 16 et 25 Å².^{92,93} Cette valeur est donnée entre 27,5 et 40 Å² pour une chaîne perfluorée.^{94,95,96} La section de chaîne du segment hydrocarboné linéaire étant plus petite que celle des segments fluorés, il en résulte un degré de liberté plus important au niveau des segments hydrocarbonés. On ne peut donc pas exclure la présence de cavités ou de zones non cristallines au sein de la bicouche et ces zones pourraient fragiliser les assemblages. Afin d'homogénéiser les deux sections de chaînes des acides gras nous avons synthétisé des structures ramifiées, c'est-à-dire possédant deux segments hydrocarbonés par segment fluoré (tableau 3.2).

Composé	Structure	Code
16		C_{8R}F₆-PC
17		C_{14R}F₆-PC
18		C_{8R}F₆-PG
19		C_{14R}F₆-PG
20		monoC_{18R}F₆β-PC

Tableau 3.2. Structure des phospholipides ramifiés synthétisés.

Pour poursuivre notre étude sur l'influence de la section de la chaîne grasse sur les propriétés d'auto-assemblage des lipides hémi-fluorés, nous avons également envisagé un composé monocaténaire à chaîne ramifiée (en série β). La chaîne hydrocarbonée ramifiée de ce composé comprend 18 atomes de carbone. Le potentiel hydrophobe de ce composé ($18 \text{ CH}_2 + 6 \text{ CF}_2 \approx 29 \text{ CH}_2$) est donc comparable à celui de la DMPC.

2.3 Propriétés physicochimiques

2.3.1 Comportement en monocouches

Afin de caractériser nos molécules de manière physique, nous avons d'abord étudié leurs propriétés d'auto-assemblage en deux dimensions à l'interface air/eau. Les mesures ont été faites sur une balance de Langmuir.

Principe de la technique

Les monocouches de Langmuir sont constituées d'une couche d'épaisseur monomoléculaire d'un composé placé à la surface d'un liquide appelé sous-phase (le plus souvent une solution aqueuse). Elles sont formées par des molécules amphiphiles dont la tête polaire va se placer face à la solution aqueuse, les chaînes hydrophobes minimisant leurs interactions avec la sous-phase en pointant à l'opposé. De telles molécules préfèrent naturellement se disposer à la surface d'une phase aqueuse car elles sont très peu solubles dans l'eau. On dit que ce sont des molécules tensioactives et elles présentent la propriété de provoquer une réduction de la tension de surface. Les monocouches peuvent être caractérisées par différents paramètres (température T , pression de surface π , aire moléculaire). Les molécules amphiphiles se présentant généralement sous forme solide ou semi-solide à température ambiante, elles sont dissoutes dans un solvant organique et déposées à la surface de la sous-phase (Figure 3.4). Après évaporation du solvant, un film bidimensionnel (2D) en phase dite « gaz à deux dimensions » est obtenu. Une fois ce film formé, il est possible, grâce à une barrière mobile, de le compresser en réduisant, la surface libre disponible pour les molécules (c'est-à-dire que l'on va ainsi diminuer l'aire moyenne par molécule, A) (Figure 3.3). La monocouche va, de cette façon, devenir de plus en plus compacte et adopter l'organisation la plus stable pour les molécules.

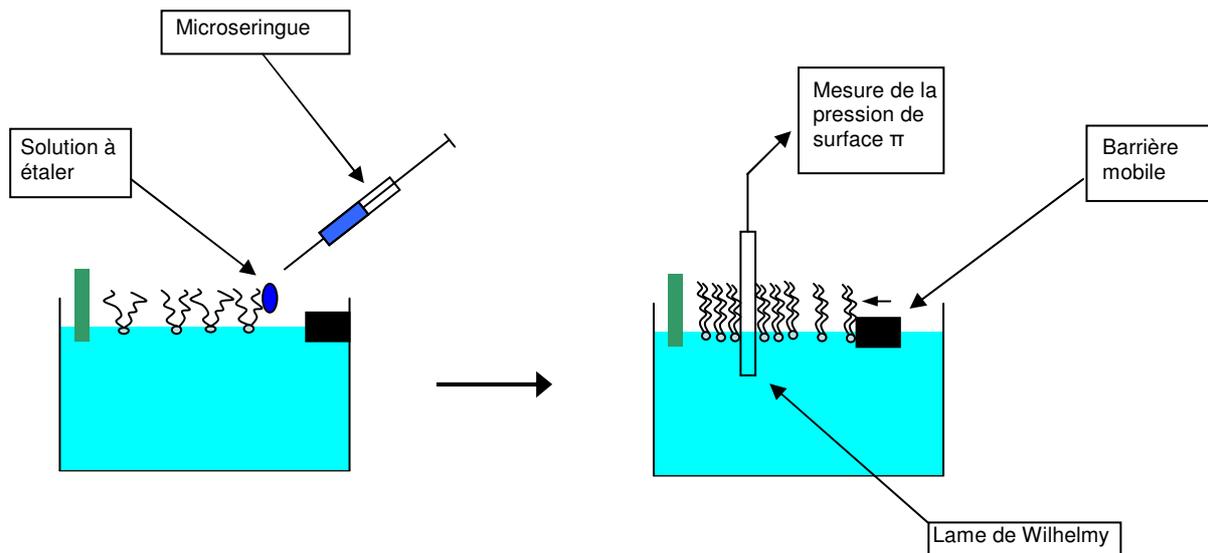


Figure 3.3. Schématisation de la préparation d'une monocouche de Langmuir.

La tension de surface est mesurée tout au long de la compression à l'aide d'une lame de Wilhelmy (Figure 3.4). C'est une lame standardisée en alliage à base de platine et la condition préalable à son utilisation efficace est une propreté parfaite.

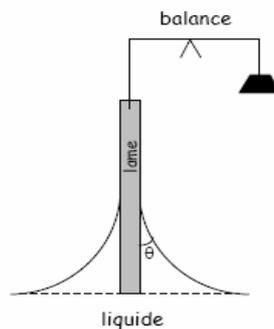
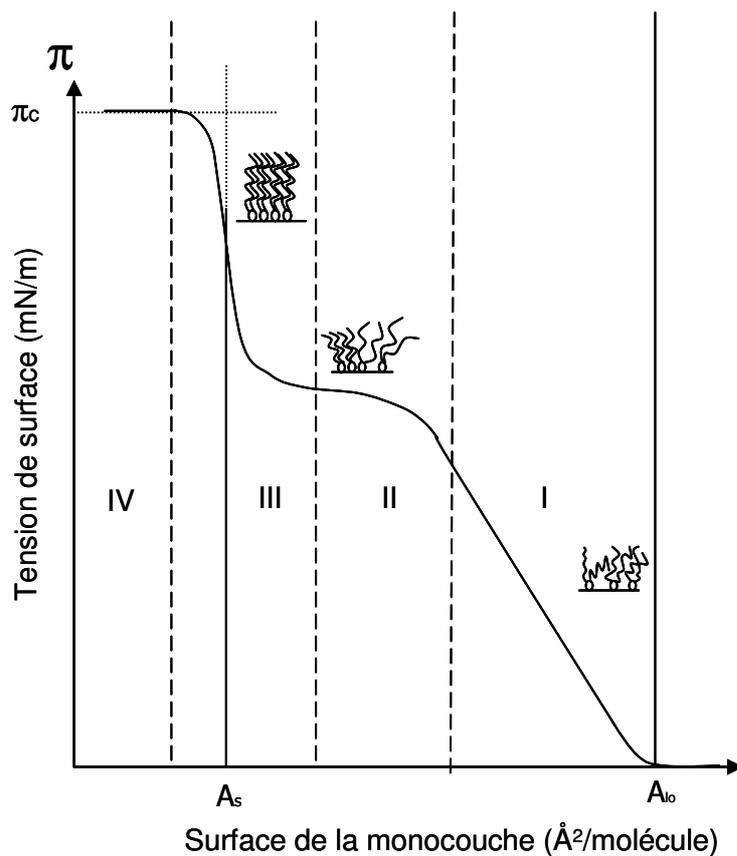


Figure 3.4. Dispositif de mesure de la tension de surface.

La mesure de la tension de surface au cours de la compression à une température donnée permet d'étudier les états de la monocouche. En rapportant l'aire par molécule à la tension superficielle, on obtient une courbe appelée isotherme de compression. Les différentes phases susceptibles d'être observées sont récapitulées dans la figure suivante.



Région I : phase fluide expansée.

Région II : transition de phase principale (coexistence des phases fluide et condensée).

Région III : phase condensée.

Région IV : collapsus.

Surface spécifique (A_s) : surface minimale occupée par une molécule de lipide dans l'état le plus condensé de la monocouche.

Aire de lift-off (A_{lo}) : surface minimale à partir de laquelle on observe une augmentation de la tension de surface.

Pression de collapsus (π_c) : valeur maximale de la tension de surface supportée par la monocouche.

Figure 3.5. Isotherme de compression classique.

La figure 3.5 présente un isotherme de compression classique. Il représente la tension de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par chaque molécule à l'interface. Au début de la compression, les molécules étalées à l'interface air/eau n'interagissent pas les unes avec les autres. Ces molécules sont dans une phase gazeuse à 2 dimensions. La compression n'engendre pas de modification de la tension de surface. Puis, de faibles interactions apparaissent qui se traduisent par une légère augmentation de la tension de surface, c'est le « lift off ». Les molécules à l'interface ne sont pas ordonnées, elles sont dans une phase fluide expansée mais commencent à se repousser entre elles. La compression engendre une augmentation de la tension de surface de plus en plus importante. Il est ensuite observé un plateau où la compression n'entraîne pas d'augmentation de tension de surface. Ce plateau correspond à la transition de phase et est caractérisé par la coexistence de deux phases, la phase fluide expansée et la phase condensée. Plus tard dans la compression, toutes les molécules sont disposées de manière très ordonnée à l'interface et on n'a plus qu'une seule phase, la phase condensée. Une faible compression provoque alors une forte augmentation de la tension de surface jusqu'à un maximum où la monocouche va se briser en formant une multicouche ou des micelles, c'est le collapsus. La tension de surface maximale atteinte par la monocouche dans son état le plus condensé est appelée pression de collapsus (π_c) et l'aire par molécule est dénommée aire spécifique (A_s).

Résultats

Tous les phospholipides hémifluorés que nous avons préparés forment des monocouches à l'interface air/eau. Les résultats obtenus pour les PC, par exemple, sont présentés à la figure 3.6.

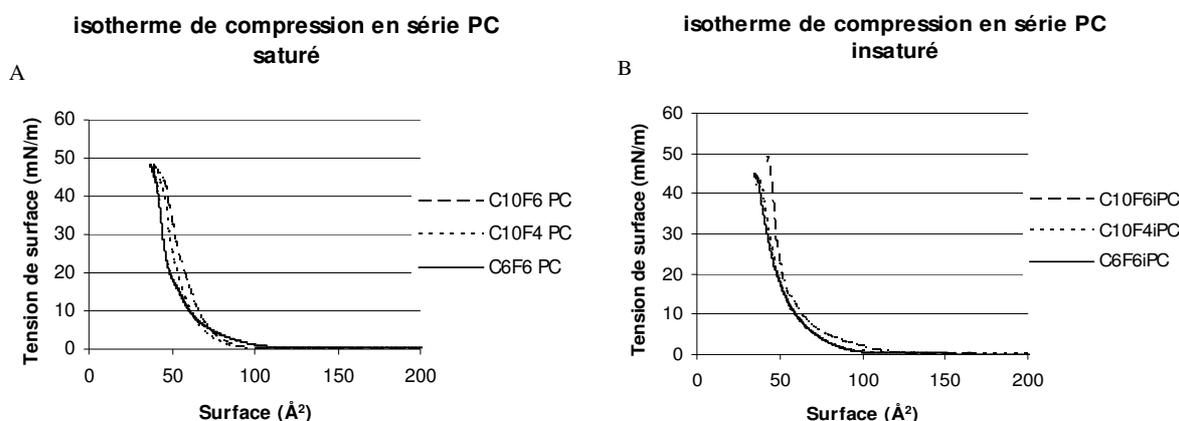


Figure 3.6. Présentations des isothermes de compression pour la série PC linéaire. A) saturées et B) insaturées.

Les valeurs d'aire de lift-off, d'aire spécifique et de pression de collapse ont été extraites des différentes courbes et sont récapitulées dans le tableau 3.3.

Composé	Code	π_c (mN/m)	A_s (Å²/molécule)	A_{lo} (Å²/molécule)
1	C ₁₀ F ₄ -PC	47 ± 2	43 ± 2	87 ± 10
2	C ₆ F ₆ -PC	47 ± 1,6	39 ± 2	106 ± 15
3	C ₁₀ F ₆ -PC	49 ± 1,3	45 ± 2	92 ± 10
4	F ₆ -PC	47 ± 1,6	39 ± 2	106 ± 9
9	C ₁₀ F _{4i} -PC	45 ± 1,6	42 ± 2	101 ± 10
10	C ₆ F _{6i} -PC	43 ± 1,2	36 ± 2	101 ± 8
11	C ₁₀ F _{6i} -PC	48 ± 1,5	43 ± 2	125 ± 11
14	C ₅ F _{6β} -PC	43 ± 1,2	42 ± 2	121 ± 10
16	C _{8R} F ₆ -PC	40 ± 1,5	53 ± 2	108 ± 9
17	C _{14R} F ₆ -PC	37 ± 1,5	53 ± 2	108 ± 8
20	monoC _{18R} F _{6β} -PC	43 ± 1,7	32 ± 2	88 ± 10
5	C ₁₀ F ₄ -PG	40 ± 1,4	40 ± 2	85 ± 10
6	C ₆ F ₆ -PG	46 ± 1,7	38 ± 2	109 ± 15
7	C ₁₀ F ₆ -PG	45 ± 1,5	41 ± 2	70 ± 6
15	C ₅ F _{6β} -PG	46 ± 1,2	46 ± 2	134 ± 10
18	C _{8R} F ₆ -PG	37 ± 1,5	64 ± 2	127 ± 12
19	C _{14R} F ₆ -PG	46 ± 1,4	68 ± 2	108 ± 6
-	DMPC	49	45	
-	DPPC ⁹⁷	52	41	102
-	DF ₆ C ₇ -PC ⁹⁸	52	62	-
-	DF ₄ C ₁₁ -PC ⁹⁸	49,5	58	-
-	DF ₆ C ₁₁ -PC ⁹⁸	58,5	42	-
-	DF ₈ C ₁₁ -PC ⁹⁸	56	43	-

Tableau 3.3. Récapitulatif des résultats obtenus pour les études à l'interface air/eau

Résultats et Discussion

Aucun de nos composés étalé en monocouche n'a laissé apparaître de transition de phase visible au cours de la compression isotherme. L'absence de transition pourrait être due au fait que la température à laquelle sont réalisées les compressions est supérieure à la température de transition de phase T_m à laquelle s'effectue le passage de la phase gel à la phase liquide cristallin. Une autre possibilité serait que la monocouche entre très tôt en phase cristalline et présente un palier de transition de phase à une tension de surface très faible et qui ne serait pas détectée sur l'isotherme de compression. Cependant, dans ce cas, la compressibilité de la monocouche (matérialisée par la pente de l'isotherme) serait très faible (pente élevée) dès le début de la compression, ce qui ne correspond pas à l'observation. La première hypothèse semble donc plus sérieuse et sera appuyée par d'autres expériences, notamment en calorimétrie et diffraction de rayons X (*vide infra*).

Dans la littérature, plusieurs préparations de monocouches avec des molécules mono- ou bicaténaires fluorées ont été rapportées. Pour des amphiphiles bicaténaires, le remplacement des chaînes d'hydrocarbures par des perfluorocarbures engendre la formation d'un film plus stable mis en évidence par une plus grande pression de collapse.⁹⁹ On peut noter que, dans notre cas, aucune pression de collapse ne dépasse celle de la DPPC (52 mN/m). Il semblerait donc que nos analogues fluorés forment des monocouches moins résistantes à la compression que la DPPC ou que les lipides fluorés en bout de chaînes.

Les PC saturées présentent une pression de collapse plus élevée que leurs analogues insaturées (C_6F_6 -PC : 47,5 vs. C_6F_{6i} -PC : 43,8 mN/m ; $C_{10}F_4$ -PC : 47,3 vs. $C_{10}F_{4i}$ -PC : 45,1 mN/m ; $C_{10}F_6$ -PC : 49,0 vs. $C_{10}F_{6i}$ -PC : 48,2 mN/m). Il semblerait donc que l'introduction d'une double liaison diminue la stabilité de la monocouche en y introduisant du désordre. Par contre, plus les chaînes sont longues, plus l'effet est atténué par les interactions hydrophobes et, dans le cas des composés $C_{10}F_6$ -PC et $C_{10}F_{6i}$ -PC, la différence n'est plus significative.

Le déplacement du segment fluoré vers l'extrémité de la chaîne induit une légère baisse de la pression de collapse (C_6F_6 -PC : 47,5 mN/m et $C_5F_6\beta$ -PC : 43,1 mN/m). Par contre, en série phosphatidylglycérol, la pression de collapse ne varie pas entre C_6F_6 -PG et $C_5F_6\beta$ -PG (46,1 mN/m). On peut aussi noter que C_6F_{6i} -PC et $C_5F_6\beta$ -PC ont des comportements similaires avec une pression de collapse à peu près identique (43,8 mN/m et 43,1 mN/m, respectivement).

La pression de collapse augmente avec la longueur de la chaîne en série PC linéaire mais ce n'est pas le cas en série ramifiée. Il semblerait que l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée ramifiée (qui induit *a priori* une augmentation globale de

l'hydrophobie) n'engendre pas un accroissement de la stabilité de la monocouche dans sa phase la plus condensée.

On observe que les lipides possédant une tête polaire de type PC forment des monocouches présentant une pression de collapse plus élevée que leurs analogues PG (excepté pour les composés à chaînes $C_5F_6\beta^-$ et $C_{14R}F_6^-$). Ceci ne va pas tout à fait dans le sens de ce qu'on pourrait attendre. En effet, des têtes polaires chargées se repoussent entre-elles et résistent donc à la compression, d'où une valeur généralement plus élevée observée pour la pression de collapse π_c . La tête polaire des PC est zwitterionique, donc globalement neutre, alors que la tête des PG est chargée négativement et on s'attendrait à ce qu'elle établisse des répulsions électrostatiques d'intensité croissante lors de la compression au sein de la monocouche. Ce n'est visiblement pas le cas et le même type de déviation au comportement attendu a déjà été rapporté par Ringsdorf et reste, à notre connaissance, sans explication, si ce n'est l'invocation d'éventuelles interactions ioniques entre les têtes polaires et des contre-ions présents dans la sous-phase.⁹⁹

Les phospholipides ramifiés présentent les pressions de collapse les plus basses, exceptées pour $C_{14R}F_6$ -PG. On peut donc supposer que ce type de structure ne supporte que très peu les contraintes liées à la compression.

Les aires spécifiques mesurées pour nos lipides sont particulièrement basses. On s'attendrait normalement à des valeurs comprises entre 50 et 60 Å² pour des lipides linéaires bicaténaires (2 x 25-30 Å²).⁶² Or, elles se situent plutôt entre 37 et 45 Å². Ces résultats sont assez similaires à ceux obtenus par l'équipe du Dr. Vierling. En effet, les composés DF_6C_{11} -PC et DF_8C_{11} -PC décrits par le groupe niçois montrent des aires spécifiques respectivement de 42 et 43 Å². Il est probable qu'à l'approche du collapse, l'instabilité des monocouches entraîne à une perte importante de matériel à l'interface (passage de matériel en solution et/ou formation de structures multilamellaires), ce qui conduit à une large sous-estimation de l'aire moyenne occupée par les molécules. Pour cette raison, une interprétation « fine » des valeurs des aires spécifiques relevées pour les différents composés testés est excessivement délicate et spéculative. Nous avons néanmoins essayé de formuler quelques remarques étayées par des comparaisons entre les valeurs de A_s que nous avons pu mesurer pour nos lipides.

Les composés ramifiés bicaténaires possèdent une plus grande surface spécifique que les composés à chaînes linéaires (53,4 à 68,3 Å², et 38,5 à 48,2 mN/m, respectivement). Ceci est aisément expliqué par l'encombrement stérique engendré par la ramification. Suivant le même raisonnement, il est logique d'observer la plus petite aire spécifique pour le composé monocaténaire **20**.

L'introduction d'un groupement méthylène entre le groupement carbonyle et la chaîne perfluorée induit une augmentation de l'aire spécifique (C_6F_6 -PC : 39,1 Å²; C_6F_6 -PG :

38,5 Å²; C₅F₆β-PC : 42,0 Å²; C₅F₆β-PG : 46,0 Å²). On peut supposer qu'en répartissant le « potentiel lipophile » de part et d'autre du segment fluorée, on ne conserve pas le même potentiel hydrophobe et la monocouche est moins compacte.

Les aires spécifiques occupées par les PG ramifiées sont nettement supérieures à leurs analogues PC (C_{8R}F₆-PG : 64,0 Å², C_{8R}F₆-PC : 53,5 Å²; C_{14R}F₆-PG : 68,3 Å², C_{14R}F₆-PC : 53,4 Å²). Ces observations sont conformes à ce qu'on attend des répulsions électrostatiques entre les têtes polaires anioniques par rapport aux têtes polaires zwitterioniques. Cependant, on l'a vu plus haut, cette logique est battue en brèche avec les composés linéaires.

La section plus élevée des chaînes fluorées comparée aux chaînes hydrocarbonées (30 Å² vs. 20 Å²)⁶² et les faibles interactions qu'elles exercent entre elles confèrent aux amphiphiles fluorés une aire au lift-off plus grande que celle de leurs homologues hydrocarbonés. Ceci s'explique logiquement par le fait que les interactions cohésives étant plus faibles (qu'en série hydrocarbonée), elles compensent moins bien le mouvement brownien et les chocs intermoléculaires qui génèrent la tension de surface.

Les composés en série β, quant à eux, présentent les aires au lift-off les plus élevées. Dans ce cas donc, le groupement méthyle supplémentaire donne aux chaînes grasses un plus grand degré de liberté et les collisions intermoléculaires apparaissent plus tôt.

2.3.2 Analyse en DSC (calorimétrie différentielle à balayage)

Principe

La calorimétrie différentielle à balayage (en anglais, Differential Scanning Calorimetry ou DSC) est une méthode de caractérisation des matériaux. Elle mesure les variations des échanges de chaleur d'un échantillon à analyser en fonction de la température, par comparaison avec une référence. Cette technique sert à étudier les transitions thermiques. Les transitions thermiques sont les changements qui interviennent dans un composé lorsqu'il est chauffé. La fonte d'un polymère cristallin en est un exemple.

Il existe deux techniques de calorimétrie différentielle à balayage qui utilisent des principes de mesure différents : la première est dite méthode par compensation et la seconde est la méthode des flux de chaleur. Elles reposent toutes deux sur le fait que lorsqu'une transition de phase a lieu au sein d'un matériau, elle s'accompagne d'une absorption ou d'un dégagement d'énergie.

La méthode par compensation : L'échantillon et la référence sont disposés dans deux fours différents placés dans la même enceinte calorifique. La variation de température entre les deux fours se fait simultanément par la même quantité de calories. La température est maintenue toujours égale dans les deux fours, et varie de manière linéaire. Les différences des énergies absorbées ou dégagées par l'échantillon et la

référence sont mesurées. Lorsqu'une transition se passe, selon qu'elle soit endothermique ou exothermique, l'échantillon va absorber ou dégager de l'énergie. Un générateur de puissance fournit plus ou moins d'énergie par rapport à la référence. C'est cette variation d'énergie qui est enregistrée en fonction du temps ou de la température. Ceci permet de mettre en évidence les changements de phase et de déterminer la température à laquelle elles ont lieu.

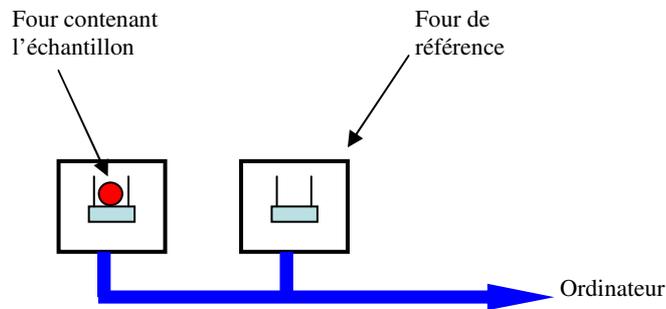


Figure 3.7. Dispositif utilisé par la méthode par compensation.

La méthode des flux de chaleurs : L'échantillon et la référence sont placés dans un même four, mais dans deux récipients différents. Chaque récipient contient un thermocouple relié à un ordinateur. Une résistance électrique apporte de l'énergie à l'enceinte et est asservie à la température de la référence qu'elle fait varier de façon linéaire. L'ordinateur enregistre la différence de température entre l'échantillon et la référence, et la convertit en flux de chaleur. La mesure de la différence de température entre l'échantillon et la référence, tout au long d'un cycle de chauffe, permet de déceler les événements endo- ou exothermiques dont l'échantillon est le siège. C'est cette dernière technique qui a été utilisée dans ce travail.

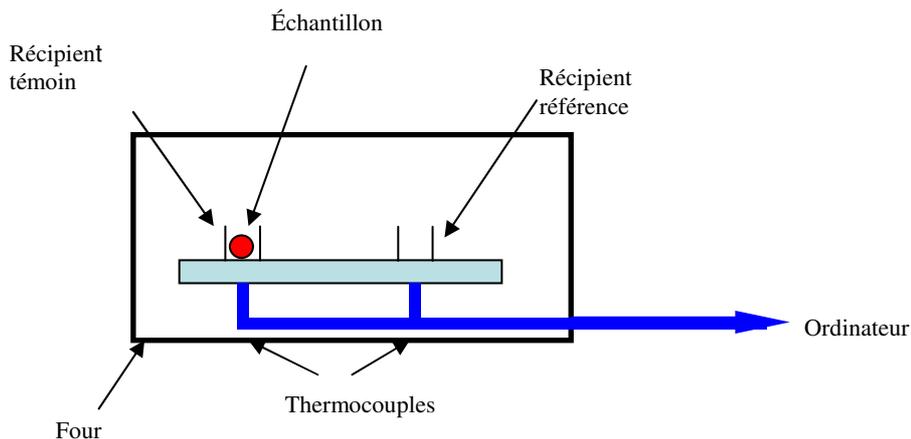


Figure 3.8. Dispositif utilisé par la méthode des flux de chaleurs.

La DSC est utilisée pour la caractérisation de transitions thermiques. Il existe deux événements thermiques principaux que l'on peut observer : *la cristallisation et la fusion*.

La cristallisation et la fusion

La plupart des composés amphiphiles organiques passent d'un état ordonné vers un état désordonné lors d'un accroissement de température. Cette transition de phase, qui a lieu à une température bien définie, est appelé **fusion** et la température à laquelle cette transition a lieu est appelé point de fusion. Lors du refroidissement, le phénomène inverse est observé avec une mise en ordre moléculaire. Cette transition est appelée **cristallisation** et la température à laquelle a lieu cette transition est appelée température de cristallisation.

La structure cristalline correspond à l'état thermodynamiquement le plus stable. La cinétique de cristallisation dans le cas des composés lipidiques dépend fortement de la capacité des chaînes carbonées à s'organiser les unes par rapport aux autres. La cristallisation de lipides, mise en ordre des molécules, s'accompagne d'un dégagement de chaleur, que le thermocouple « échantillon » va détecter et la température au point le plus haut est appelée température de cristallisation. On obtient la courbe suivante (Figure 3.9).

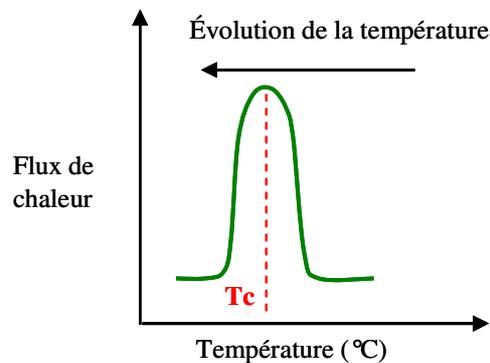


Figure 3.9. Courbe caractéristique de transition cristalline et détermination de la température de cristallisation T_c .

Il est également possible de mesurer l'aire du " pic " qui est proportionnelle à la variation d'enthalpie ΔH (J/g ou cal/g) du système au cours de la transition et correspond à la chaleur latente de cristallisation du lipide. De la chaleur est dégagée lors de la cristallisation, cette transition est exothermique.

Inversement, quand la température de fusion T_f est atteinte, ces cristaux commencent à s'écrouler, ils fusionnent. Les molécules sortent de leur arrangement ordonné et commencent à bouger librement. Quand les cristaux fondent, ils ont besoin d'absorber de la chaleur. Cela signifie que lorsque l'on atteint la température de fusion, la température du matériau ne s'élèvera pas tant que tous les cristaux n'auront pas fondus. Cette absorption de chaleur pendant la fusion (baisse de température au niveau du thermocouple du récipient témoin) apparaît sous la forme d'un grand creux sur la courbe de DSC.

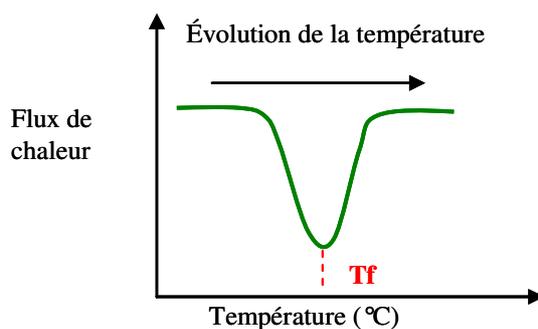


Figure 3.10. Courbe caractéristique de fusion et détermination de la température de fusion T_f .

En mesurant l'aire de ce pic, on mesure la variation d'enthalpie ΔH (J/g ou cal/g) du système, ce qui correspond à sa chaleur latente de fusion. La température la plus basse du pic est appelée température de fusion, T_f .

Puisque nous devons donner de l'énergie au composé pour le faire fondre, la fusion est une transition endothermique. Les transitions comme la fusion et la cristallisation, qui ont des chaleurs latentes, sont des transformations du premier ordre.^{100,101}

Certains composés ont la particularité de ne pas transiter directement de l'état cristallin vers un état désordonné appelé aussi phase isotrope. Ces composés peuvent présenter des phases entre ces deux extrêmes, appelées phases intermédiaires ou encore phases cristal liquide.

Un cristal liquide thermotrope modèle présentera, lors de la chauffe, au moins deux pics de fusion. Le pic à basse température sera associé à une transition d'un état cristallin vers une phase intermédiaire (mésophase) dite phase cristal liquide, cette température est appelée point de fusion. Le pic de fusion à plus haute température sera lui associé à la fonte de la phase cristal liquide en une phase totalement désorganisée, dite phase amorphe. Cette température est appelée point d'isotropisation. Il peut y avoir plusieurs pics de fusion entre ces deux extrêmes et qui correspondent alors à différentes transitions cristal liquide/cristal liquide. Ces processus de fusion du premier ordre sont réversibles et les transitions inverses sont observées lors du refroidissement.

Appliquée à des lipides dispersés en solution aqueuse, la DSC permet d'étudier leur polymorphisme. La bicouche lipidique résultant de la dispersion d'un phospholipide dans l'eau ou dans un solvant présente différentes transitions de phases. La transition de phase gel (dispersion de bicouches lipidiques cristallisés) à cristal-liquide est la plus énergétique et souvent la seule qui soit observée de manière reproductible (Figure 3.13.). Elle est appelée transition de phase principale et a lieu à la température T_m (main phase transition temperature).¹⁰²

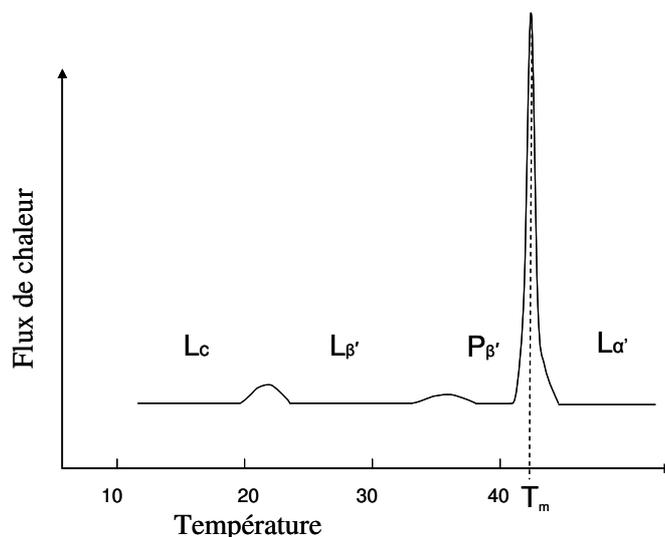


Figure 3.11. Profil obtenu en DSC avec une solution de DPPC (4 mM) dans un tampon phosphate (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). Les lipides ont été hydratés à 0 °C pendant 24 h avant chauffage.

Par exemple, dans le cas d'une dispersion de DPPC dans l'eau, trois transitions endothermiques sont observées (Figure 3.11.).¹⁰² Le premier pic de transition à 21,5°C correspond à une enthalpie de transition de 6 kcal/mol. Elle correspond à une augmentation de la mobilité de la tête polaire du lipide et à une plus profonde pénétration de l'eau dans la région interfaciale de la bicouche. Une seconde transition est visualisée à 35 °C. Elle s'accompagne également d'une faible variation d'enthalpie (1 kcal/mol) et est appelée pré-transition. Cette prétransition a été attribuée à la rotation de la tête polaire ou à un mouvement coopératif des chaînes hydrocarbonées rigides avant fusion. Enfin, la transition la plus marquée est visible à 41,5 °C et présente une enthalpie de 8,7 kcal/mol. Cette transition correspond à la fusion coopérative des chaînes grasses, avec des changements de conformation trans gauche des liaisons C-C. Les trois transitions séparent quatre phases lamellaires distinctes désignées par les symboles L_c (phase lamellaire cristalline), $L_{\beta'}$ (phase gel incliné ou *tilted gel*), P_{β} (phase gel ondulé ou *ripple gel*) et L_{α} (phase liquide cristalline). Les transitions de phase peuvent être écrites de la manière suivante $L_c \rightarrow L_{\beta'}$, $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta}$ et $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$. La troisième transition correspond à la transition de phase principale et a lieu à la température T_m . Lors de cycles successifs de chauffage/refroidissement, la sous-transition disparaît et la pré-transition dérive lentement vers des températures plus basses (≈ 1 °C). La transition de phase principale est la seule qui soit reproductible après plusieurs cycles.

La connaissance préalable de la température de transition de phase d'un lipide permet de faciliter sa formulation en liposomes (§1.2.1.2). Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à mesurer cette température de transition de phase pour les différents lipides fluorés synthétisés et ce, sous forme hydratée. En parallèle, afin de corrélérer les résultats obtenus par diffraction des rayons X, nous avons également mené des investigations sur des échantillons de lipides secs. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Résultats

Composé	Code	Échantillon hydraté		Échantillon sec	
		T _m (°C)	ΔH (J/g)	T _m (°C)	ΔH (J/g)
1	C ₁₀ F ₄ -PC	/	/	/	/
2	C ₆ F ₆ -PC	/	/	10,2 ± 0,1	1,22 ± 0,2
3	C ₁₀ F ₆ -PC	49,5 ± 0,1	7,60 ± 0,2	50,5 ± 0,1	9,73 ± 0,5
4	F ₆ -PC	/	/	/	/
9	C ₁₀ F _{4i} -PC	/	/	/	/
10	C ₆ F _{6i} -PC	/	/	/	/
11	C ₁₀ F _{6i} -PC	34,4 ± 0,1	6,31 ± 0,3	16,9 ± 0,2	4,88 ± 0,2
5	C ₁₀ F ₄ -PG	27,2 ± 0,2	3,10 ± 0,2	/	/
6	C ₆ F ₆ -PG	19,9 ± 0,1	6,67 ± 0,2	16,5 ± 0,1	0,94 ± 0,3
7	C ₁₀ F ₆ -PG	62,5 ± 0,2	4,24 ± 0,2	41,4 ± 0,2	2,49 ± 0,2
8	F ₆ -PG	/	/	/	/
14	C ₅ F _{6β} -PC	21,75 ± 0,2	5,20 ± 0,3	19,4 ± 0,2	2,92 ± 0,2
15	C ₅ F _{6β} -PG	28,4 ± 0,2	3,80 ± 0,2	21,7 ± 0,2	1,86 ± 0,2
20	monoC _{14R} F ₆ -PC	/	/	/	/
16	C _{8R} F ₆ -PC	/	/	/	/
17	C _{14R} F ₆ -PC	/	/	/	/
18	C _{8R} F ₆ -PG	/	/	/	/
19	C _{14R} F ₆ -PG	/	/	/	/

Tableau 3.4. Récapitulatif des températures de transition de phase et enthalpies mesurées par DSC pour les différents lipides synthétisés, sous forme hydratée (10 % de lipide, en poids) et sèche (/ signale le fait qu'aucun point particulier n'est décelé sur la courbe de DSC).

Nous n'avons pas visualisé de transitions de phase pour tous nos composés. En général, ceux présentant des transitions de phases en échantillon sec en présentent également une en échantillon hydraté (excepté C₆F₆-PC et C₁₀F₄-PG).

Pour huit composés parmi les dix-huit analysés, nous avons pu détecter une transition de phase pour les échantillons hydratés ou secs, dans la gamme de température explorée (-20 à +85 °C). Ces transitions de phases sont caractérisées par la présence d'un pic réversible de faible intensité. Les transitions observées sont associées à des transformations endothermiques lors de la chauffe et exothermiques lors du refroidissement. Ces transitions de phases sont donc du 1^{er} ordre et associées à un changement de l'organisation moléculaire lors du chauffage et à un retour à l'organisation moléculaire initiale lors du refroidissement. Les pics observés sont relativement larges. Ceci est en accord avec les résultats rapportés dans la littérature. En effet, les chaînes fluorées présentent la particularité de ne pas fondre de manière homogène. Des expériences de RMN ont démontré que, lors d'une augmentation progressive de la température, les différents groupements CF₂ voient, l'un après l'autre, leurs degrés de liberté augmenter.¹⁰³ Ce comportement a pour conséquence d'étaler le pic de fusion sur une large gamme de température. D'autre part, les faibles enthalpies mesurées peuvent s'expliquer par la faible cohésion de l'organisation moléculaire due à la présence des segments fluorés. En effet, comme on l'a déjà dit à plusieurs reprises, les chaînes fluorées

présentent une faible énergie de cohésion, et de faibles apports en énergie sont donc nécessaires pour perturber l'organisation moléculaire.

Échantillons hydratés

Comme on l'a vu plus haut, lorsqu'ils sont chauffés, les phospholipides ne subissent pas un processus de fusion simple, les menant d'un état solide à un état liquide. Le phénomène observé est beaucoup plus complexe et passe par une ou plusieurs phases liquides cristallines et/ou formes mésomorphes intermédiaires qui dépendent de la quantité d'eau présente dans l'échantillon. Pour la DSPC, par exemple, l'addition progressive d'eau abaisse la température à laquelle a lieu la transition de phase principale avec un effet qui atteint un plateau pour une teneur en eau de 20 % (en poids). Celle-ci passe ainsi d'environ 85 °C à 62 °C, soit une baisse de plus de 20 °C.¹⁰⁴ Force est de constater que, dans la littérature, en matière d'étude du comportement thermodynamique de lipides, on rencontre de sensibles variations dans la façon de préparer les échantillons, notamment en ce qui concerne leur taux d'hydratation,¹⁰⁵ d'où les difficultés qu'on peut avoir à comparer différents résultats. Pour notre part, nous avons pris le parti d'étudier des échantillons contenant 10 % de lipide et 90 % d'eau, ce qui devrait nous garantir une relevance des mesures effectuées par DSC, par rapport au comportement des liposomes que nous aurons à caractériser.

La température de transition de phase mesurée pour C₁₀F₆-PC est de 49,5°C. Le composé DF₆C₁₁O-PC, qui contient 11 groupes méthylène et un segment perfluorohexyl en bout de chaîne, présente une température de transition de phase de 50,5°C.⁸⁹ si nous visualisons la même transition de phase alors, la position du segment fluoré à l'une ou l'autre extrémité de la chaîne (en bout pour DF₆C₁₁O-PC et à proximité de la tête polaire pour C₁₀F₆-PC) ne semble donc influencer que très peu la température de transition de phase. Par contre, en comparant C₆F₆-PG et C₅F₆β-PG, on s'aperçoit qu'il y a un écart de 7 °C entre les températures de transition. Ceci indique que le fait de fragmenter le segment lipophile (par insertion du segment fluoré) entraîne un effet non négligeable sur la température de fusion du composé.

En série PG, la température de transition de phase diminue lorsque la longueur de la chaîne augmente (en considérant la règle d'équivalence 1 CF₂ = 1,5 CH₂). En effet la diminution du potentiel de forces hydrophobe va entraîner une diminution des interactions cohésives entre les chaînes grasses et donc une diminution de la température de transition de phase.

La présence d'une insaturation dans les chaînes engendre une diminution de la température de transition de phase dans le cas de C₁₀F₆-PC (49,5 C°) et C₁₀F_{6i}-PC (34,4 C°). Ceci est tout à fait cohérent, dans la mesure où une insaturation dans la chaîne est supposée introduire du désordre au sein d'une structure lamellaire.

En comparant les résultats obtenus pour les composés C₁₀F₆-PC (49,5 °C) et C₁₀F₆-PG (62,5 °C), d'une part, et C₅F₆β-PC (21,75 °C) et C₅F₆β-PG (28,4°C), d'autre part, il apparaît

que, dans ces deux cas, la tête polaire PG entraîne une augmentation significative de la température de transition de phase avec une diminution de l'enthalpie de transition. Cependant, l'échantillon C₁₀F₆-PC étant pollué par C₁₀F_{6i}-PC (11 %, *vide infra*) cette conclusion doit être relativisée.

Pour les composés ne présentant pas de pic de transition en solution dans la gamme de température explorée, plusieurs cas de figures peuvent être envisagés. Le composé peut être complètement dissout dans quel cas aucune organisation moléculaire ne persiste. Le composé peut également être dans une phase liquide cristalline avec une transition de phase vers une phase cristalline en dessous de 0°C. Il est également possible que le composé soit dans une phase L_c (lamellaire cristalline) et que la transition principale soit au-dessus de 85°C. Une dernière hypothèse serait qu'une transition ait lieu mais que la faible énergie associée à cette transition soit en dessous du seuil de détection de l'appareil.

Pour les composés présentant une transition de phase, plusieurs cas de figures sont également envisageables. Cette transition pourrait bien être associée à une transition principale P_β→L_α. Elle pourrait également être associée à un passage cristal-liquide (1) vers cristal-liquide (2), ou encore à une dissolution du composé.

Échantillons secs

Pour les composés ne présentant pas de pics de transition détectable dans la gamme de température explorée, plusieurs cas de figure peuvent être envisagés : 1) les composés sont effectivement organisés mais présentent une transition de phase au-delà de +85 °C ; 2) les composés sont amorphes et présentent un point de cristallisation en dessous de -20 °C ; 3) la transition de phase étant peu énergétique et étalée sur une gamme de température large, elle devient difficilement détectable et l'appareillage utilisé se serait trouvé en défaut de sensibilité. Des observations en lumière polarisée et des expériences de diffraction de rayons X nous permettront de valider ou d'écarter cette hypothèse (*vide infra*).

Dans la série de composés étudiés, la présence ou non de transition, la température à laquelle elles ont lieu et leur enthalpie dépendent fortement de la nature de la tête polaire et de la structure des chaînes carbonées (notamment de la présence ou non d'insaturations). Dans la série C_nF₆-PG (n =0, 6, 10), la chaîne carbonée linéaire entraîne l'apparition d'une transition de phase. Plus la chaîne carbonée est longue, plus la température de transition et l'enthalpie de la transformation augmentent. Ceci peut être la conséquence d'une meilleure organisation moléculaire des chaînes carbonées en C₁₀. Cette tendance est également observée avec les composés C₁₀F₆-PC et C₆F₆-PC.

Comme dans le cas des échantillons hydratés, l'introduction d'une insaturation dans la chaîne fluorée a pour conséquence une baisse de la température de transition. On observe ainsi une diminution de 50,5 à 16,9 °C pour les composés C₁₀F₆-PC et C₁₀F_{6i}-PC (resp.), et une disparition de la transition pour C₆F_{6i}-PC, transition qui a probablement lieu en-dessous de la gamme de température explorée.

L'effet de la tête polaire sur les transitions est difficile à évaluer puisque l'on observe une diminution de la valeur de la température de transition de phase en passant d'une tête PC à une tête PG pour les composés présentant une chaîne $C_{10}F_6$ alors qu'on relève une augmentation pour les composés présentant une chaîne C_6F_6 . Néanmoins, au regard des valeurs d'enthalpie plus faibles observées pour les composés PG, il semblerait qu'une tête PG déstabilise l'organisation moléculaire par rapport à une tête PC.

L'introduction de chaînes carbonées ramifiées se traduit par l'absence de transition de phase dans la gamme de température explorée, que ce soit pour les échantillons secs ou hydratés.

Les mesures sur échantillons hydratés se sont révélées, dans certain cas, proches des mesures sur échantillons secs et, dans d'autres, assez éloignées ($C_{10}F_6$ -PC et $C_{10}F_{6i}$ -PC).

En général, les composés présentant des transitions de phases sur échantillon sec en présentent également en phase hydratée à l'exception de deux lipides, C_6F_6 -PC et $C_{10}F_4$ -PG, qui présentent respectivement uniquement une transition de phase en solide et uniquement en solution.

La présence d'eau dans les lipides entraîne généralement une diminution de la température de transition de phase principale d'environ 20 °C, l'eau ayant pour effet de diminuer les interactions cohésives au sein de la phase lamellaire.¹⁰⁵ Cependant, avec tous nos échantillons, nous observons l'inverse, avec des écarts pouvant aller jusqu'à 20 °C entre les échantillons hydratés et secs ($C_{10}F_{6i}$ -PC et $C_{10}F_6$ -PG).

L'énergie dégagée lors des transitions en phases solides est moins importante qu'en phase liquide (à l'exception du composé $C_{10}F_6$ -PC).

Loin de répondre à toutes nos questions, la comparaison des propriétés thermiques de nos composés sous forme sèche et hydratée fait apparaître des différences qui vont à l'encontre de ce qui est connu pour des lipides de structure plus « classique ». À ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'en fournir une explication et des travaux complémentaires seront sans doute nécessaires (vérification de la pureté des échantillons et de leur stabilité thermique...). Les mesures par calorimétrie différentielle à balayage nous ont cependant permis, dans certains cas, de mettre en évidence la présence de différentes phases. Plusieurs changements d'état peuvent être impliqués : cristal à cristal liquide, cristal liquide à cristal liquide, ou cristal liquide à liquide isotrope. Les mesures de DSC seules ne permettent pas de déterminer la nature des transitions observées. Aussi, afin de mieux caractériser ces dernières, des études par microscopie en lumière polarisée (POM) ont été entreprises.

Les études de POM et de diffraction de rayon X étant plus faciles à mettre en œuvre dans le cas d'échantillons secs, nous nous sommes contentés dans un premier temps d'étudier les lipides à l'état sec. Les résultats obtenus sur les échantillons secs, nous permettront ensuite de tenter d'attribuer les transitions détectés sur les échantillons hydratés.

2.3.3 Microscopie en lumière polarisée

Principe de la méthode

Cette méthode fournit un moyen visuel de caractérisation des transitions de phase d'un matériau et permet d'obtenir des informations sur son organisation. La technique fait appel à l'utilisation d'un système polariseur-analyseur croisés, c'est à dire constitué de deux polariseurs dont les plans de polarisation sont disposés perpendiculairement l'un à l'autre (Figure 3.14). En conditions normales, aucune lumière n'émerge du système car la lumière polarisée transmise par le premier polariseur est complètement éteinte par le second. L'insertion d'un matériau isotrope entre les polariseurs ne change rien puisque la polarisation de la lumière est inchangée lors de la traversée d'un tel milieu. Par contre, si un milieu anisotrope est disposé sur le passage du faisceau entre les deux polariseurs, il modifie la polarisation de ce dernier et de la lumière émerge du second polariseur.

On décrit par le terme de texture, l'aspect d'un matériau à l'échelle macroscopique. L'étude de la texture d'un matériau peut être effectuée en lumière polarisée. Lorsqu'un cristal liquide présentant un domaine organisé homogène (c'est à dire non constitué de plusieurs microdomaines possédant des orientations différentes) est placé entre un polariseur et un analyseur, on observe une texture uniforme, claire ou sombre selon l'orientation du domaine par rapport aux polariseurs. La texture observée résulte ainsi de l'existence de défauts topologiques dans les mésophases, défauts qui se traduisent par la présence de plusieurs domaines qui possèdent des orientations différentes au sein du matériau. L'analyse des textures et plus particulièrement des défauts (lignes de déclinaison, conique focale) donne des informations sur la symétrie de la phase dans laquelle se trouve le matériau.

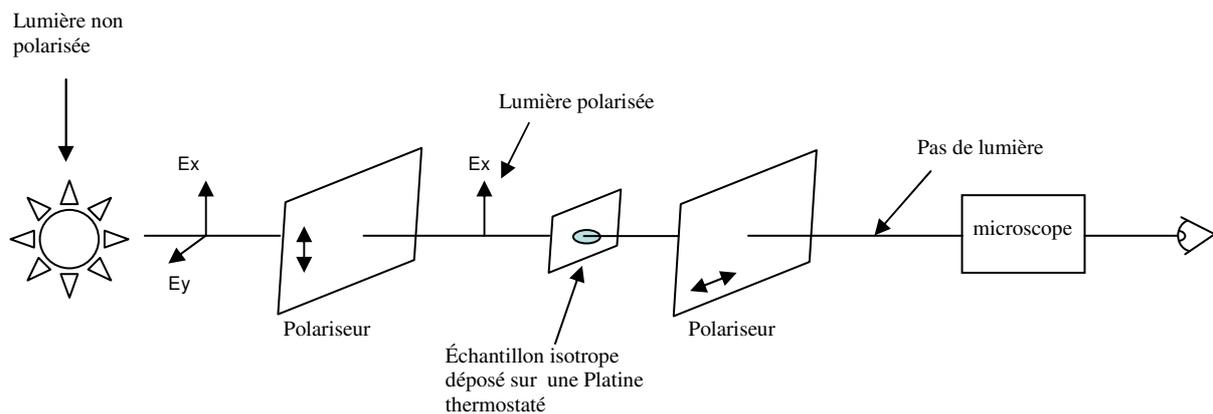


Figure 3.12. Représentation schématique d'un microscope à lumière polarisée.

Lorsque l'échantillon est placé sur une platine chauffante entre les deux polariseurs, il peut être observé à différentes températures (Figure 3.12.). Il est ainsi possible de l'étudier en-dessous et au-dessus de sa température de transition de phase. Un point d'isotropisation est

relativement facile à détecter avec cette technique. En effet, la transition correspondante se traduit par une perte de la biréfringence et donc de la luminosité de l'échantillon au-dessus de la température de transition. Selon l'aspect du matériau observé et sa viscosité, il est possible de déterminer s'il se présente sous la forme d'une poudre, d'un gel ou d'un fluide. Comme on l'a vu plus haut, la texture d'un matériau caractérise l'arrangement des molécules entre-elles à l'échelle macroscopique et certaines phases possèdent des textures caractéristiques qu'il est possible de distinguer au microscope optique polarisé. En effet, la biréfringence associée à une organisation spécifique du matériau peut produire des zones d'extinction caractéristiques. À titre d'exemple, la visualisation d'une croix de Malte est caractéristique d'une phase lamellaire.

Tous les échantillons que nous avons observés au microscope en lumière polarisée apparaissent biréfringents (lumineux) et mous à température ambiante. La biréfringence constatée indique que tous les échantillons présentent une organisation moléculaire à la température d'observation. Les échantillons peuvent également être déformés lorsqu'on appuie sur la lame de verre sur laquelle ils sont déposés, ce qui montre leur caractère fluide. À température ambiante, nous avons donc des matériaux fluides et organisés. Ceci signifie, par définition, que ces matériaux sont dans un état cristal liquide. On peut noter que les composés ramifiés apparaissent moins visqueux que les composés à chaînes linéaires. Pour les composés pour lesquels nous n'avons pas observé de transition de phase dans la gamme de température explorée par DSC, aucune texture caractéristique n'est observée et il n'est pas possible de déterminer la symétrie de la phase cristal liquide. Nous pouvons donc bien affirmer qu'ils sont en phase cristal liquide et qu'ils ne présentent pas de changement d'état entre -20 et +85 °C.

Les composés présentant une transition de phase identifiable en DSC ont été observés en-dessous et au-dessus de la température de transition de phase. Les observations effectuées montrent que les matériaux sont biréfringents de part et d'autre de la température de transition de phase. La transition observée n'est donc pas liée à une isotropisation du système. Les matériaux conservent également un aspect fluide de part et d'autre de la transition ce qui signifie que nous sommes en présence d'une transition de type cristal liquide à cristal liquide (Figure 3.13). Malheureusement, aucune texture caractéristique n'a pu être observée (ligne de déclinaison, croix de Malte...) ce qui empêche tout assignement du type de phase observée, que ce soit en-dessous ou au-dessus de la température de transition. Pour cela, nous avons entrepris des études par diffraction des rayons X aux petits angles.

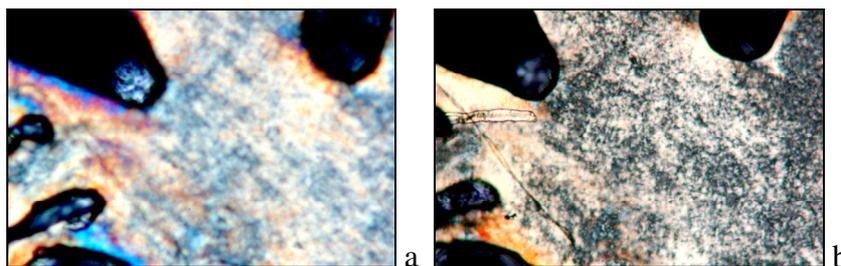


Figure 3.13. Clichés de microscopie optique en lumière polarisée du composé $C_{10}F_6$ -PC à $+30\text{ °C}$ (a) et $+85\text{ °C}$ (b). La température de transition de phase de $+50,5\text{ °C}$ a été déterminée par DSC.

2.3.4 Diffraction de rayons X

Principe de base

Le principe général de la méthode consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X et à regarder l'orientation des rayons X diffusés dans l'espace. Les rayons X diffusés interférant entre eux, leur intensité présente des maxima dans certaines directions : on parle de phénomène de « diffraction ». On enregistre l'intensité du faisceau diffracté en fonction de son angle de déviation 2θ ("deux-thêta"). Un exemple de diffractogramme est présenté ci-dessous (Figure 3.14).

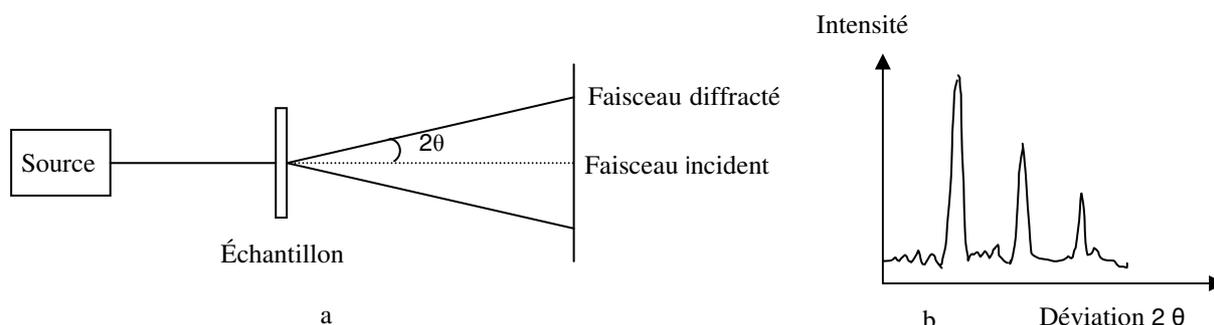


Figure 3.14. Représentation schématique du comportement des rayons X diffractés par un échantillon (a). Le diffractogramme représente l'intensité du faisceau diffracté en fonction de l'angle de déviation 2θ (b).

La source de rayons X est un tube sous vide, ou « tube de Coolidge », muni d'un dispositif permettant de ne sélectionner qu'une seule longueur d'onde (filtre, monochromateur). Si le faisceau de rayons X qui éclaire l'échantillon est ponctuel (ou tout du moins est un fin cylindre), il y a alors une symétrie de révolution autour de l'axe du faisceau. Les rayons diffractés forment donc des cônes dont l'axe est le faisceau incident. Dans le cas d'une chambre de Debye-Scherrer, les anneaux de Debye qui impriment le film sont les traces de ces cônes.

Loi de Bragg

Si l'on calcule les directions dans lesquelles on a du signal, on s'aperçoit qu'elles répondent à une loi très simple dite de Bragg : si l'on trace des plans imaginaires parallèles

passant par les atomes, et si l'on appelle d la distance entre ces plans (ou « distance interréticulaire »), alors les interférences sont constructives si :

$$2.d.\sin\theta = n.\lambda$$

où θ est la moitié de l'angle de déviation, n est un nombre entier appelé « ordre de diffraction », et λ est la longueur d'onde des rayons X.

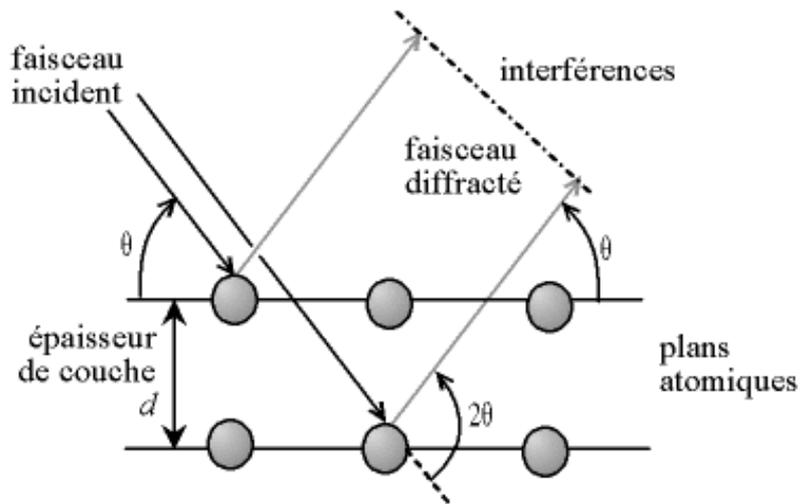


Figure 3.15. Illustration de la loi de Bragg donnant les directions où les interférences sont constructives.

Par la loi de Bragg, on peut donc associer chaque pic à des plans atomiques imaginaires. Ces plans peuvent être désignés par des indices dits de Miller (hkl avec h , k et l étant des nombres entiers) et on peut associer ces indices aux pics de diffraction. On parle alors « d'indexation des pics ».

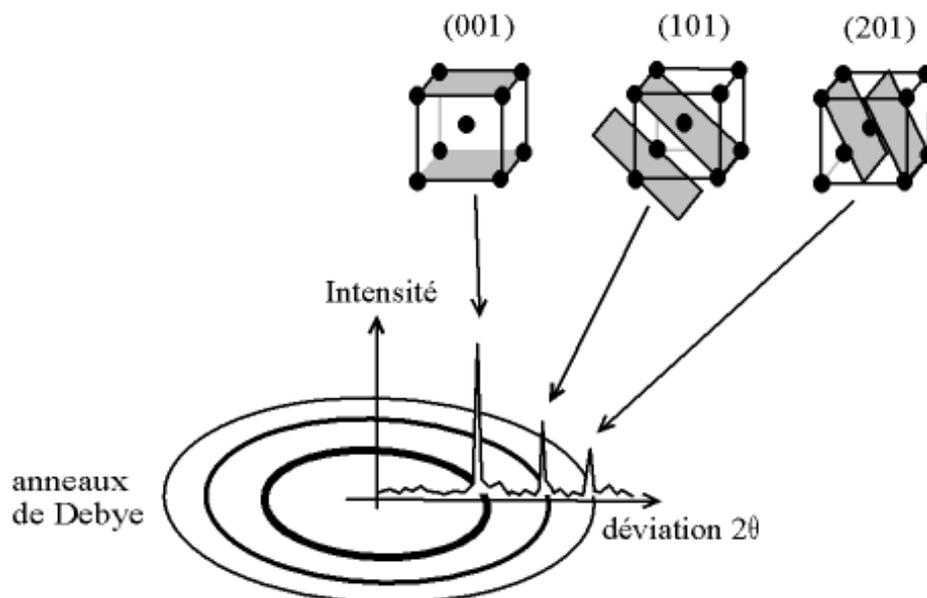


Figure 3.16. Indexation des pics de diffraction : association d'un pic de diffraction et d'un plan (hkl) .

D'après la loi de Bragg , il y a une relation unique entre la déviation 2θ et la distance interréticulaire d (si l'on ne considère que le premier ordre de diffraction, $n = 1$). Un pic est présent en 2θ s'il existe, dans le cristal, des plans atomiques parallèles espacés d'une distance $d = \lambda/(2.\sin\theta)$.

Un milieu cristallin est constitué d'un ensemble d'atomes organisés dans les trois directions de l'espace. Les réseaux atomiques (réseaux de Bravais) peuvent être construits à partir de sept types de mailles différentes (Tableau 3.5).

Systeme	
Cubique	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b, c$ quelconques; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Orthorhombique	a, b, c quelconques; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal et trigonal (P)	$a = b, c$ quelconques; $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Trigonal	$a = b, c$ quelconques; $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ (ou $a = b = c, \alpha = \beta = \gamma$)
Monoclinique	a, b, c, β quelconques; $\alpha, \gamma = 90^\circ$
Triclinique	$a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ quelconques

Tableau 3.5. Classification des réseaux de Bravais en fonction d'un choix pour des vecteurs de bases.

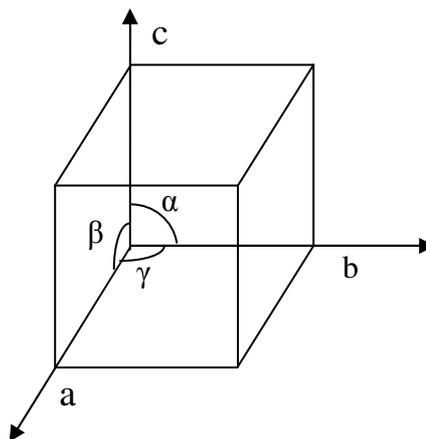


Figure 3.17. Représentation d'une maille cubique.

Les paramètres a, b, c et α, β et γ sont nécessaires pour caractériser le réseau. Les trois premiers sont les modules des vecteurs de translations élémentaires au sein du réseau et sont appelés « paramètres linéaires ». Les angles α, β et γ sont respectifs des directions des

vecteurs et sont appelés « paramètres angulaires ». Il existe des relations mathématiques permettant de relier les distances interréticulaires (mesurées par diffraction des rayons X dans l'espace réciproque associé à une famille de plan (h,k,l)) aux paramètres de maille de l'espace direct. Pour chaque système cristallin, les relations sont données dans le tableau 3.6.

Système	$\frac{1}{d_{hkl}^2}$
Cubique	$\frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$
Tétragonal	$\frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Orthorhombique	$\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Hexagonal et trigonal (P)	$\frac{4}{3a^2}(h^2 + k^2 + hk) + \frac{l^2}{c^2}$
Trigonal	$\frac{1}{a^2} + \left(\frac{(h^2 + k^2 + hk)\sin^2 \alpha + 2(hk + hl + kl)(\cos^2 \alpha - \cos \alpha)}{1 + 2\cos^3 \alpha - 3\cos^2 \alpha} \right)$
Monoclinique	$\frac{h^2}{a^2 \sin^2 \beta} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2 \sin^2 \beta} - \frac{2hl \cos \beta}{ac \sin^2 \beta}$
Triclinique	$(1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta + 2\cos \alpha \cos \beta \cos \gamma)^{-1} \left(\frac{h^2}{a^2} \sin^2 \alpha + \frac{k^2}{b^2} \sin^2 \beta + \frac{l^2}{c^2} \sin^2 \gamma + \frac{2kl}{bc} (\cos \beta \cos \gamma - \cos \alpha) + \frac{2lh}{ca} (\cos \gamma \cos \alpha - \cos \beta) + \frac{2hk}{ab} (\cos \alpha \cos \beta - \cos \gamma) \right)$

Tableau 3.6. Expression algébrique de $1/d_{hkl}^2$ pour différents systèmes cristallins, d_{hkl} étant la distance interréticulaire.

Dans le cas des cristaux liquides, on a affaire à des systèmes plus simples, à 1 ou 2 dimensions. Tout comme dans un cristal, les réseaux d'objets présents au sein d'une phase cristal liquide peuvent être décrits par une maille cristallographique (de plus faible dimensionnalité). Parmi les phases cristal liquide, les phases smectiques ou « phases lamellaires », ainsi que les phases de symétrie hexagonale sont couramment observées. Nous nous attacherons ici à ne décrire que l'indexation de ces deux phases.

Phase smectique

Une phase lamellaire ou smectique peut être décrite comme étant formée par un empilement, selon la direction cristallographique \vec{c} , de feuillettes de dimensions infinies selon

les directions \vec{a} et \vec{b} . Si on considère une maille orthorhombique dans laquelle a et b sont infinis et c fini, on aboutit à la relation simple :

$$\frac{1}{d^2_{hkl}} = \frac{l^2}{c^2}$$

avec $l = 1, 2, 3, 4, 5 \dots$

d'où
$$d = \frac{c}{l}$$

Ceci signifie que l'on observera sur le diagramme de diffraction des pics correspondant à des distances $c, c/2, c/3, c/4, c/5 \dots$ où d est la distance réticulaire entre les feuillettes d'atomes ou de molécules constituant la phase smectique et est égale à la distance c entre les feuillettes dans l'espace direct. Le diagramme de diffraction d'une phase lamellaire sera donc caractérisé par une série de pics dans des rapports $d, d/2, d/3, d/4 \dots$

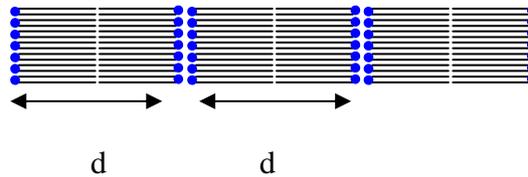


Figure 3.18. Schéma d'une phase lamellaire formée par des bicouches.

Phase hexagonale

Une phase hexagonale cristal liquide peut être décrite comme étant formée par des cylindres (rangées d'atomes ou de molécules) de dimension infinie selon \vec{c} et organisés selon \vec{a} et \vec{b} en réseau de symétrie hexagonale. On parle alors de phase hexagonale 2D. Si on reprend la relation entre d_{hkl} et a, b, c pour une phase hexagonale, on obtient donc :

$$\frac{1}{d^2_{hkl}} = \frac{4}{3a^2} (h^2 + k^2 + hk)$$

avec l considéré comme infini, les différentes valeurs pouvant être prises pour h et k étant les suivantes :

- $h = 1$ et $k = 0$ (équivalent à $k = 1$ et $h = 0$ car $a = b$ en symétrie hexagonale) ;
- $h = 1$ et $k = 1$;
- $h = 2$ et $k = 0$ équivalent à $k = 2$ et $h = 0$;
- $h = 2$ et $k = 1$ équivalent à $k = 2$ et $h = 1$;
- $h = 2$ et $k = 2$;
- etc...

Les valeurs possibles pour d sont donc :

$$d_{hkl} = \frac{\sqrt{3}a^{(10)}}{2}, \frac{a^{(11)}}{2}, \frac{\sqrt{3}a^{(20)}}{4}, \frac{\sqrt{3}a^{(21)}}{\sqrt{7}} \dots$$

ce qui signifie que, sur le diagramme de diffraction, nous aurons des pics dans des rapports :

$$\frac{d_{(10)}}{d_{(10)}} = 1, \quad \frac{d_{(10)}}{d_{(11)}} = \sqrt{3}, \quad \frac{d_{(10)}}{d_{(20)}} = 2, \quad \frac{d_{(10)}}{d_{(21)}} = \sqrt{7} \dots$$

Donc, si on observe sur le diffractogramme une série de pics pour des valeurs de 2θ qui suivent la série $1, \sqrt{3}, 2, \sqrt{7} \dots$ par rapport au pic de plus grande distance interréticulaire, nous serons en présence d'une phase hexagonale 2D (Figure 3.19). Dans le cas d'une telle phase, la distance interréticulaire d ne donne pas directement le paramètre de la maille. Ce dernier est calculé par l'équation suivante :

$$a = \frac{2d}{\sqrt{3}}$$

où a est le paramètre de la maille et L est la longueur d'une molécule.

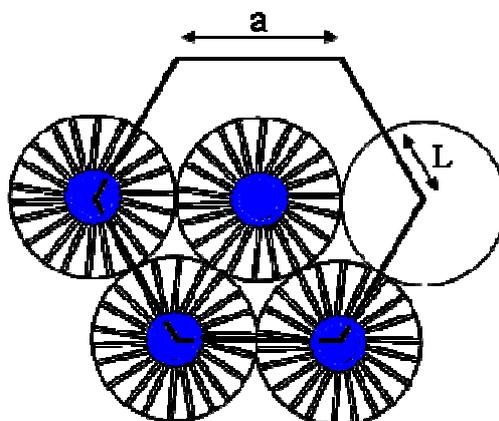


Figure 3.19. Schéma d'une phase hexagonale H_{II} .

Dans le cas de composés amphiphiles, les têtes polaires peuvent se placer à l'extérieur des cylindres. On parle alors de phase H_u ou hexagonale directe. Elles peuvent également se placer au centre des cylindres (Figure 3.19.) et on dit alors que l'on est en présence d'une phase H_{II} ou hexagonale inverse.

Expériences et résultats

Nous avons sélectionné deux composés pour effectuer des expériences de diffraction de rayons X. Le premier, $C_{10}F_6$ -PC, présente une transition de phase visible en DSC alors que le second, $C_{8R}F_6$ -PG, n'en présente pas.

Cas de $C_{10}F_6$ -PC

Le diffractogramme obtenu à $+20^\circ\text{C}$ est présenté ci-dessous (Figure 3.20.). L'indexation des pics de diffraction est indiquée dans le tableau 3.7.

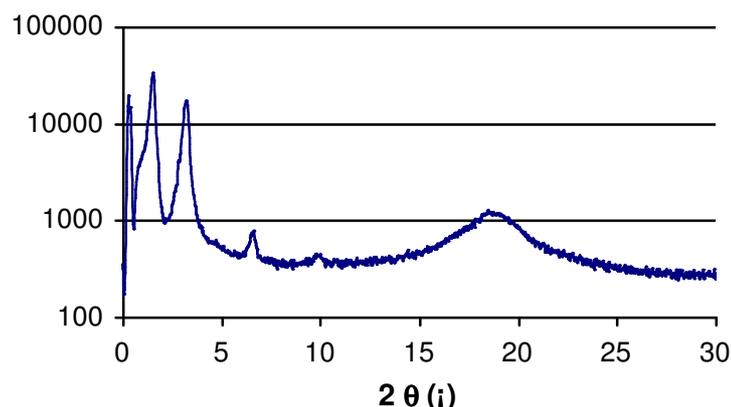


Figure 3.20. . Diffractogramme obtenu avec le composé C₁₀F₆-PC à +20 °C.

2θ (°)	θ (°)	d (Å)	d ₀₀₁ /d ₀₀₁ ou d ₁₀ /d _{hk}	Rapport	Indexation 00l ou kk
9,822	4,911	8,99446484	6,109312892	6	006
6,672	3,336	13,2322203	4,152742217	4	004
4,7572	2,3786	18,5531091	2,961767747	3	003
3,255	1,6275	27,1113263	2,026828174	2	002
1,576	0,788	55,9887577	0,981447031	1	001

Tableau 3.7. Indexation des pics visualisés sur le diffractogramme du composé C₁₀F₆-PC à +20 °C.

Le spectre de diffraction de C₁₀F₆-PC à +20 °C est caractéristique d'une phase cristal liquide. Le pic large et diffus à 18,8 ° est caractéristique de l'état fondu et désorganisé des chaînes hydrocarbonées et fluorocarbonées. Il indique qu'il existe du désordre et sa position correspond à la distance moyenne (d_{ic}) entre les chaînes. Cette distance moyenne séparant deux chaînes hémifluorées, que l'on notera ici d_1 , est donnée par la loi de Bragg ($d = \lambda/2\sin\theta$) et vaut 4,71 Å. La distance moyenne entre deux chaînes alkyle est en général de l'ordre de 4,5 Å. Une valeur de 4,71 Å met donc en évidence que le fluor induit un encombrement au niveau des chaînes qui se trouvent plus espacées entre elles.

Les pics fins aux petits angles montrent qu'il existe un ordre entre de gros objets. On a donc une organisation d'objets moléculaires au sein d'un milieu fluide. Ceci confirme la nature cristal liquide du matériau. Les valeurs de 2θ pour les pics aux petits angles suivent une progression selon la série $d, d/2, d/3, d/4, d/5...$ et constituent la signature d'une phase lamellaire ou smectique. La distance d entre les feuillettes et qui correspond au premier pic de diffraction est de 55,98 Å. La longueur L de la structure étendue de C₁₀F₆-PC peut être estimée approximativement à 30 Å (cette valeur est obtenue en mesurant la distance séparant les deux extrémités de la forme étendue de la molécule présentant des chaînes en conformation tout-*trans*, Chem 3D-Ultra, Cambridge Software). Cette valeur est légèrement

supérieure à la moitié de la distance mesurée entre feuillets (d) (Figure 3.21). Ceci peut s'expliquer par la formation d'une phase smectique au sein de laquelle les chaînes carbonées s'interdigitent légèrement (phase smectique A), ou encore par la formation d'une phase où les molécules sont penchées au sein des couches (phase smectique C). L'absence de texture caractéristique ne nous permet pas de trancher pour l'une ou l'autre hypothèse.

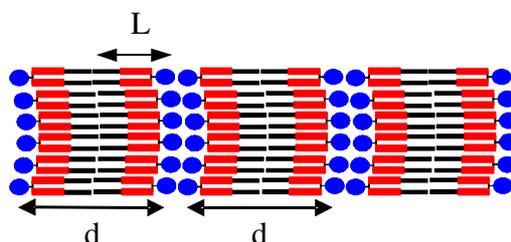


Figure 3.21. Schéma d'une phase lamellaire formée par une bicouche de molécules hémifluorées.

Le diffractogramme du composé $C_{10}F_6$ -PC a également été enregistré à $+70^\circ C$ (Figure 3.22) et l'indexation des pics est présentée dans le tableau 3.8.

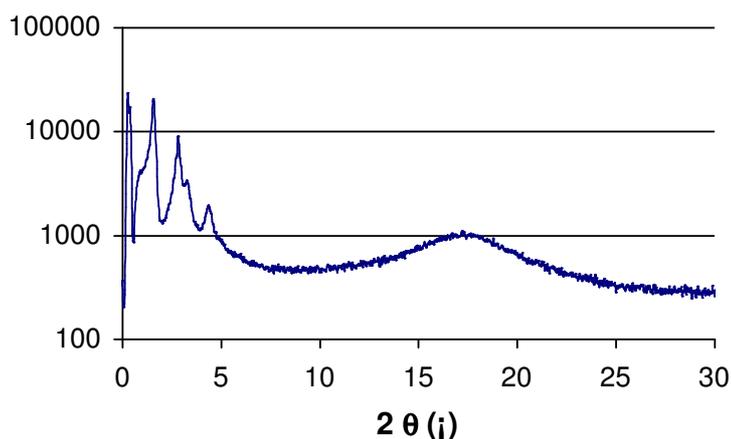


Figure 3.22. Diffractogramme du composé $C_{10}F_6$ -PC à $+70^\circ C$.

2θ ($^\circ$)	θ ($^\circ$)	d (\AA)	d_{001}/d_{00l} ou d_{10}/d_{hk}	rapport	Indexation 00l ou kk
4,404	2,202	20,0402419	2,741982872	$\sqrt{7}$	21
3,285	1,6425	26,8638012	2,045503524	2	20
2,873	1,4365	30,7151915	1,78901701	$\sqrt{3}$	11
1,606	0,803	54,9429571	1,000128186	1	10

Tableau 3.8. Indexation des pics visualisés sur le diffractogramme du composé $C_{10}F_6$ -PC à $70^\circ C$.

À cette température, nous n'observons pas les mêmes pics qu'à $+20^\circ C$. Certains pics ont disparu et d'autres sont apparus. Le caractère de cristal liquide est néanmoins conservé.

Un halo diffus vers $17,4^\circ$ atteste du caractère fluide de l'échantillon et des pics à des angles plus faibles sont caractéristiques d'un réseau ordonné. La distance séparant les chaînes grasses notée d_1 est passée de $4,71 \text{ \AA}$ à $5,08 \text{ \AA}$. Cet écartement est dû à l'agitation des chaînes grasses engendrée par l'augmentation de la température. Les valeurs de 2θ pour les pics aux petits angles suivent la progression caractéristique d'une phase hexagonale ($d, d/\sqrt{3}, d/2, d/\sqrt{7} \dots$ *vide supra*) (Figure 3.23). La distance interréticulaire d (qui correspond au premier pic de diffraction) est de $54,94 \text{ \AA}$, ce qui donne une valeur de paramètre de maille a de $63,45 \text{ \AA}$ ($a = 2d/\sqrt{3}$, *vide supra*).

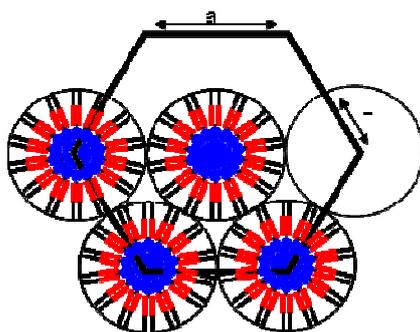


Figure 3.23. Schéma d'une phase hexagonale H_2 formée par des phospholipides hémifluorés (a est le paramètre de maille et L la longueur d'une molécule). Ce schéma représente une phase hexagonale inverse mais elle pourrait tout aussi bien être directe.

Considérons que l'épaisseur d'une maille cristalline est égale à la distance moyenne entre les chaînes grasses d_1 , l'aire de la maille étant égale à $3.486,63 \text{ \AA}^2$ ($a^2 \cdot \sin 60$), son volume est de 17.712 \AA^3 ($5,08 \times 3.486,63$). Considérant une valeur de densité égale à 1 pour $C_{10}F_6$ -PC. Cette valeur est couramment utilisée pour les cristaux liquides thermotropes. Ici, elle est arbitraire et certainement largement sous-estimée avec nos lipides fluorés. Cependant, le but *in fine* étant de comparer deux modèles établis à partir d'une même valeur de densité, cette approximation n'aura donc que peu d'impact sur nos conclusions. Le volume d'une molécule étant donné par la relation :

$$V_{\text{mol}} = \text{masse molaire} / 0,6022 = 2070 \text{ \AA}^3$$

On peut calculer qu'une maille contient entre 8 et 9 molécules.

Les expériences de diffraction de rayons X ont montré que le composé $C_{10}F_6$ -PC forme une phase lamellaire à $+20^\circ \text{C}$ et que, au-dessus de la température de transition détectée par DSC ($50,5^\circ \text{C}$), il se trouve dans une phase hexagonale. La transition observée correspond donc à une transition cristal liquide smectique à cristal liquide hexagonal. Dans la gamme de température explorée (-20°C à $+85^\circ \text{C}$), le composé est donc ordonné et présente uniquement ces deux types de phases cristal liquide. La transition de phase est réversible puisque, après refroidissement de la phase cristal liquide hexagonale à $+20^\circ \text{C}$, on réobtient une phase

lamellaire. Les transitions cristal liquide à cristal liquide étant généralement peu énergétiques, cela explique la faible variation d'enthalpie mesurée au cours de la transition, lors des expériences de DSC.

Cas de $C_{8R}F_6$ -PG

Le diffractogramme obtenu pour ce composé à +20 °C est présenté ci-dessous (Figure 3.24). L'indexation des pics de diffraction est indiquée dans le tableau 3.9.

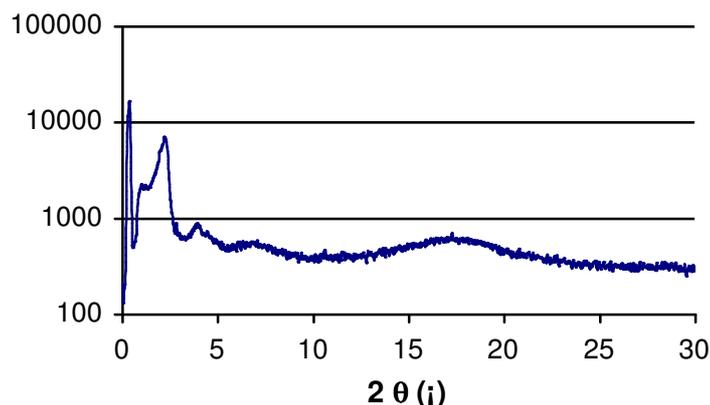


Figure 3.24. Diffractogramme du composé $C_{8R}F_6$ -PG enregistré à 20 °C.

2θ (°)	θ (°)	d (Å)	d_{001}/d_{001} ou d_{10}/dhk	rapport	Indexation 001 ou hk
7,15799	3,578995	12,3348744	3,1129867	3	30
4,50735	2,253675	19,5809638	1,961001534	2	20
3,97715	1,988575	22,1900651	1,730427549	$\sqrt{3}$	11
2,29805	1,149025	38,3983878	0,999997714	1	10

Tableau 3.9. Indexation des pics de diffraction visualisés sur le diffractogramme de $C_{8R}F_6$ -PG à +20 °C.

On peut noter que le diffractogramme obtenu pour ce deuxième échantillon est beaucoup moins bien résolu que le précédent. Cela traduit un caractère moins ordonné de la matière. On observe en outre une bande diffuse caractéristique d'un état liquide à 17,8 °. En calculant comme précédemment la distance moyenne entre les chaînes, on obtient pour d_1 une valeur de 4,98 Å. Cette valeur est supérieure à celle mesurée pour $C_{10}F_6$ -PC à la même température et rend compte des contraintes stériques imposées par la présence d'une ramification dans les chaînes grasses de la molécule. Les valeurs de 2θ pour les pics aux petits angles suivent une progression selon la série $d, d/\sqrt{3}, d/2, d/\sqrt{7}, \dots$, caractéristique d'une phase hexagonale. Comme précédemment, le paramètre de maille a est calculé par la relation « $a = 2d/\sqrt{3}$ », ce qui donne une valeur de 44,33 Å.

La longueur L des molécules étant estimée à 20 \AA (valeur obtenue comme précédemment, en mesurant la distance séparant les deux extrémités de la forme étendue de la molécule avec des chaînes en conformation tout-*trans*, Chem 3D-Ultra, Cambridge Software), l'aire de la maille est de $1.701,86 \text{ \AA}^2$ (soit $a^2 \cdot \sin 60$). Ceci permet d'évaluer le volume de cette dernière à 8.475 \AA^3 (soit $1.701,86 \times 4,98$) et conduit à estimer qu'elle est occupée par 4,3 molécules (en considérant la même valeur de la densité que dans le cas précédent).

Les mêmes mesures, réalisées à $+70 \text{ }^\circ\text{C}$, ont conduit au diffractogramme présenté à la figure 3.25 et à l'indexation des pics correspondants (Tableau 3.10).

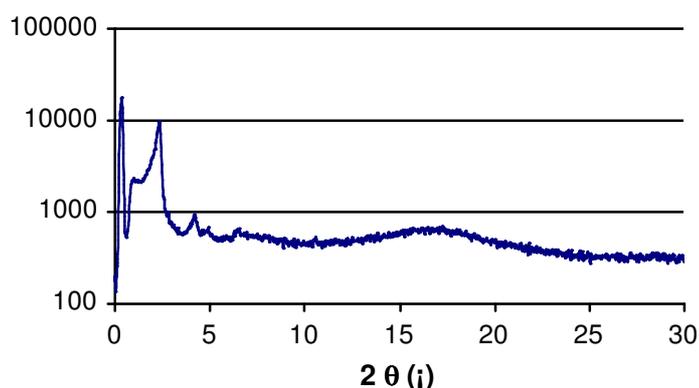


Figure 3.25. Diffractogramme obtenu à $+70 \text{ }^\circ\text{C}$ pour le composé $\text{C}_{8\text{R}}\text{F}_6\text{-PG}$.

$2\theta \text{ (}^\circ\text{)}$	$\theta \text{ (}^\circ\text{)}$	$d \text{ (\AA)}$	d_{001}/d_{001} ou d_{10}/d_{hk}	rapport	Indexation 00l ou kk
10,66065	5,330325	8,28869791	4,406747647	4	
6,62795	3,313975	13,3200639	2,742194056	$\sqrt{7}$	21
4,97865	2,489325	17,7283533	2,060326724	2	20
4,30115	2,150575	20,5192152	1,780097325	$\sqrt{3}$	11
2,41585	1,207925	36,5262897	0,999997544	1	10

Tableau 3.10. Indexation des pics de diffraction obtenus à $+70 \text{ }^\circ\text{C}$ pour $\text{C}_{8\text{R}}\text{F}_6\text{-PG}$.

À $+70 \text{ }^\circ\text{C}$, le composé présente les caractéristiques d'un cristal liquide : un halo diffus vers 17 ° et des pics mieux résolus aux plus petits angles. Comme pour le composé $\text{C}_{10}\text{F}_6\text{-PC}$, nous observons que la distance entre les chaînes grasses augmente avec la température. Elle passe de $4,98$ à $5,21 \text{ \AA}$, ce qui est une conséquence normale de l'augmentation de l'agitation thermique des chaînes grasses induite par l'élévation de température. La phase hexagonale est mieux visible à $+70 \text{ }^\circ\text{C}$ et les pics caractéristiques (d , $d/\sqrt{3}$, $d/2$, $d/\sqrt{7}$, $d/4\dots$) sont plus clairement résolus qu'à $+20 \text{ }^\circ\text{C}$ (cf. Figure 3.26). Comme précédemment, le calcul du

paramètre de maille donne $42,17 \text{ \AA}$ pour a ($a = 2d/\sqrt{3}$). Celui-ci a légèrement diminué et, par conséquent, le nombre de molécules par maille a diminué également et s'établit autour de 4,1.

En comparant les données rassemblées pour les deux composés $C_{10}F_6$ -PC et $C_{8R}F_6$ -PG, il apparaît que le composé ramifié s'organise au sein d'une phase hexagonale dont la maille comporte deux fois moins de molécules que celle dans laquelle se trouve le composé linéaire (lorsqu'il est en phase hexagonale également). La géométrie des molécules (leur paramètre d'empilement P , cf. §1.1) est directement liée à ce phénomène et on peut supposer que $P_{\text{ramifiés}} > P_{\text{linéaire}} \geq 1$ (Figure 3.26.).

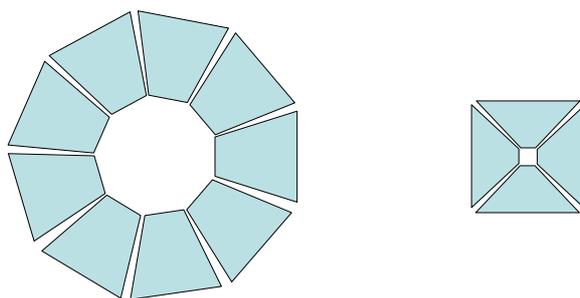


Figure 3.26. Représentation schématique de l'empilement de $C_{10}F_6$ -PC (à gauche) et $C_{8R}F_6$ -PG (à droite) dans la maille hexagonale.

2.3.5 Conclusion

Les études en DSC ont révélé que seuls 7 composés sur les 17 testés présentent une transition de phase visible sur une gamme de température allant de -20 à $+85 \text{ }^\circ\text{C}$ à l'état sec. Ces transitions sont faiblement énergétiques et réversibles. Elles sont caractérisées par une réaction exothermique lors de la chauffe et endothermique lors du refroidissement. Ce sont donc des transitions du 1^{er} ordre associées à une fusion de l'organisation moléculaire, lors du chauffage, et à une réorganisation moléculaire, lors du refroidissement. Pour les phospholipides linéaires, l'augmentation de la longueur de la chaîne se traduit par une augmentation de la température de transition de phase. À l'inverse, l'introduction d'une insaturation dans les chaînes provoque une diminution de cette température. Dans le cas des composés à chaînes ramifiées, aucune transition de phase n'a pu être observée.

Les observations au microscope optique en lumière polarisée ont révélé que l'ensemble des composés testés sont dans un état cristal liquide dans la gamme de température explorée. En effet, tous sont mous et présentent de la biréfringence de -20 à $+85 \text{ }^\circ\text{C}$. Les transitions de phase observées sont donc des transitions de cristal liquide à cristal liquide. Les composés $C_{10}F_4$ -PC, F_6 -PC, $C_{10}F_{4i}$ -PC, et C_6F_{6i} -PC, $C_{10}F_4$, F_6 -PG et les composés ramifiés ne présentent pas de transition de phases

Les études RX effectuées sur le composé $C_{8R}F_6$ -PG ont montré que les composés ramifiés forment des phases colonnaires ou hexagonales dans la gamme de température explorée. En effet la géométrie globale des phospholipides ramifiés semble favoriser la formation de disques qui, en s'empilant les uns sur les autres forment une phase hexagonale. Ces molécules possédant un paramètre d'empilement vraisemblablement supérieur à 1 ne sont a priori, pas propices à former des phases lamellaires. Par extension, nous pouvons supposer que l'ensemble des composés ramifiés ne présentant pas de transition de phase sont dans un état cristal liquide hexagonal sur toute la gamme de température explorée.

Dans le cas des composés présentant des transitions, leur comportement peut être comparé à celui du composé $C_{10}F_6$ -PG. Les études menés sur ce composé ont en effet montré qu'en dessous de la transition détectée par DSC, le composé formait une phase lamellaire cristal-liquide et, au dessus de cette transition, une phase cristal-liquide de type colonnaire hexagonale. Par extension, on peut supposer que tous les composés présentant une transition de phase dans la gamme de température explorée présenteront le même comportement.

Les composés linéaires ne présentant pas de transition de phase sont donc soit dans une phase lamellaire, soit dans une phase hexagonale sur toute la gamme de température. Une dernière hypothèse serait que la transition de phase est trop faiblement énergétique pour être détectée l'appareillage utilisé.

Dans le cas des composés linéaires ne présentant pas de transition de phase, en prenant en compte leur forme allongée et sachant que ces composés sont cristal liquides dans la gamme de température explorée, on peut supposer que nous sommes en présence d'une phase lamellaire. Bien entendu, seules des études en diffraction de rayon X nous permettraient de savoir de manière stricte dans quelle phase cristal liquide ces composés s'auto-assemblent.

En ce qui concerne les échantillons hydratés et au vu des résultats obtenus avec les échantillons secs, on peut supposer que les composés ramifiés ne présentant pas de transition de phase auront tendance à former des phases lyotropes hexagonales sur toute la gamme de température explorée. Les composés ne présentant pas de transition à l'état sec n'en présentent en général pas sous forme hydratée ($C_{10}F_4$ -PC, F_6 -PC, $C_{10}F_{4i}$ -PC C_6F_{6i} -PC et F_6 -PG). On peut supposer qu'ils conservent une organisation lamellaire en présence d'eau. Cependant, une exception est à noter avec le composé $C_{10}F_4$ -PG qui présente une transition de phase en solution mais pas sous forme sèche. L'hydratation de ce composé modifie fortement son comportement thermique. Ce composé présente vraisemblablement deux phases différentes une fois hydraté. N'ayant pas plus d'information, nous ne pouvons pas déterminer ces phases.

Il est clair que des études de diffusion de rayons X sont indispensable à une connaissance exacte du comportement de nos composés en solution. Cette discussion ne pourra être confirmée qu'avec des données de rayon X en solution sur des échantillons homogènes et de concentrations connues.

2.4 Fabrication de liposomes et propriétés

Les expériences de formulation de liposomes ont été effectuées par Miahela Ciobanu et Valérie Machi dans le laboratoire de Chimie Enzymatique et Vectorisation, sous la direction du Dr Benoît Frich.

2.4.1 Mise en place d'un protocole

Pour étudier et comparer nos composés dans des applications de formulation, il a tout d'abord été nécessaire de déterminer un protocole de fabrication de liposomes qui soit adapté aux lipides fluorés. Pour permettre d'évaluer les propriétés des liposomes, il a été décidé de préparer des liposomes encapsulant un marqueur fluorescent à une concentration élevée provoquant une extinction totale de fluorescence. Ainsi, la stabilité des liposomes préparés pourra être évaluée *via* des mesures de fluorescence du milieu en fonction du temps et de la composition de la phase aqueuse (*vide infra*).

Pour des lipides « classiques », la formulation de liposomes est généralement réalisée en hydratant les lipides (25 mM) pendant 30 à 45 minutes, dans une solution tampon de carboxyfluorescéine (100 mM), à une température légèrement audessus de la température de transition de phase gel à cristal liquide (T_m) du lipide. Cette solution est ensuite soumise à sonification, jusqu'à obtention d'une solution translucide. Puis, la solution est laissée au repos pendant 12 heures à température ambiante, afin d'obtenir un système à l'équilibre. Enfin, une filtration sur gel d'exclusion (Sephadex 75) permet de séparer les liposomes du milieu et a pour objet d'éliminer la carboxyfluorescéine non encapsulée.

La formulation de liposomes à partir d'un matériel lipidique fluoré peut nécessiter des conditions particulières. Nous avons donc évalué différents protocoles afin d'identifier celui qui serait le mieux approprié pour l'évaluation de nos composés. Ceux-ci sont résumés ci-dessous.

• Protocole A (classique)

- Évaporation du film lipidique (2,5 μ mol, 50 min) ;
- Addition de carboxyfluorescéine (100 mM, 1 mL), homogénéisation au vortex ;
- Sonification immédiate pendant 50 minutes à température ambiante ;
- Repos (12 h) à température ambiante ;
- Gel filtration sur colonne Sephadex 75.

• Protocole B

- Évaporation du film lipidique (2,5 μ mol, 50 min) ;
- Addition de carboxyfluorescéine (100 mM, 1 mL), homogénéisation au vortex ;
- Sonification immédiate pendant 50 minutes à 45-50 °C ;
- Gel filtration immédiate sur colonne Sephadex 75.

• Protocole C⁸³

- Évaporation du film lipidique (2,5 μ mol, 50 min) ;
- Addition de carboxyfluorescéine (100 mM, 1 mL), homogénéisation au vortex ;
- 5 cycles de congélation/décongélation (azote liquide – température ambiante) ;
- Sonification immédiate pendant 50 minutes à 70°C ;
- Repos (12 h) à température ambiante ;
- Gel filtration sur colonne Sephadex 75.

• Protocole D

- Évaporation du film lipidique (2,5 μ mol, 50 min) ;
- Addition de carboxyfluorescéine (100 mM, 1 mL), homogénéisation au vortex ;
- Sonification immédiate pendant 50 minutes à 70°C ;
- Repos (12 h) à température ambiante ;
- Gel filtration sur colonne Sephadex 75.

Ces différents protocoles ont été évalués avec le composés C₁₀F₆-PC. Pour chacun d'eux, nous avons mesuré la variation de fluorescence du milieu dans le temps. Ceci permet d'évaluer le temps de demi-vie des liposomes dans les conditions testées. En effet, la perte d'intégrité des liposomes se traduit par un relargage de tout ou partie du milieu intra-liposomal. La carboxyfluorescéine qui était confinée à haute concentration dans le cœur du liposome se trouve alors très fortement diluée et à une concentration où sa fluorescence n'est plus éteinte. La mesure de l'intensité de la fluorescence émise, rapportée à celle d'un échantillon témoin dans lequel on a provoqué le relargage de 100 % du marqueur, permet d'évaluer un taux de fuite en fonction du temps. Le temps au bout duquel l'intensité de la fluorescence mesurée est égale à 50 % de celle de l'échantillon témoin est assimilé au temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de la préparation liposomiale.

Formulation de liposomes C10F6-PC

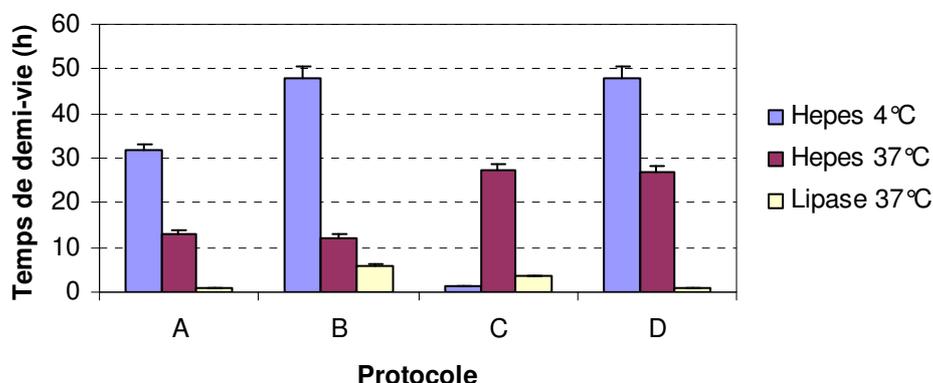


Figure 3.27. Temps de demi-vie des solutions liposomiales préparées à partir de C₁₀F₆-PC en utilisant les protocoles A, B, C, et D. Les valeurs de $t_{1/2}$ ont été évaluées dans différents milieux : dans un tampon Hepes à 4 et à 37 °C (en bleu et en bordeaux, respectivement), et en présence de lipase à 37 °C (en jaune).

Les différents protocoles étudiés permettent de préparer des liposomes qui présentent une demi-vie supérieure à 24 heures. Cependant, on peut formuler plusieurs remarques :

- La présence de lipase diminue fortement la stabilité des liposomes et ce, quel que soit le protocole de formulation utilisé.
- Les protocoles A, B et D permettent de préparer des liposomes présentant un temps de demie-vie supérieur à 30 h, à 4 °C dans du tampon Hepes.
- À 37 °C, les liposomes formulés selon les protocoles A et B sont moins stables que ceux issus des protocoles C et D.
- Le protocole D est celui qui permet de formuler les liposomes les plus stables dans du tampon à 4 et 37 °C.

D'après ces résultats, nous avons conclu que les cycles de congélation-décongélation avant sonification (tels que décrits par l'équipe du Dr. Vierling⁸⁹ n'apportaient pas d'amélioration dans notre cas. Étant donné que, lors des premiers tests de formulation, les expériences de DSC n'avaient pas encore été réalisées, nous avons choisi de formuler les liposomes à +70 °C afin d'avoir un minimum d'assurance de nous trouver à une température supérieure à la température de transition de phase des lipides (T_m). Le protocole D a donc finalement été retenu et utilisé lors de toutes les formulations ultérieures de liposomes fluorés.

2.4.2 Formulation de liposomes à partir de phosphatidylcholines pures

Une première série de formulations de liposomes a été effectuée à partir des phosphatidylcholines hémifluorées pures (Figures 3.28-3.30). Quel que soit le milieu utilisé, nous ne sommes parvenus à formuler des liposomes avec aucun des composés fluorés ramifiés que nous avons synthétisés. En conséquence, ils n'apparaissent pas dans les figures qui suivent.

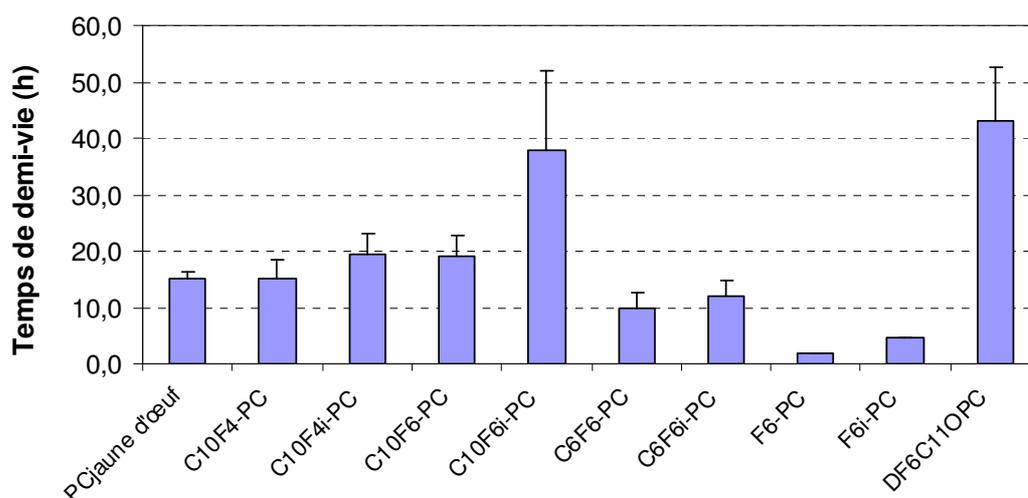


Figure 3.28. : Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec les phosphatidylcholines hémifluorées pures dans du tampon Hepes à 37°C.

On peut noter que, dans le tampon Hepes, les liposomes préparés à partir de C₁₀F₄-PC, C₁₀F_{4i}-PC, C₆F₆-PC et C₆F_{6i}-PC présentent une stabilité équivalente voire très supérieure à celle d'une préparation liposomiale de PC extraite du jaune d'œuf (Figure 3.28.). Par contre, ils sont moins stables que ceux préparés à partir de DF₆C₁₁O-PC, un composé de référence possédant le segment fluoré en bout de chaîne et similaire aux composés décrits et évalués par le Dr Vierling.⁸⁰ Nos molécules possédant des chaînes grasses globalement plus courtes que cette référence (donc une hydrophobie moindre), ce résultat n'est pas incongru. Pour les composés avec les chaînes les plus longues (C₁₀F₆-PC et C₁₀F_{6i}-PC), seul le composé insaturé permet de préparer des liposomes de stabilités à peu près équivalentes à celle du composé de référence, dans le tampon.

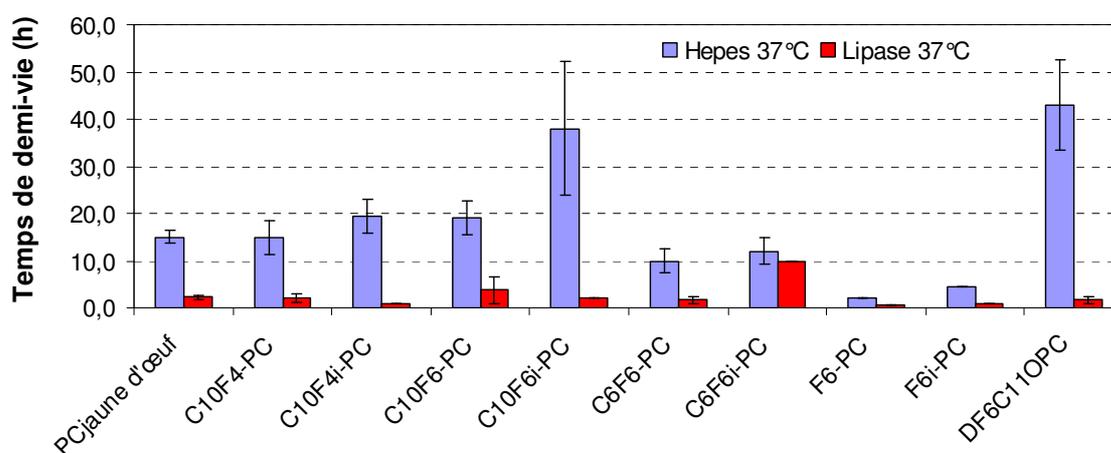


Figure 3.29. Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec les phosphatidylcholines hémifluorées pures dans du tampon (bleue) et en présence de lipase (rouge).

En présence de lipase (Figure 3.29.), une enzyme capable d'hydrolyser les phospholipides, la stabilité des liposomes est très fortement altérée (avec une baisse de $t_{1/2}$ supérieure à 80 %), qu'ils soient fluorés ou non. Seul le composé insaturé à chaîne courte, C₆F_{6i}-PC, semble former des liposomes qui résistent à l'action de cette enzyme. En effet, le temps de demi-vie de ces liposomes passe d'environ 12 heures, dans l'Hepes à 37 °C, à 10 heures, en présence de lipase et à la même température.

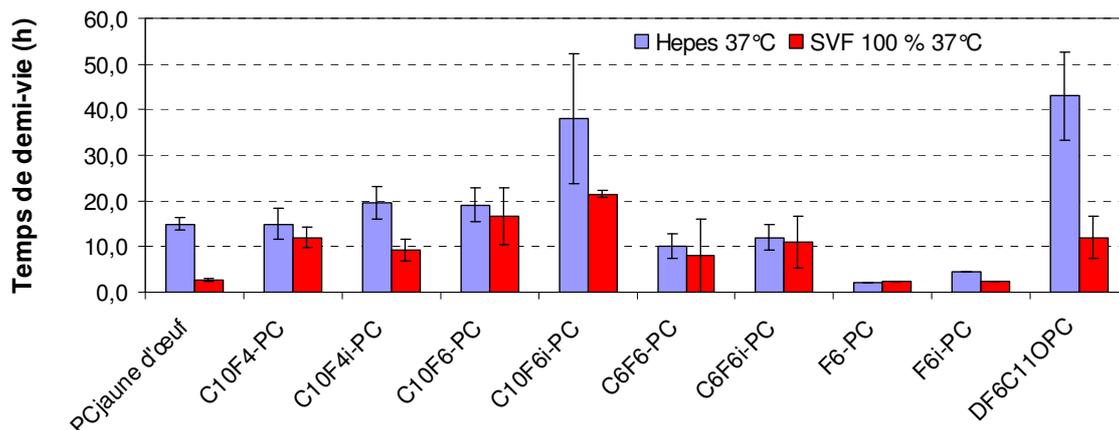


Figure 3.30. Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec les phosphatidylcholines hémifluorées pures dans du tampon (bleue) et en présence de SVF (rouge).

Nous avons également étudié la stabilité des liposomes en présence de sérum de veau foetal (SVF) (Figure 3.30). Ce milieu présente certaines des caractéristiques du milieu circulant et constitue, par conséquent, un modèle intéressant pour appréhender le comportement des liposomes *in vivo*. Dans ce milieu, la stabilité de liposomes à base de PC d'œuf est diminuée de plus de 80 %. Dans le cas des liposomes hémifluorés, on observe certes une diminution du temps de demi-vie, mais dans une mesure moindre (de 8 à 50 %). La référence fluorée en bout de chaîne, quant à elle, fournit des liposomes qui sont également très fragiles en présence de SVF puisque $t_{1/2}$ est diminué de plus de 70 %.

Cette série de résultats tend à montrer que la position d'un segment fluoré dans la chaîne grasse d'un phospholipide a effectivement un impact important sur la stabilité d'une préparation liposomiale en milieu biologique (ou en milieu modèle).

2.4.3 Formulation de liposomes à partir de mélanges PC/PG

La stabilité des liposomes préparés à partir de phosphatidylcholines « classiques » (*i.e.* non fluorées) est en général grandement améliorée par l'incorporation de phosphatidylglycérol dans la matrice lipidique. Afin de formuler des liposomes fluorés *a priori* plus stables, nous avons synthétisé des analogues fluorés de phosphatidylglycérol. Les mélanges PC/PG fluorés ont ensuite été évalués comme précédemment (Figures 3.31-3.33).

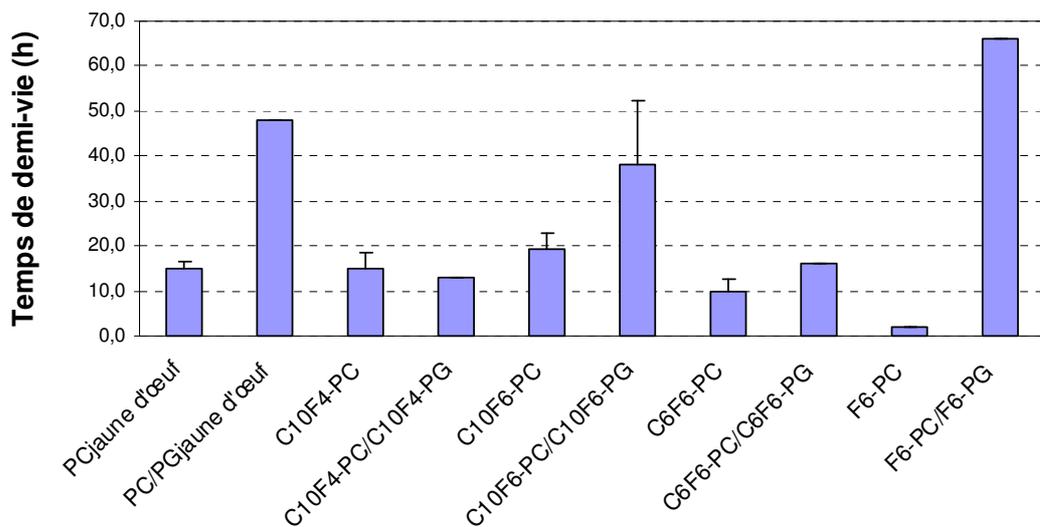


Figure 3.31. Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec un mélange PC/PG hémifluoré (dans un rapport molaire 80/20), dans du tampon Hepes.

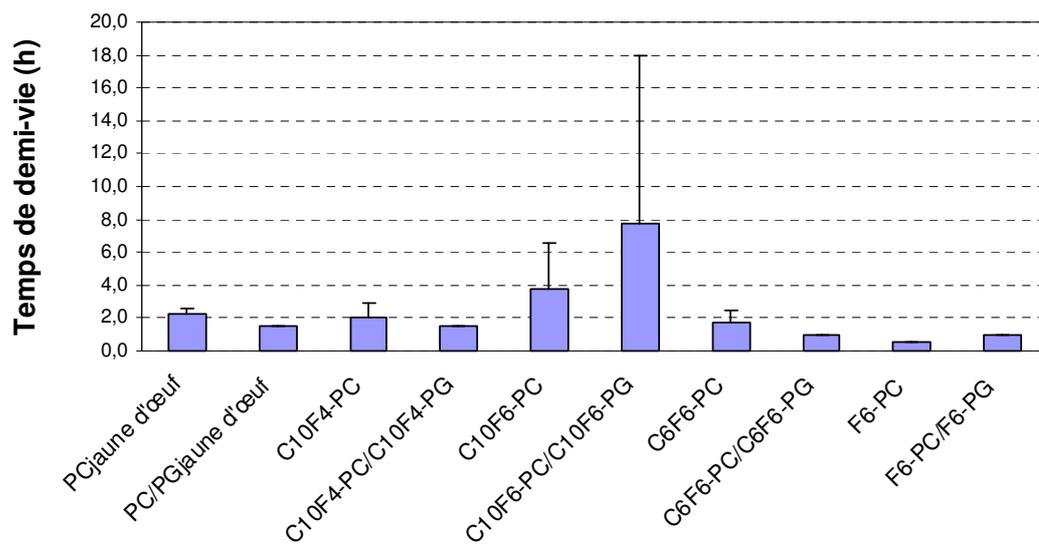


Figure 3.32. Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec un mélange PC/PG hémifluoré (dans un rapport molaire 80/20), en présence de lipase.

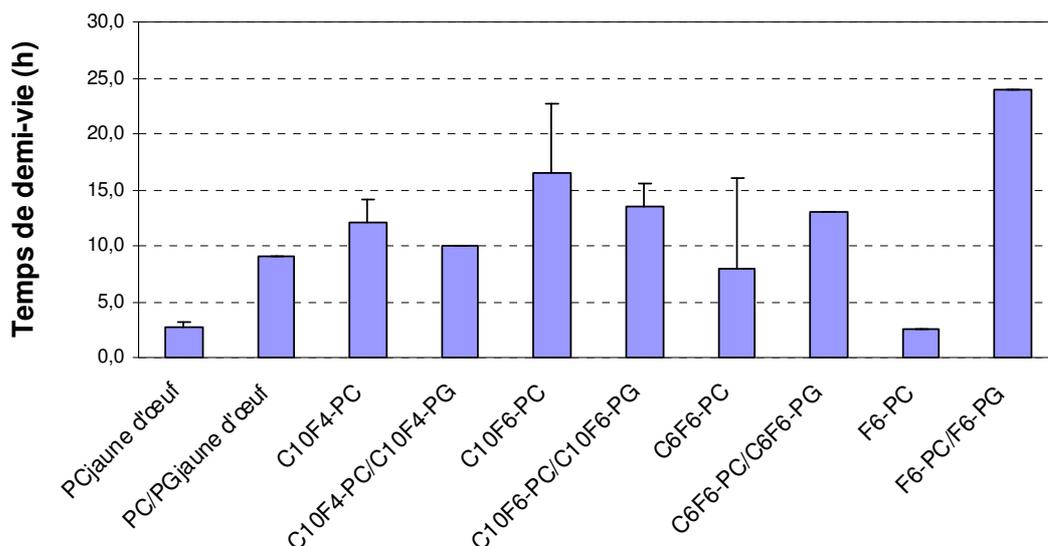


Figure 3.33. Évaluation de la stabilité des liposomes formulés avec un mélange PC/PG hémifluoré (rapport molaire respectivement 80/20) dans du SVF 100%.

Dans la formulation à base de PC de jaune d'œuf, l'incorporation de 20 % de PG (de jaune d'œuf également) entraîne une augmentation de la stabilité des liposomes de 360 % en milieu tampon, 150 % en présence de lipase et 320 % dans le sérum. Dans le cas des lipides hémifluorés saturés, l'incorporation de phosphatidylglycérol n'entraîne pas une augmentation systématique de la valeur de $t_{1/2}$. Les effets observés sont plus faibles qu'en série non fluorée. Selon la nature de la chaîne grasse et la composition du milieu, $t_{1/2}$ peut augmenter ou, au contraire, diminuer. Compte tenu de la variabilité importante enregistrée sur les expériences réalisées, une interprétation plus fine serait hasardeuse. Un cas cependant nous semble mériter plus d'attention. Il s'agit de F₆-PC, un composé à chaînes courtes qui avait été préparé à des fins de comparaison. Ce dernier, lorsqu'il est formulé seul, conduit à des liposomes peu stables ($t_{1/2}$ inférieur à 3 h). En mélange avec la PG correspondante, la construction liposomiale voit son temps de demi-vie décuplé dans le sérum ($t_{1/2}$ 24 h), et multiplié par 30 dans le tampon Hepes ($t_{1/2}$ 66 h). Par contre, aucune amélioration n'est relevée en présence de lipase.

En conclusion, même si en présence de sérum tous les liposomes fluorés sont plus stables que la formulation de référence (PC/PG d'œuf), aucune amélioration importante n'est obtenue par incorporation de phosphatidylglycérol dans la matrice lipidique, contrairement à ce qui est observé avec la PC d'œuf. La seule exception concerne le lipide F₆-PC qui voit ses performances « exploser » en présence de F₆-PG.

2.4.4 Les composés ramifiés

Les composés ramifiés n'ont pas montré de capacité à former des liposomes. L'étude par diffraction de rayons X du composé $C_{8R}F_6$ -PG a montré que ce dernier se trouve dans une phase hexagonale sur toute la gamme de température explorée. Il semblerait donc que le paramètre d'empilement de ces molécules favorise une structure en micelle. Nous avons examiné en microscopie électronique les échantillons issus de nos tentatives pour préparer des liposomes à partir de ces composés (Figure 3.34.).

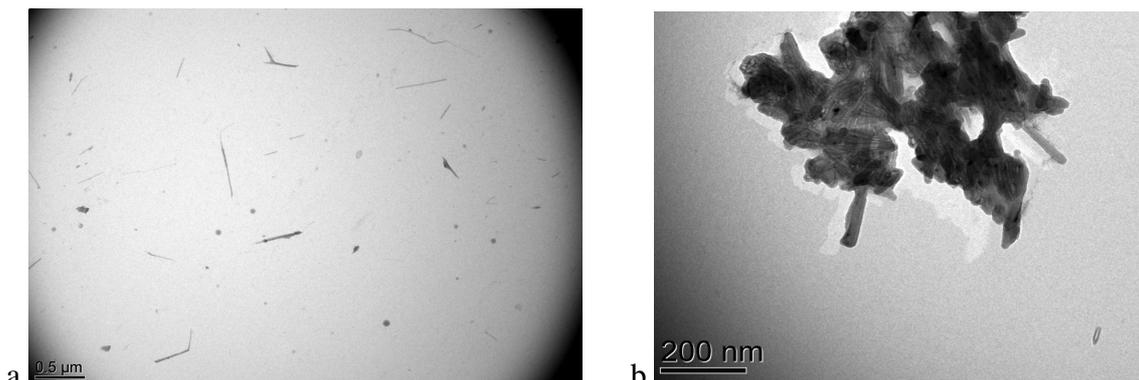


Figure 3.34. Les liposomes ont été préparés de la même manière que pour les études de stabilité (a : $C_{8R}F_6$ -PC/PG, b : $C_{14R}F_6$ -PC/PG). La préparation a ensuite été déposée (5 à 10 μ l) sur une grille de microscopie recouverte par un film de carbone. L'échantillon a été coloré à l'acétate d'uranyle (coloration négative) et observé au microscopie électronique.

Les clichés de microscopie électronique des préparations à base du mélange des composés $C_{8R}F_6$ -PC et $C_{8R}F_6$ -PG (8/2) ont mis en évidence la formation de structure tubulaire. Cette structure ne ressemble pas à la structure globulaire attendue dans le cadre de la formulation de liposomes. Il paraît donc difficile d'encapsuler de la carboxyfluorésceïne dans ces conditions.

2.5 Conclusion

Les problèmes liés à la synthèse des lipides cibles nous ont conduits à compléter notre librairie de molécules avec des composés insaturés. Dans un premier temps, tous les composés préparés se sont révélés capables de former des monocouches à l'interface air/eau et aucun d'eux ne présente de transition de la phase fluide expansée à la phase fluide condensée, dans la gamme de température étudiée (-20 à +85 °C).

Des mesures calorimétriques ont révélé que certains de nos composés présentent des transitions de phase faiblement énergétiques. Les observations au microscope optique en

lumière polarisée nous ont permis de démontrer que les produits synthétisés sont dans une phase cristal liquide sur toute la gamme de température explorée. Les transitions de phase observées sont donc des transitions cristal liquide à cristal liquide. Afin de caractériser ces différentes phases, deux composés ont été sélectionnés pour des expériences de diffraction de rayons X. L'un de ces composés ($C_{10}F_6$ -PC) présente une transition de phase cristal liquide à cristal liquide et l'autre non ($C_{8R}F_6$ -PG). Pour le premier composé, la transition observée s'est révélée concerner le passage d'une phase lamellaire (en dessous de la température de transition de phase) à une phase hexagonale (au dessus de cette température). La faible énergie de ce type de transition est en accord avec les valeurs enregistrées en DSC. Le composé ne présentant pas de transition de phase s'est quant à lui révélé être dans une phase hexagonale sur toute la gamme de température explorée.

La préparation de liposomes pour les études de stabilité a nécessité la mise au point d'un protocole de formulation spécifique. Les tests de stabilité ont révélé que nos constructions ne se montrent, en général, pas plus stables que des constructions à base de lipides fluorés en bout de chaînes, et sont à peu près équivalentes à des liposomes non fluorés. On peut supposer qu'un segment fluoré unique disposé au centre d'une bicouche lipidique engendre une meilleure stabilité que deux segments fluorés disposés de part et d'autre d'un milieu lipophile. Cette baisse de stabilité due à la fragmentation du segment fluoré serait cependant compensée par une meilleure résistance à l'insertion d'éléments lipophiles dans la membrane. En effet, en présence de lipases et de sérum, nos constructions se révèlent sensiblement plus stables que des liposomes formulés à partir de lipides non fluorés ou fluorés en bout de chaînes.

Enfin, l'introduction de phosphatidylglycérol dans la formulation de liposomes améliore la stabilité de nos constructions mais de manière sensiblement moins importante que dans le cas des lipides non fluorés. De même que pour les constructions à base de PC pures, les constructions PC/PG formulées avec les lipides synthétisés au laboratoire présentent une plus grande stabilité en milieu protéique (présence de lipase ou de protéines sériques) que leurs analogues non fluorés ou fluorés en bout de chaînes.

Chapitre 4
Conception de lipides cationiques fluorés pour
le transfert de gènes

1 Conception des lipides cationiques fluorés

Comme nous l'avons vu au chapitre dédié aux vecteurs non viraux (1.3.4.2), une multitude de vecteurs (poly)cationiques lipidiques ou polymériques ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*. Les vecteurs synthétiques présentent l'avantage d'être sûrs (pas de risque de réveil de virus), faciles d'utilisation et peu coûteux. Néanmoins, ils ne possèdent qu'une faible efficacité de transfection *in vivo*. Un des principaux inconvénients des lipides polycationiques utilisés en transfection est qu'ils possèdent un temps de demi-vie en milieu circulant assez faible. Le projet que nous avons développé au laboratoire vise à améliorer cette caractéristique en nous appuyant sur les propriétés du fluor.

1.1 Contexte et objectifs

Les lipides cationiques utilisés classiquement pour le transfert de gènes lient l'ADN par des interactions électrostatiques et forment des particules possédant une charge globale positive. Cette charge positive va être à l'origine de l'internalisation de l'ADN dans les cellules mais conduit aussi à des interactions non-spécifiques avec des composés des fluides biologiques. Cela entraîne une destruction des complexes et leur élimination rapide du milieu circulant. Comme les liposomes, les lipoplexes peuvent être dégradés par des agents tensioactifs ou par des protéines à ancre(s) hydrophobe(s) qui peuvent s'insérer dans la structure du lipoplexe et induire sa destruction.

Différents vecteurs fluorés ont déjà été synthétisés par l'équipe du Dr. Vierling afin de tirer profit des propriétés d'auto-assemblages conférées par des chaînes perfluorées.⁸⁰ Ce groupe a en effet conçu différents lipides cationiques comportant des chaînes grasses fluorées à leur extrémité. Ces lipides cationiques hémifluorés se sont avérés un peu plus efficaces que leurs homologues hydrocarbonés, surtout en présence de sérum, et forment des lipoplexes plus stables en présence de sels biliaires. Tout comme pour les liposomes fluorés, nous pensons que des segments fluoroalkanes disposés à proximité de la tête cationique devraient apporter une plus grande stabilité à des lipoplexes en isolant leur région lipophile d'une possible agression par insertion de motifs lipophiles (agents tensioactifs, ancres lipidiques de protéines...).

1.2 Lipides monocationiques

Pratiquement tous les lipides cationiques peuvent, *a priori*, présenter des propriétés de condensation de l'ADN et constituer de potentiels agents de transfection. Afin d'évaluer

l'effet du fluor à proximité de la tête polaire sur les propriétés de transfection d'un lipide cationique, nous avons tout d'abord sélectionné un lipide cationique ayant une excellente efficacité comme agent de transfection. Notre modèle et notre choix s'est porté sur le DOTAP. Ce lipide monocationique est un des plus étudiés dans le domaine et sert souvent de référence lorsqu'il s'agit d'évaluer les performances d'un vecteur. Nous avons donc envisagé d'introduire des segments fluoroalkyl de longueur variable dans la structure du DOTAP (Figure 4.1).

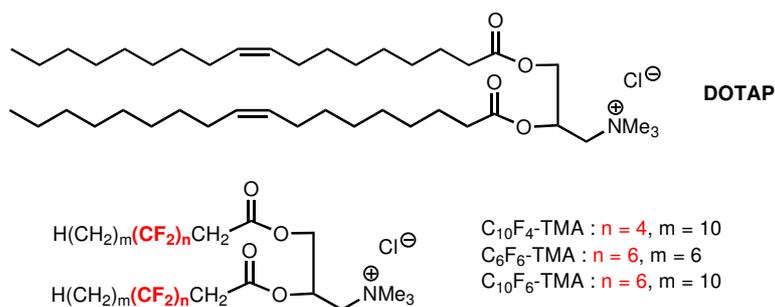


Figure 4.1. Structure du DOTAP et des analogues fluorés envisagés.

Ces composés sont peu stables en raison de la β -élimination de HF qui survient relativement facilement en milieu légèrement basique (*vide infra*). De plus, la séparation des composés saturé et insaturé s'est avérée très délicate, voire impossible. Pour ne pas compliquer l'interprétation des résultats obtenus ultérieurement dans les évaluations en transfection suite à l'utilisation de composés instables ou en mélange, nous avons décidé de provoquer quantitativement la β -élimination afin de travailler avec des produits, insaturés certes, mais dont on est en mesure de garantir la stabilité et la pureté. Nous sommes néanmoins parvenus à préparer une quantité suffisante du composé $\text{C}_{10}\text{F}_6\text{-TMA}$ en mélange avec une quantité minimale (11 %) de son homologue insaturé $\text{C}_{10}\text{F}_{6i}\text{-TMA}$, pour nous permettre d'effectuer une évaluation, en parallèle, avec le composé éliminé et tenter d'apprécier ainsi l'impact de la présence des deux doubles liaisons dans la structure sur les propriétés de transfection. Les composés synthétisés au laboratoire sont récapitulés dans le tableau 4.1.

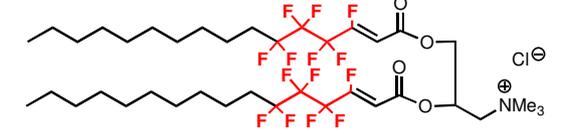
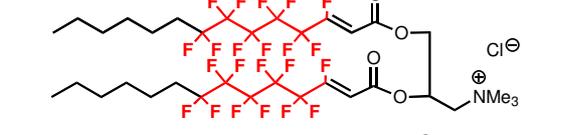
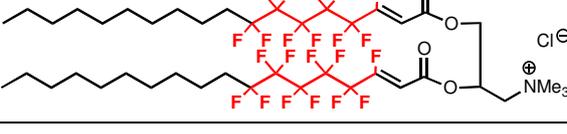
Composé	Structure	Code
21		C ₁₀ F ₆ -TMA
22		C ₁₀ F _{4i} -TMA
23		C ₆ F _{6i} -TMA
24		C ₁₀ F _{6i} -TMA

Tableau 4.1. Présentation de structures analogues du DOTAP synthétisées au laboratoire.

1.3 Lipides polycationiques

Les résultats présentés dans la littérature laissent apparaître que les lipides polycationiques présentent, en général, des activités en transfection qui sont supérieures à celles des lipides monocationiques. Nous avons intégré cet aspect en substituant la tête triméthylammonium, présente dans la précédente série de composés, par un motif carboxy-spermine. Ceci nous a ainsi conduits à préparer ce qu'on pourra considérer comme une série d'analogues fluorés du DOGS, un autre composé de référence dans le domaine de la transfection (Figure 4.2). La voie de synthèse mise en œuvre pour la préparation de cette série de composés nous a permis d'éviter les problèmes de β -élimination rencontrés plus haut et d'obtenir les composés recherchés avec une pureté satisfaisante. Les molécules synthétisées au laboratoire sont récapitulés dans le tableau 4.2.

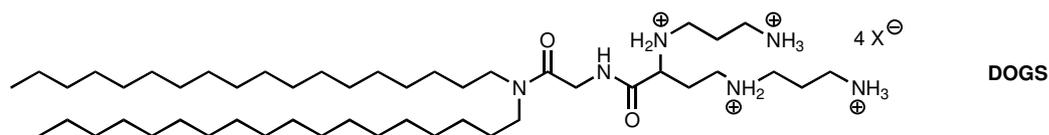


Figure 4.2. Structure de l'agent de transfection polycationique pris comme référence dans notre travail.

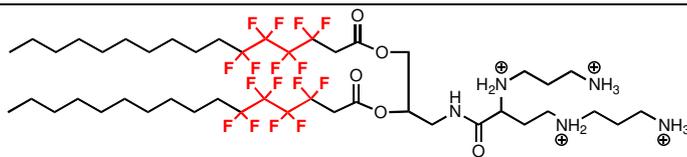
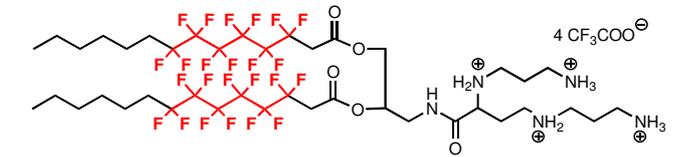
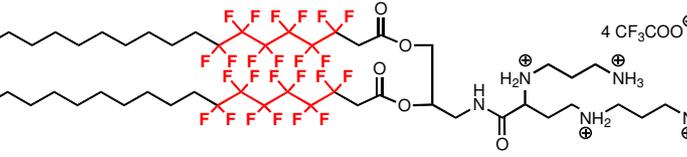
Composé	Structure	Code
25		C ₁₀ F ₄ -Sp
26		C ₆ F ₆ -Sp
27		C ₁₀ F ₆ -Sp

Tableau 4.2. Présentation des analogues fluorés du DOGS synthétisés au laboratoire.

1.4 Adjuvant lipidique (« helper lipid »)

La transfection par les vecteurs lipidiques est très souvent améliorée par l'utilisation d'adjuvants qui favorisent, par exemple, la fusion membranaire. La dioléoylphosphatidyl-éthanolamine ou DOPE est l'un de ces « helper lipids » les plus utilisés et son mode d'action a été étudié par plusieurs auteurs. Ce lipide, introduit en mélange avec des lipides cationiques, induit un changement de phase lipidique au sein du lipoplexe. En absence de DOPE, le lipoplexe se trouve dans une phase multilamellaire, l'ADN étant disposé entre les feuillettes. En présence de DOPE, par contre, le lipoplexe peut présenter une phase hexagonale qui faciliterait le processus de fusion avec la membrane cellulaire (ou de l'endosome) chargée négativement et, donc, un relargage ultérieur de l'ADN.^{107,108} Les résultats que nous avons obtenus avec nos lipides fluorés en mélange avec la DOPE et qui sont présentés plus loin nous ont convaincus de l'intérêt d'évaluer l'activité adjuvante d'un analogue fluoré de la DOPE (Figure 4.3). En effet, nous avons fait le raisonnement qu'un tel composé serait plus miscible avec des lipides cationiques fluorés que la DOPE elle-même, ce qui pourrait entraîner de meilleures performances en terme de transfection.

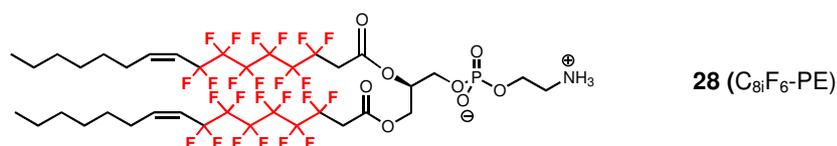


Figure 4.3. Structure de l'analogue fluoré de la DOPE développé au cours de nos travaux.

2 Fabrication et propriétés des lipoplexes fluorés

La capacité de nos structures à interagir avec un plasmide d'ADN et à le condenser a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose. La stabilité des lipoplexes a été évaluée de manière similaire en suivant le relargage de plasmide en fonction de quantités croissantes de détergent. La morphologie des lipoplexes a été étudiée par microscopie électronique après coloration négative des échantillons (coloration à l'acétate d'uranyle). Enfin, des expériences de transfection ont été effectuées sur différentes lignées cellulaires en utilisant un « plasmide reporter » (pEGFP_{Luc}) qui code pour les gènes de la luciférase et d'une protéine qui fluoresce dans le vert (enhanced green fluorescent protein). Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées à l'IGBMC par Guy Zuber, et les manipulations de transfection ont été effectuées par Miahala Ciaobanu et Valérie Machi, dans le Laboratoire de Biovectorologie dirigé par le Dr Benoît Frisch.

2.1 Lipides monocationiques

2.1.1 Propriétés physicochimiques des complexes

Complexation de l'ADN

La complexation d'ADN par les lipides cationiques fluorés a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 4.3). La détection du plasmide sur gel a été réalisée par coloration au bromure d'éthidium. Les lipoplexes étant chargés positivement et plus volumineux que le plasmide nu, leur mobilité électrophorétique est nulle et on retrouve tout le matériel dans le puits de dépôt. En conséquence, l'absence de bande correspondant au plasmide nu sur le gel indique que l'ADN forme effectivement des complexes avec la formulation lipidique testée. Tous les lipides cationiques synthétisés se sont avérés capables de condenser totalement l'ADN avec des rapports N/P variant de 2 à 5. Ce rapport quantifie le nombre de groupes ammonium par groupe phosphate du plasmide, sachant que 1 µg d'ADN représente 3 nmol de charges négatives.

La stabilité des lipoplexes a ensuite été évaluée en ajoutant des concentrations croissantes de détergents et en suivant la libération de plasmide, toujours par électrophorèse sur gel d'agarose. Nous avons sélectionné différents types de détergents dans le cadre de cette étude : un détergent non-ionique, le Tween 80[®] ; deux détergents anioniques, le cholate de sodium (ChS) et le dodécylsulfate de sodium (SDS) ; un détergent cationique, le bromure de triméthylcétylammonium (CTAB) ; et un détergent zwitterionique, le CHAPS. Pour la migration sur gel d'électrophorèse, le tampon de charge utilisé est dépourvu de bleu de bromophénol car celui-ci est susceptible de décomplexer l'ADN, à haute dose, et donc de fausser les mesures. Un exemple de gel retard obtenu est présenté à la figure 4.3.

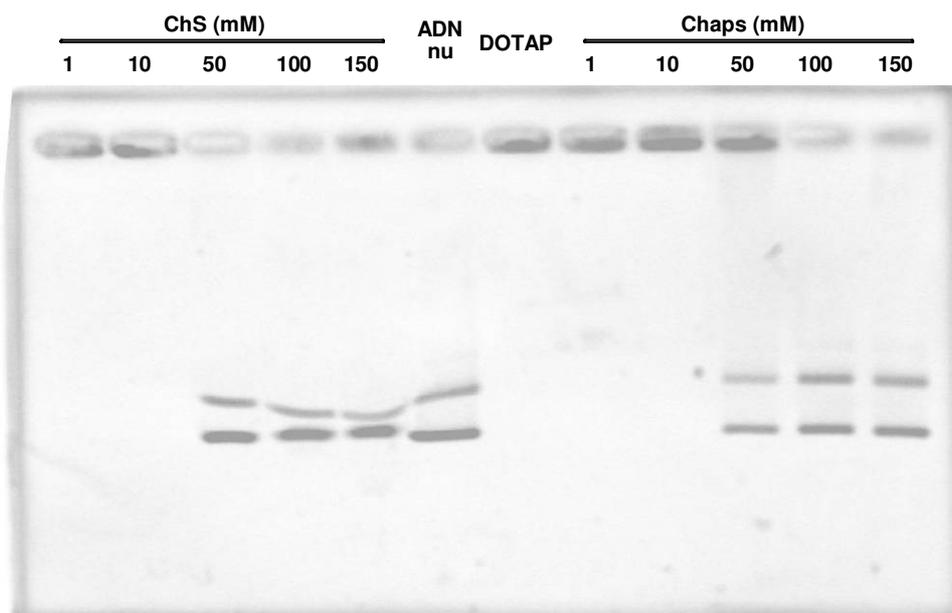


Figure 4.3. Présentation d'un gel d'électrophorèse réalisé. Ici, la stabilité des complexes DOTAP/DOPE-ADN est testée à différentes concentrations de détergent anionique (cholates de sodium) et zwitterionique (CHAPS).

Les deux bandes au centre du gel correspondent à de l'ADN nu et au lipoplexe DOTAP/DOPE-ADN (DOTAP/DOPE 1/2, rapport molaire) avec un rapport de charge N/P 3 et en l'absence de détergent. En présence de cholates de sodium 10 mM, on constate que les lipoplexes sont encore stables. À 50 mM, ils sont totalement détruits. Les lipoplexes résistent un peu mieux en présence du détergent zwitterionique puisque, à 50 mM, une partie des lipoplexes seulement sont détruits. Par contre, à 100 mM, la totalité de l'ADN est libéré.

Les résultats obtenus avec les lipides monocationiques synthétisés, en mélange ou non avec la DOPE, et les différents détergents étudiés sont présentés dans le tableau 4.2.

Lipide cationique	Résistance au détergent (mM)				
	Tween 80	SDS	ChS	CTAB	CHAPS
DOTAP	< 1	1	10	1	50
C ₁₀ F ₆ ⁻ -TMA	150	1 (10)	100	150	150
C ₁₀ F _{6i} ⁻ -TMA	< 1	1	10	150	10 (50)
C ₁₀ F _{4i} ⁻ -TMA	< 1	1	10	1 (150)	10
C ₆ F _{6i} ⁻ -TMA	1	1	50 (150)	10 (150)	50
DOTAP/DOPE	< 1	1	10	1	10
C ₁₀ F ₆ ⁻ -TMA/DOPE	< 1	(1)	100	1 (150)	150
C ₁₀ F _{6i} ⁻ -TMA/DOPE	< 1	1	10	1 (150)	50
C ₁₀ F _{4i} ⁻ -TMA/DOPE	< 1	1	10	1	10
C ₆ F _{6i} ⁻ -TMA/DOPE	< 1	1	150	150	50

Tableau 4.2. Tests de stabilité des lipoplexes formulés à l'aide du DOTAP et des analogues hémifluorés du DOTAP, à un rapport N/P de 3, en présence ou non de DOPE (rapport lipide/DOPE 1/2). Les tests ont été réalisés à des concentrations en détergent de 1, 10, 50, 100 et 150 mM. La concentration indiquée correspond à

la plus haute examinée à laquelle les lipoplexes étaient préservés à 100 %. Aux concentrations indiquées entre parenthèses, seulement une petite partie du plasmide est relarguée (± 10 %).

L'analyse du tableau 4.2 fait apparaître que le Tween 80, bien que non ionique, est très efficace pour détruire les lipoplexes. On notera cependant le comportement remarquable des complexes formés entre le composé $C_{10}F_6$ -TMA et l'ADN, complexes qui résistent au Tween 80 même à la plus haute concentration testée.

Les résultats obtenus en présence de SDS étaient, eux, beaucoup plus prévisibles puisque, compte tenu de leur pK_a , les sulfates ont la possibilité d'entrer en compétition avec les phosphates pour la complexation des ammoniums. Ainsi, tous les lipoplexes sont détruits à faible concentration en détergent sauf, une fois encore, les complexes $C_{10}F_6$ -TMA-ADN qui ne sont que partiellement dégradés en présence de 10 mM SDS. Le cholate de sodium, un autre détergent anionique mais moins agressif que le SDS, décomplexe l'ADN à des concentrations plus importantes que ce dernier. Ainsi les lipoplexes formulés à l'aide de DOTAP et DOTAP/DOPE résistent à 10 mM de détergent. Les lipoplexes fluorés sont tous stables à cette concentration. Comme précédemment, les lipoplexes à base de $C_{10}F_6$ -TMA, en présence de DOPE ou non, sont plus stables et résistent à une concentration dix fois plus élevée de cholate. De façon plus inattendue, les lipoplexes préparés avec le composé $C_{10}F_6$ -TMA, avec ou sans DOPE, apparaissent particulièrement résistants en présence de cholate, même à une concentration de 150 mM.

Le détergent cationique CTAB qui ne peut prétendre déstabiliser les lipoplexes par un mécanisme d'échange de contre-ion se révèle néanmoins très efficace pour détruire les complexes DOTAP-ADN. En effet, les lipoplexes sont déjà totalement détruits à la plus faible concentration testée (1 mM). Par contre, les lipoplexes fluorés apparaissent particulièrement stable vis-à-vis de ce détergent et, pour la plupart, ne sont que très partiellement altérés à 150 mM. Il nous apparaît particulièrement intéressant de constater que cette stabilité n'est pratiquement pas altérée lorsque les lipoplexes contiennent de la DOPE. Nous n'avons cependant pas vérifié si la DOPE restait intégrée dans les lipoplexes ou si elle était solubilisée par le détergent. Les lipoplexes construits à partir de $C_{10}F_4$ -TMA apparaissent légèrement moins stables que les autres lipoplexes fluorés et ceci pourrait trouver son explication dans la longueur plus faible de ses segments fluoroalkyl.

Enfin, un détergent zwitterionique, le CHAPS, a été testé sur les différents lipoplexes. La formulation à base de DOTAP est stable jusqu'à une concentration de 50 mM mais ne résiste que partiellement à cette concentration lorsque la formulation contient de la DOPE. Les lipoplexes fluorés n'apparaissent pas sensiblement plus stables excepté, encore une fois, ceux à base de $C_{10}F_6$ -TMA (avec ou sans DOPE) qui résistent à la plus haute concentration testée.

Il ressort de cette étude de stabilité en présence de détergents que plus la chaîne lipidique est longue et plus son taux de fluor est élevé, plus les lipoplexes sont résistants. Cependant, la différence de stabilité observée entre les lipoplexes incorporant C₁₀F₆-TMA et C₁₀F_{6i}-TMA ne peut probablement pas être expliquée en considérant simplement la teneur des molécules en fluor (24 vs. 22 atomes de fluor). Plus vraisemblablement, la présence d'une insaturation à la base de la chaîne fluorée pourrait contrarier l'organisation compacte des segments fluorés qui tendent à adopter une conformation hélicoïdale rigide. Il pourrait en résulter une plus grande perméabilité de la couche lipidique externe des lipoplexes. Cet accroissement de perméabilité faciliterait l'accès des molécules de détergent au cœur de la particule d'ADN condensé et favoriserait ainsi la destruction du lipoplexe.

Les différents travaux effectués sur le transfert de gènes par les lipides cationiques révèlent que plusieurs paramètres qui ne sont pas directement liés aux propriétés intrinsèques du vecteur influent sur l'efficacité de la transfection. Il s'agit notamment de la taille, la charge de surface et la morphologie des complexes. Nous avons donc entrepris une analyse physicochimique plus complète centrée sur les deux lipides C₁₀F₆-TMA et C₁₀F_{6i}-TMA et leur mélange avec la DOPE.

Taille des lipoplexes

Il a été montré que la taille des particules a un impact important sur l'efficacité de transfection *in vitro*.^{109,110} Lorsqu'ils sont préparés dans une solution de glucose, des complexes PEI-ADN forment des particules d'environ 100 nm de diamètre. Ces particules transfectent moins bien les cellules en culture que des complexes préparés dans un milieu NaCl 100 mM qui sont, dans ce cas, de taille plutôt micrométrique. Il est suggéré que les particules trop petites ne vont pas sédimenter sur les cellules en culture et donc n'entreront que peu en contact avec celles-ci et seront moins souvent internalisées. À l'inverse, des particules trop grosses ne seront même pas endocytées. De manière générale, les particules de transfusions présentant une taille entre 200 et 1000 nm conduisent aux résultats les plus intéressants *in vitro*. C'est d'ailleurs ce qui est à l'origine du paradoxe que l'on rencontre dans les études de transfection. L'évaluation *in vivo* d'un vecteur étant sensiblement plus lourde que l'évaluation *in vitro*, elle n'est en général déclenchée qu'après obtention de résultats *in vitro* concluants mais, malheureusement, le plus souvent non extrapolables. En effet, les meilleurs résultats *in vitro* sont obtenus avec des lipoplexes qui sédimenteront sur les cellules (ce qui augmente leur probabilité d'internalisation) alors qu'on sait que ces mêmes lipoplexes, justement parce qu'ils sédimenteront, n'ont que peu de chance de montrer une quelconque efficacité lors d'une administration par voie systémique.

Comme nous le verrons plus loin, les résultats de transfection les plus prometteurs ont été obtenus en présence de DOPE et à un rapport lipide fluoré/DOPE 1/2. Nous avons donc

mesuré la taille de ces complexes incorporant de la DOPE. Les mesures ont été réalisées immédiatement après la formation des lipoplexes et après 2 heures d'incubation (cf. partie expérimentale). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci-dessous (Figure 4.4).

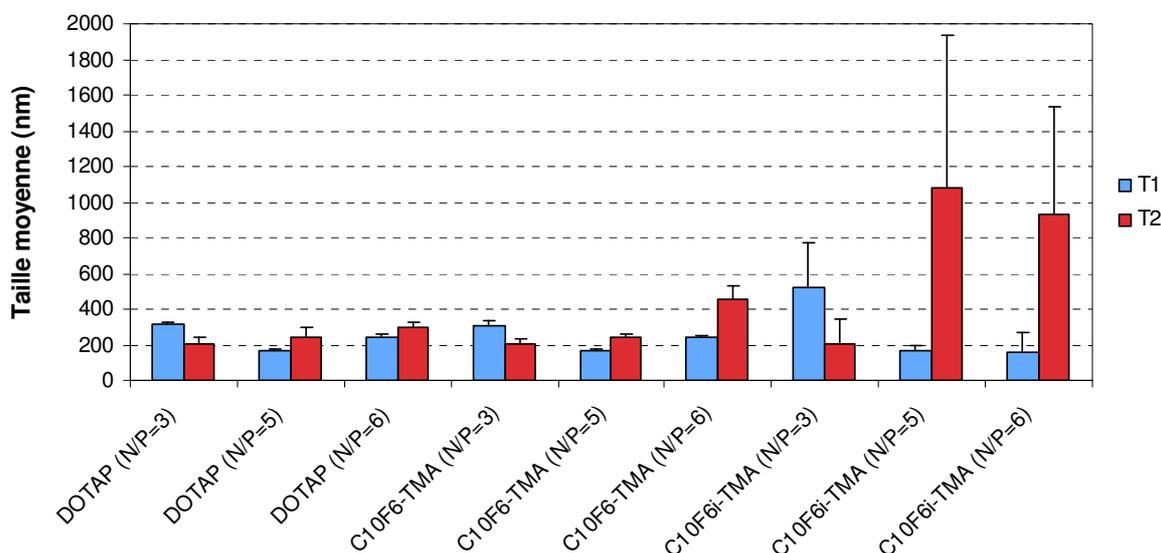


Figure 4.4. Évaluation de la taille des complexes lipide/DOPE-ADN (lipide/DOPE 1/2) par mesure de diffusion de la lumière. Les mesures ont été réalisées sur des lipoplexes fraîchement préparés (en bleu) et après 2 heures d'incubation (en rouge).

La taille des lipoplexes fluorés est proche de celle des lipoplexes à base de DOTAP. Dans les cas où le rapport N/P est égal à 3, la taille de toutes les particules semble diminuer avec le temps. Ceci pourrait être une conséquence de la sédimentation des particules les plus grosses qui ont tendance à fusionner. Les particules les plus petites restent plus longtemps en suspension et sont, elles seules, prises en compte par l'appareil de mesure. Pour les rapports N/P supérieurs, on observe une augmentation de la taille des particules formulés avec le DOTAP et C₁₀F₆-TMA. Ces particules étant plus fortement chargées que les précédentes, les répulsions électrostatiques les maintiennent plus efficacement éloignées les unes des autres. Le processus de fusion des particules en est donc d'autant ralenti et, même si la taille moyenne augmente, elle n'augmente probablement pas suffisamment pour provoquer la sédimentation. Les lipoplexes formulés avec C₁₀F_{6i}-TMA présentent la particularité d'évoluer vers de grosses particules très hétérogènes en taille mais qui semblent se maintenir en suspension.

Potentiel zêta en fonction du rapport de charge N/P

Afin d'interagir avec la membrane cellulaire chargée négativement pour pouvoir être internalisé par la suite, il est préférable que les lipoplexes présentent une charge globale positive. Nous avons mesuré la charge de surface des particules préparées à partir du mélange lipidique C₁₀F₆-TMA/DOPE 1/2 et d'ADN, à différentes valeurs du rapport N/P (3, 5 et 6)

ainsi que celle des lipoplexes homologues DOTAP/DOPE-ADN (Figure 4.5). D'une manière générale, les lipoplexes fluorés présentent un potentiel de surface plus faible que les particules non fluorées. Celui-ci semble rapidement plafonner à 20 mV et aucune augmentation significative n'est observée lorsque N/P passe de 5 à 6. Nous n'avons pas, à ce jour, d'explication qui pourrait rendre compte de ce phénomène.

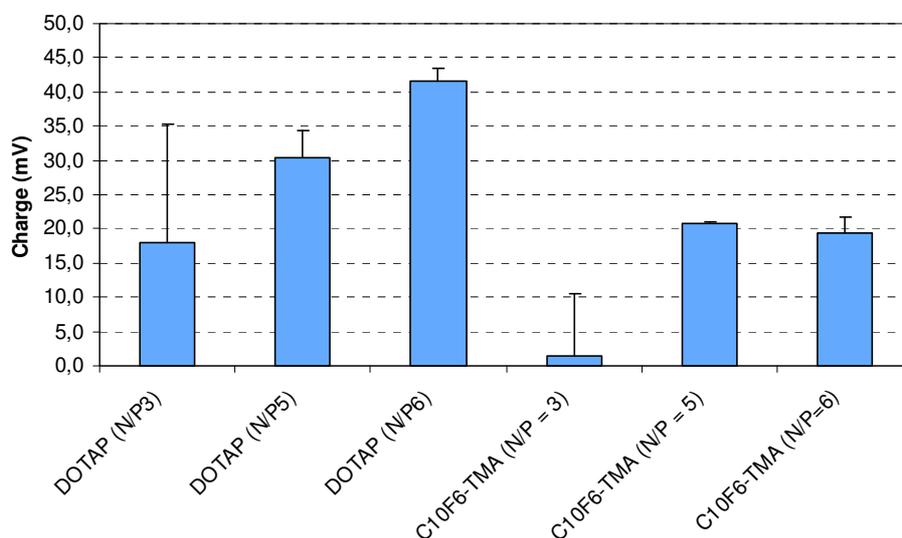


Figure 4.5. Mesure du potentiel zêta en fonction du rapport N/P pour des lipoplexes formulés avec le DOTAP et C₁₀F₆-TMA, en présence de DOPE.

Morphologie des complexes

Les lipoplexes préparés au cours des expériences précédentes ont fait l'objet d'observations en microscopie électronique. Pour cela, les échantillons ont été préparés par coloration négative à l'acétate d'uranyle. Les observations n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque différence de morphologie entre les lipoplexes fluorés et non fluorés (Figure 4.6).

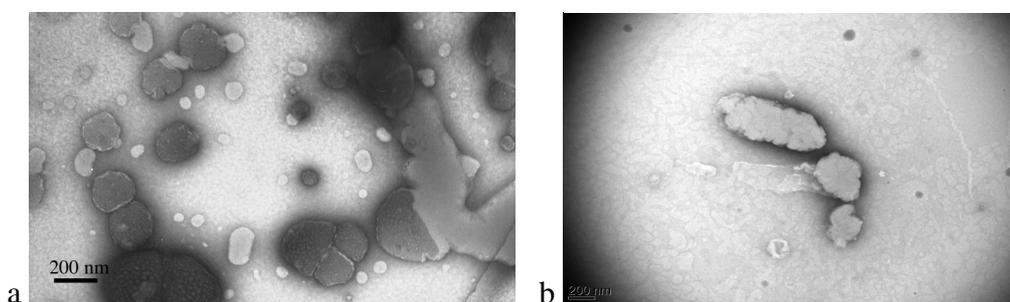


Figure 4.6. Clichés de microscopie électronique en coloration négative de complexes (a) C₁₀F₆-TMA/DOPE-ADN et (b) DOTAP/DOPE-ADN (lipide/DOPE 1/2, N/P 3).

Bien que nous n'ayons réalisé qu'un nombre limité d'observations en microscopie électronique, nous n'avons pas constaté de différence significative de morphologie entre les

différents types de lipoplexes étudiés. Par exemple, les lipoplexes formulés à partir du mélange C₁₀F₆-TMA/DOPE présentent un aspect sphérique très similaire à celui des lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN. On peut néanmoins noter que la présence de fluor dans les échantillons rend assez aléatoire les opérations de coloration. En effet, l'hydrophobie exacerbée des particules rend beaucoup plus difficile la diffusion des ions uranyles dans les parties périphériques des complexes qui apparaissent souvent avec un contraste peu marqué.

2.1.2 Propriétés en transfert de gène

Influence de la DOPE

Comme nous l'avons vu précédemment, la DOPE est couramment utilisée en mélange avec des lipides cationiques pour améliorer leur efficacité de transfection. Nous avons étudié son effet dès le début de notre étude.

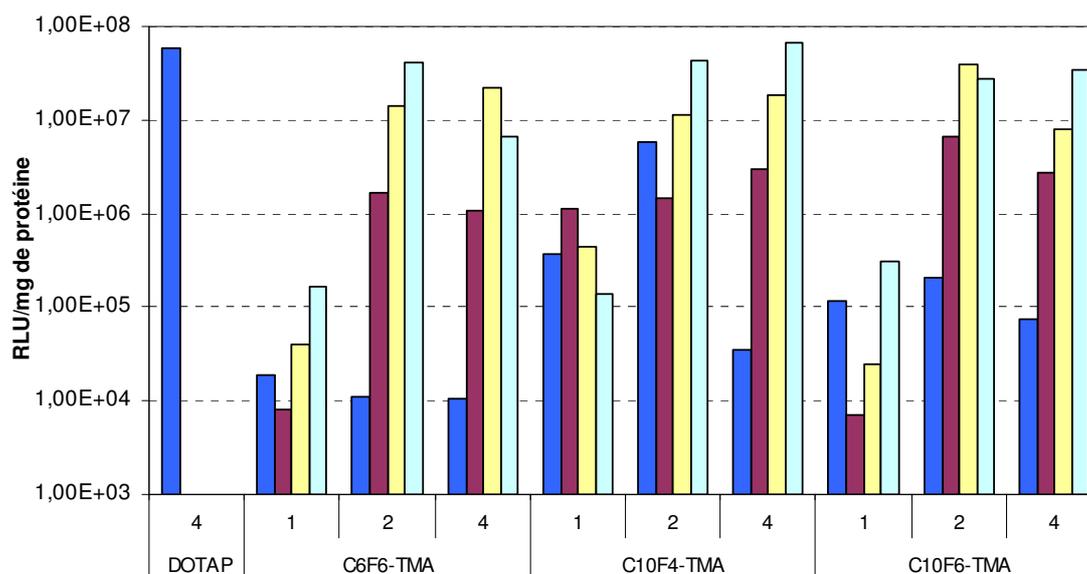


Figure 4.21. Expression de la luciférase dans des cellules HepG2 traitées avec un complexe DOTAP-ADN ou lipide fluoré/ADN. Avec 2 µg d'ADN par puits le ratio de charge N/P est noté en abscisse. Les lipides ont été mélangé à la DOPE à différent rapport molaire (lipide/DOPE : 1/0 bleu, 1/1 rouge, 1/2 jaune, 1/3 turquoise). Les lipoplexes ont été préparés dans 150 mM NaCl, 10 mM Hepes, à pH 7,5. Après 24 heures, les cellules ont été lysées et l'efficacité de transfection suivie par dosage de la luciférase.

L'activité des lipoplexes fluorés a été évaluée en premier lieu sur des cellules HepG2 en utilisant le gène de la luciférase comme gene reporter. Le DOTAP a été utilisé comme contrôle. L'expression de la luciférase a été quantifiée 24 heures après addition des complexes

sur les cellules par mesure de son activité enzymatique car cette enzyme catalyse la transformation de luciférine avec émission de photon. L'émission de lumière est détectée par un photomètre et comme elle dépend de la sensibilité de l'appareil, elle est mesurée en RLU (relative light Unit). Les résultats présentés à la figure 4.21 montrent que nos lipides fluorés présentent une activité de transfection modeste quel que soit le rapport N/P, lorsqu'ils sont utilisés seuls. L'efficacité de transfection augmente sensiblement en présence de DOPE. Avec un ratio lipide/DOPE de 1/2 et 1/3 l'efficacité de transfection de nos complexes devient comparable à celle du DOTAP.

L'impact de la présence de DOPE dans des lipoplexes fluorés était fortement spéculatif. En effet, on pouvait raisonnablement s'attendre à ce que le mélange des deux types de lipides donne lieu à des phénomènes de ségrégation de phase qui pourraient même, à la limite, compromettre le processus de transfection par les lipides fluorés. Les résultats obtenus montrent que la DOPE est indispensable pour conférer aux lipoplexes fluorés une efficacité de transfection élevée. C'est peut être la séparation de phase entre les deux lipides qui pourrait être à l'origine d'un relargage de DOPE qui induirait une fusion membranaire entraînant l'internalisation du complexe et la libération de gene dans le cytoplasme. Dans cette première expérience, nous avons étudié l'expression totale dans un puits. Nous avons, dans un second temps, tenté d'affiner notre analyse et regardé le nombre de cellules effectivement transfectées, en utilisant le gene de la green fluorescence proteine (GFP) comme gene reporter. Afin de nous placer dans des conditions un tant soit peu biologiquement pertinentes et qui pourraient être de nature à préfigurer certains problèmes rencontrés dans le milieu circulant, nous avons également réalisé l'essentiel des évaluations en présence de sérum de veau fœtal. En effet, les éléments sériques sont pour beaucoup impliqués dans la limitation de l'efficacité des vecteurs synthétiques mais restent néanmoins incontournables dans l'optique d'une utilisation *in vivo*.

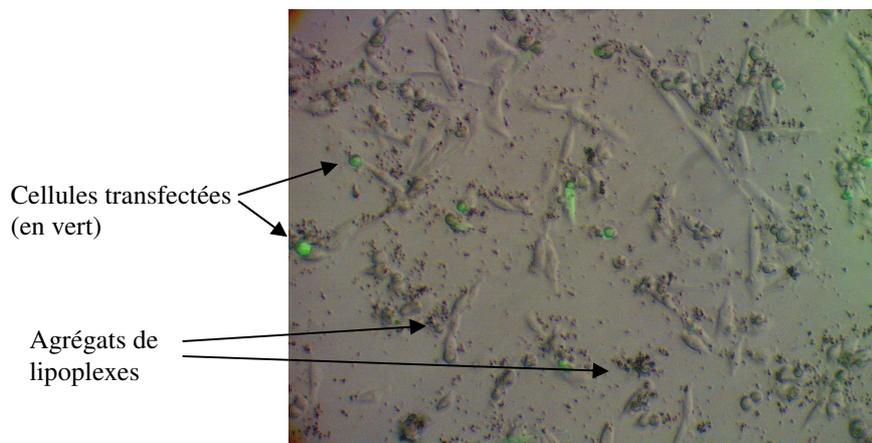


Figure 4.10. Cliché de microscopie de cellules BHK21, 24 h après transfection par des complexes $C_{10}F_6$ -TMA/DOPE-ADN, avec un rapport lipide/DOPE 1/2 et un rapport N/P de 3.

L'observation par microscopie des cellules mises en présence de lipoplexes d'ADN après 24 h d'incubation, montre que les lipoplexes fluorés forment des agrégats autour des cellules et que celles qui sont transfectées émettent une fluorescence verte (Figure 4.10). Nous avons estimé par comptage sur un échantillon représentatif que 8 à 18 % des cellules étaient transfectées avec le lipide cationique C₁₀F₆-TMA et 12 à 18 % avec C₁₀F_{6i}-TMA. Même si ce pourcentage n'est pas encore à la hauteur des polymères cationiques comme le PEI qui permettent d'atteindre jusqu'à 80 % de cellules transfectées,¹¹¹ il ne faut pas oublier que ces manipulations n'ont pas été optimisées de manière aussi extensive que pour le PEI ou d'autres lipides cationiques.

Efficacité de l'adjuvant lipidique fluoré

Afin de ne pas perturber la phase fluorée par l'incorporation des chaînes hydrocarbonées présentes dans la DOPE, nous avons synthétisé un analogue de DOPE fluoré. Les travaux effectués par le Dr Vierling ont révélé qu'un analogue de DOPE fluoré à l'extrémité de ses chaînes pouvait jouer le même rôle que la DOPE.¹¹² Nous avons donc effectué des tests de transfection en présence d'un analogue de DOPE fluoré à proximité de la tête polaire.

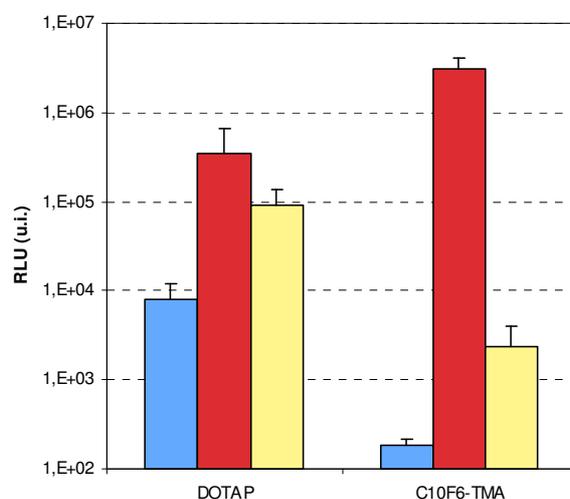


Figure 4.11. Efficacité de transfection de 2µg/puit de plasmides pEGFP_{Luc} sur des cellules BHK-21. La fluorescence est mesurée après 24 heures d'incubation avec des lipoplexes formulés sans DOPE (bleu), en présence de DOPE rapport lipide/DOPE 1/2 (rouge) et en présence de DOPE fluoré rapport lipide/DOPE 1/2 (jaune).

Le composé C₁₀F₆-TMA seul ne transfecte pas et, si l'ajout de DOPE lui confère un potentiel de transfection supérieur à celui du DOTAP, il n'en est pas de même avec l'adjuvant fluoré C_{8i}F₆-PE (DOPE fluoré) qui ne permet qu'une légère augmentation de l'efficacité de

transfection. Notre DOPE fluorée améliore les propriétés de transfection du DOTAP de façon presque aussi efficace que la DOPE. Cette augmentation de l'activité de transfection révèle que notre composé fluoré possède une activité d'adjuvant lipidique. Cette activité n'améliore que faiblement le potentiel de transfection de nos lipoplexes fluorés. Ces résultats négatifs pourraient s'expliquer par le fait que la cohésion entre la DOPE fluoré et le lipide cationique fluorés soit trop grande pour que le lipide helper puisse interagir avec la membrane de l'endosome. Cette expérience de transfection est reproductible. Malheureusement, la trop faible quantité de DOPE fluorée disponible ne nous a pas permis de confirmer plus spécifiquement par des études physicochimiques les cohésions des lipides entre eux et d'effectuer des manipulations supplémentaires afin de répondre à ces interrogations.

Influence du mode de préparation des lipoplexes

Il est largement connu que la transfection par les lipides cationiques est affectée par le mode de préparation des lipoplexes et la nature du milieu dans lesquels ils sont formulés. Nous avons donc préparé des complexes DOTAP/DOPE-ADN et C₁₀F₆-TMA/DOPE-ADN dans différents milieux et examiné leur efficacité de transfection sur des cellules BHK-21 (Figure 4.12). Les transfections effectuées dans les différentes conditions ont révélé que les lipoplexes non fluorés permettent une transfection supérieure à leurs analogues fluorés dans l'eau et dans une solution de glucose. Par contre, les constructions fluorées possèdent un meilleur potentiel de transfection en milieu fortement salin ou en milieu de culture.

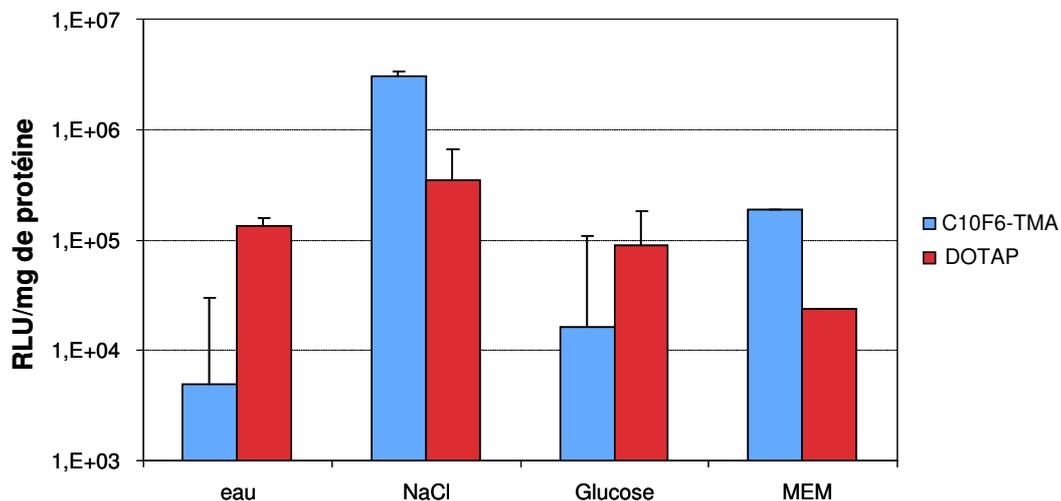


Figure 4.12. Efficacité de transfection de lipoplexes DOTAP/DOPE (bleu) et C₁₀F₆-TMA/DOPE (bordeaux) (rapport molaire 1/2, N/P 3) sur des cellules Hep-G2.

Transfection sur trois lignées cellulaires

Nous avons effectué une série de tests de transfection sur trois lignées cellulaires différentes afin de confirmer le potentiel de transfection de nos lipides (Figure 4.13). Tous les lipides fluorés ont démontré un potentiel de transfection plus ou moins important suivant les cellules étudiées. Les cellules Hela sont faiblement transfectées mais les lipoplexes fluorés apparaissent néanmoins au moins aussi efficaces que ceux à base de DOTAP, avec une petite mention pour les complexes à base de C₁₀F_{6i}-TMA qui présentent une activité légèrement supérieure. Sur la lignée BHK-21, Les composés fluorés les plus longs (C₁₀F₆-TMA et C₁₀F_{6i}-TMA) apparaissent légèrement plus actifs que le DOTAP alors que sur les cellules HepG2, connues pour être plus difficilement transfectables par des vecteurs cationiques, seul C₁₀F_{6i}-TMA rivalise avec le DOTAP.

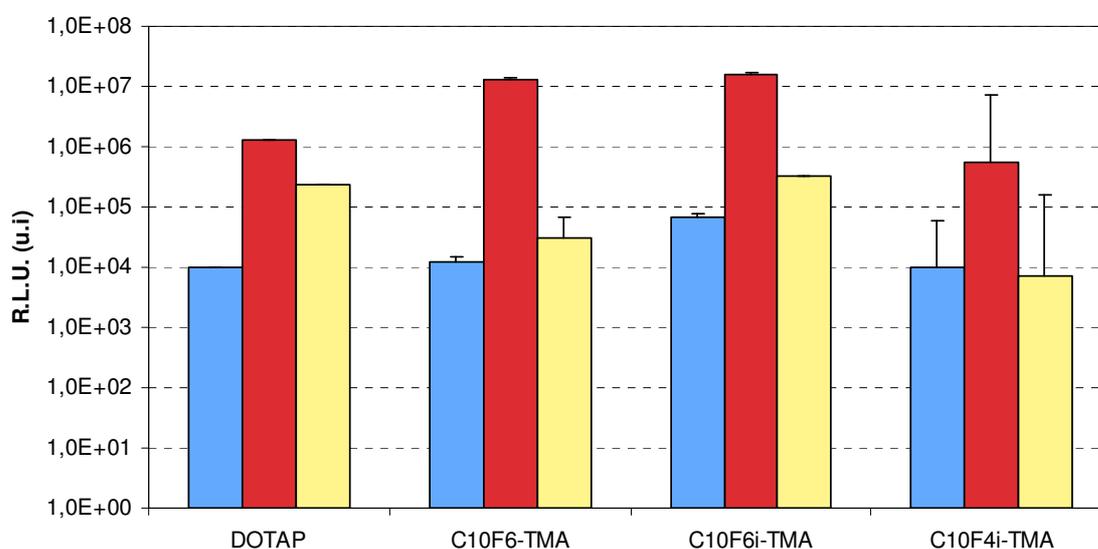


Figure 4.13. Efficacité de transfection des lipoplexes formulés avec la DOPE (rapport molaire 1/2) (2 μg d'ADN /puits) en présence de SVF (10 %) sur 3 lignées cellulaires : Hela (bleu), BHK-21 (rouge), HepG2 (jaune).

De ceci nous pouvons conclure que nos vecteurs lipidiques fluorés possèdent un potentiel de transfection *in vitro* assez semblable à celui du DOTAP.

Cytotoxicité

Les premiers tests de viabilité cellulaire effectués avec les lipides fluorés ont révélé qu'ils possèdent une toxicité assez sensiblement inférieure à celle du DOTAP sur la lignée BHK-21 (Figure 4.14).

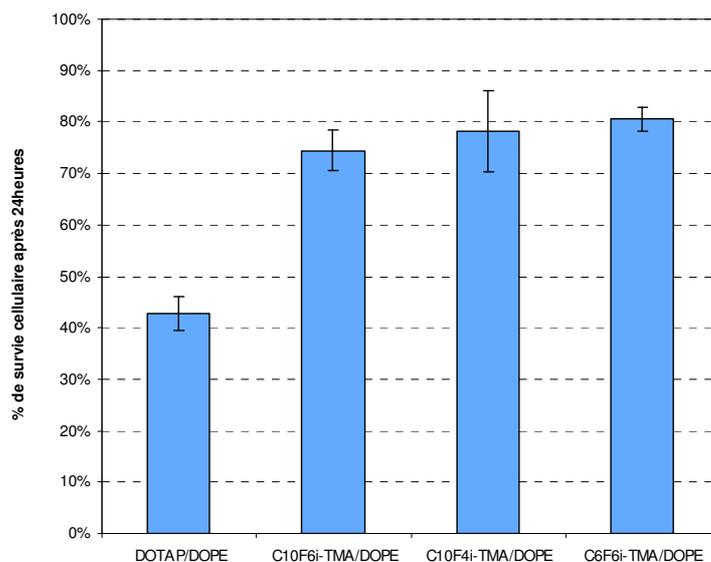


Figure 4.14. Évaluation de la cytotoxicité des lipoplexes formulés avec des lipides fluorés (rapport lipide/DOPE 1/2, N/P = 3, 2µg/puits) en présence de 10 % de SVF sur des cellules BHK-21 50.000 cellules (18 µMde lipides cationiques dans 1ml de milieu) par mesure de l'activité enzymatique des mitochondries cellulaires (MTT).

La cytotoxicité du lipide C₁₀F₆-TMA a été évaluée sur trois lignées cellulaires différentes dans les conditions de transfection optimales (Figure 4.15). Pour les cellules BHK-21 et HepG2, les particules fluorées présentent une cytotoxicité comparable à celle du DOTAP. Par contre, nous observons une toxicité sensiblement plus faible des particules fluorées sur la lignée Hela.

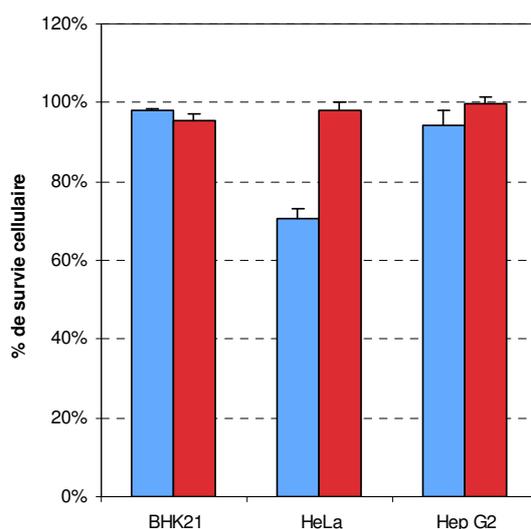


Figure 4.15. Évaluation de la cytotoxicité des complexes DOTAP/DOPE-ADN (bleu) et C₁₀F₆-TMA/DOPE-ADN (rouge) sur 3 lignées cellulaires, dans les conditions de transfection optimales, par mesure de l'activité enzymatique des mitochondries cellulaires pour 50.000 cellules (18 µMde lipides cationiques dans 1ml de milieu).

Évolution de la transfection à 24 h et 48 h

Au vu de la stabilité accrue des lipoplexes fluorés (*vide supra*), nous avons entrepris de suivre l'évolution de la transfection au cours du temps. En effet, on pourrait s'attendre à ce que les lipoplexes fluorés relarguent l'ADN plus lentement que leurs homologues hydrocarbonés et, donc, que la cinétique d'expression de la luciférase soit retardée. Nous avons donc mesuré l'expression de la protéine fluorescente 24 et 48 h après la transfection (Figure 4.16).

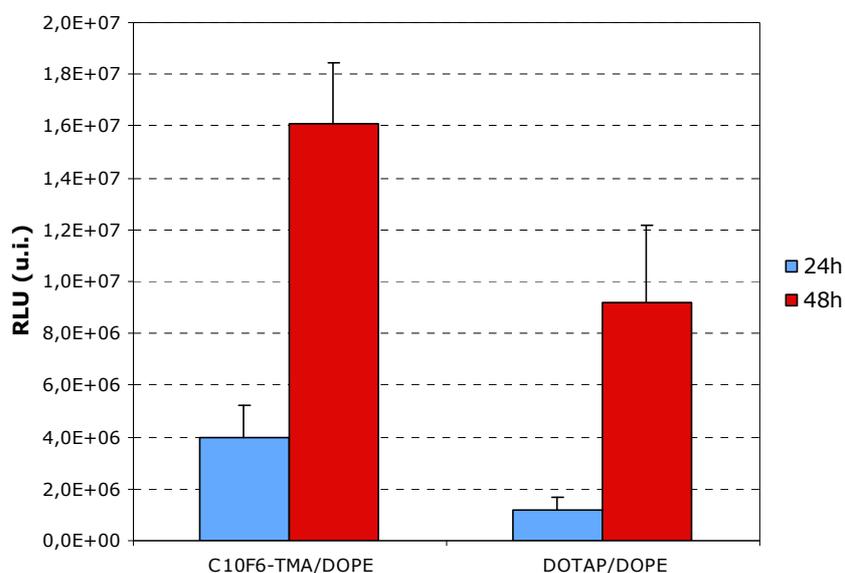


Figure 4.16 : Expression de la luciférase dans des cellules BHK-21, 24 h (gris) et 48 h (rose) après traitement avec les complexes C₁₀F₆-TMA/DOPE-ADN et DOTAP/DOPE-ADN (bleu) (rapport lipide/DOPE 1/2, N/P 3), en présence de 10 % de SVF.

Les mesures de fluorescence ont logiquement révélé que le taux de transfection augmente en fonction du temps avec les deux types de lipoplexes, les lipoplexes à base de C₁₀F₆-TMA transfectent mieux que leur analogue hydrocarboné à 24 h. Cependant, si la transfection par les particules fluorées reste plus efficace à 48 h, le taux de transfection augmente proportionnellement moins qu'avec les complexes DOTAP/DOPE-ADN. De ceci on peut raisonnablement conclure que la cinétique de transfection n'est pas radicalement modifiée par la présence du fluor dans les lipoplexes ou, tout au moins, qu'elle n'est pas sensiblement ralentie.

2.2 Les composés polycationiques

2.2.1 Propriétés physicochimiques des complexes

Complexation de l'ADN

Les mêmes expériences de migration sur gel d'agarose que celles décrites plus haut ont été entreprises avec des lipoplexes formulés avec le DOGS et ses analogues fluorés, en présence ou absence de DOPE. Les complexes formés avec le DOGS se sont révélés être stables sur quasiment toute la gamme de concentration utilisée précédemment pour l'étude des lipides monocationiques. Nous avons donc élargi cette gamme et les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 4.3.

Lipide cationique	Résistance au détergent (mM)				
	Tween 80	SDS	NaCh	CTAB	CHAPS
DOGS	150	1	150	10 (50)	150
C ₁₀ F ₆ -Sp	1000	/	1000	150 (250)	1000
C ₁₀ F ₄ -Sp	(350)	0,1	(350)	350	(350)
C ₆ F ₆ -Sp	350	<350	(350)	<350	350
DOGS/DOPE	50 (100)	(1)	50 (100)	10 (50)	150
C ₁₀ F ₆ -Sp/DOPE	/	/	/	/	/
C ₁₀ F ₄ -Sp/DOPE	350	<350	350	350	350
C ₆ F ₆ -Sp/DOPE	350	<350	(350)	350	(350)

Tableau 4.3. Tests de stabilité des lipoplexes formulés à l'aide du DOGS et des analogues hémifluorés du DOGS à un rapport N/P de 3, en présence ou non de DOPE (rapport lipide/DOPE 1/2). La concentration rapportée correspond à la plus haute examinée à laquelle les lipoplexes étaient préservés à 100 %. Aux concentrations indiquées entre parenthèses, seulement une petite partie du plasmide est relarguée ($\pm 10\%$).

Comme attendu, les lipoplexes fluorés présentent une stabilité supérieure à leurs homologues hydrocarbonés et ce, en présence de quasiment tous les détergents testés, qu'ils soient non ioniques, anioniques, cationiques ou zwitterioniques. Le détergent neutre Tween 80 déstabilise les complexes hydrocarbonés à partir de 150 mM, concentration à laquelle les complexes fluorés ne sont pas altérés.

Comme on l'a déjà vu dans le cas des lipides monocationiques, le SDS est très destructurant pour les lipoplexes et semble être un détergent trop agressif pour observer des différences de stabilité de lipoplexes. Par contre le cholate de sodium nous permet une étude plus fine des stabilités des auto-assemblages. Les lipoplexes hydrogénés sont stables jusqu'à une concentration de 150 mM. Tous les lipoplexes formulés avec des lipides fluorés présentent une stabilité totale ou partielle à 350 mM. Les complexes formés avec le lipide C₁₀F₆-Sp sont stables jusqu'à une concentration de 1 M, alors que ceux formés avec C₆F₆-Sp et C₁₀F₄-Sp sont déjà altérés à 350 mM.

Le CTAB déstabilise les lipoplexes hydrocarbonnées à une concentration supérieure à 50 mM. Les lipoplexes formulés avec C₁₀F₆-Sp sont stables à une concentration de 150 mM et commencent à relarguer leur ADN à partir de 250 mM. Les complexes C₁₀F₆-Sp/DOPE-ADN et C₆F₆-Sp/DOPE-ADN sont stables en présence de CTAB 350 mM.

Les lipoplexes hydrogénés sont résistants face au CHAPS (zwitterionique) jusqu'à une concentration de 150 mM. Par contre aucun lipoplexe fluoré n'est déstabilisé à cette concentration. Les lipoplexes formulés avec C₁₀F₄Sp commencent à relarguer leur ADN à partir de 350 mM. Ceux issus de C₆F₆-Sp sont totalement stables à cette concentration et jusqu'à 1 M. L'influence de la présence de DOPE dans les lipoplexes est difficile à cerner car ce lipide déstabilise les lipoplexes formulés avec C₆F₆-Sp et stabilise ceux formulés avec C₁₀F₄-Sp.

Comme attendu, les lipoplexes préparés à partir des lipides fluorés présentent des stabilités supérieures à leurs homologues non fluorés, en présence de quasiment tous les détergents étudiés.

Les expériences réalisées pour évaluer la stabilité des lipoplexes ont révélé que nos constructions lipidiques fluorées résistaient mieux à l'action des détergents que leurs analogues non fluorés, que ce soit en série monocationique ou polycationique. Les complexes formulés avec les lipides monocationiques résistent moins bien face aux détergents que les complexes formulés avec les lipides polycationiques. Ceci peut être expliqué par la coopérativité des interactions électrostatiques qui peut exister en série polycationique, celle-ci étant bien entendu absente en série monocationique. De manière générale, la stabilité des lipoplexes face aux détergents apparaît proportionnelle à la longueur de la chaîne fluorée. Les analogues possédant une chaîne comportant 6 groupements difluorométhylène se sont révélés être particulièrement aptes à formuler des lipoplexes stables en présence de détergent.

Au vu des résultats prometteurs obtenus en présence de DOPE, nous avons effectué l'essentiel des études ultérieures sur ces composés (mesure de taille, potentiel zêta, observation en microscopie électronique) en présence de ce « lipid helper » (rapport molaire lipide/DOPE 1/2).

Taille des lipoplexes

Les particules de transfection fluorées polycationiques présentent une taille légèrement plus petite que leurs homologues hydrocarbonnées. Pour ces dernières, on observe une légère augmentation de taille en fonction du temps (+20 %). Les particules fluorées, quant à elles, apparaissent plus stables dans la gamme de temps explorée, avec une très légère diminution de la taille en 3 heures (-5 %).

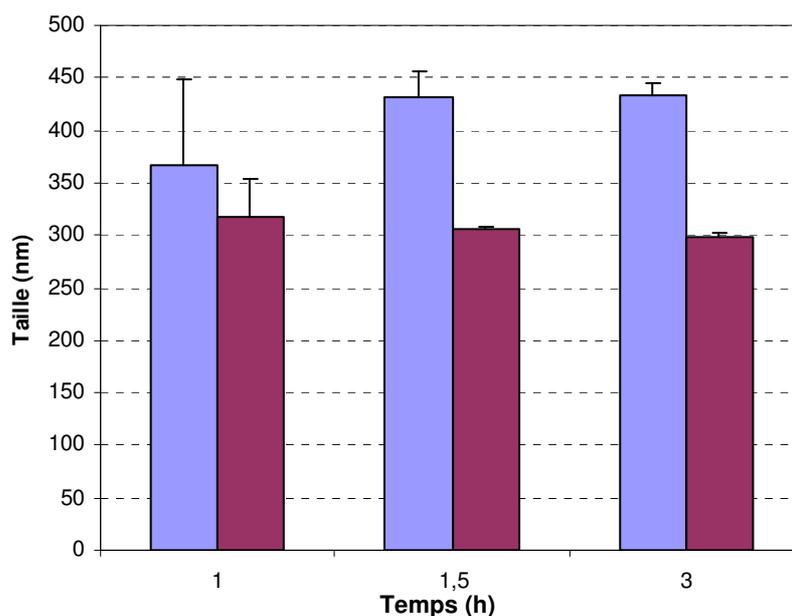


Figure 4.17. Évaluation de la taille des particules de transfection DOGS/DOPE-ADN (bleu) et C₁₀F₆-Sp/DOPE-ADN (bordeaux) (N/P 3) au cours du temps.

Les particules de transfection fluorées polycationiques présentent une taille légèrement plus petite que leurs analogues hydrogénés et apparaissent relativement stables sur la gamme de temps explorée. Pour les particules à base de DOGS, on observe une légère augmentation de la taille en fonction du temps.

Potentiel Zêta des particules

En parallèle de la taille, nous avons également mesuré la charge des complexes. Pour un même rapport de charge (N/P 3), les complexes C₁₀F₆-Sp/DOPE-ADN présentent une charge légèrement plus élevée que DOGS/DOPE-ADN (51,2 mV vs. 48,7 mV).

Morphologie des complexes

Comme dans le cas des lipides monocationiques, seul un petit nombre de clichés de microscopie électronique ont été obtenus. Nous n'avons pas décelé de différences significatives entre la morphologie des complexes fluorés et hydrocarbonés. Les lipoplexes issus de lipides polycationiques présentent une structure allongée tubulaire (comme précédemment montré¹¹³), que les lipides soient fluorés ou non. Il faut toutefois noter que la présence de fluor rend les lipoplexes plus difficiles à visualiser. En effet la forte hydrophobie

de chaînes fluorées rend difficile la diffusion des sels d'uranyl sur les complexes qui apparaissent souvent avec un contraste peu marqué.

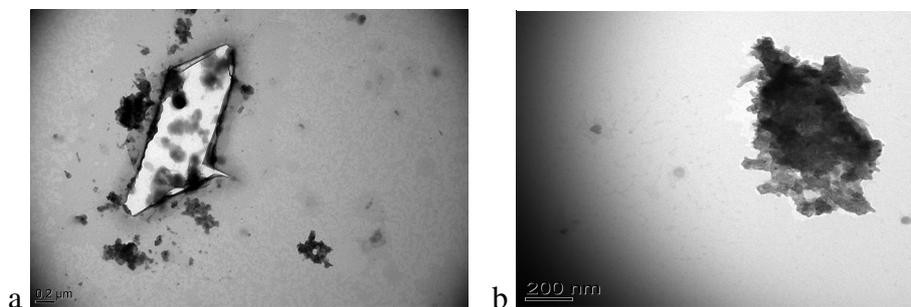


Figure 4.19. Clichés de microscopie électronique en coloration négative de complexes $C_{10}F_6$ -Sp/DOPE-ADN (a) et DOGS/DOPE-ADN (b) (N/P 3).

2.2.2 Propriétés en transfert de gène

Influence de la DOPE sur la transfection

Le composé $C_{10}F_6$ -Sp possède un potentiel de transfection qui s'exprime uniquement en présence de DOPE (Figure 4.20). À partir de ce constat, nous avons décidé de réaliser toutes les expériences de transfection ultérieures en présence de DOPE.

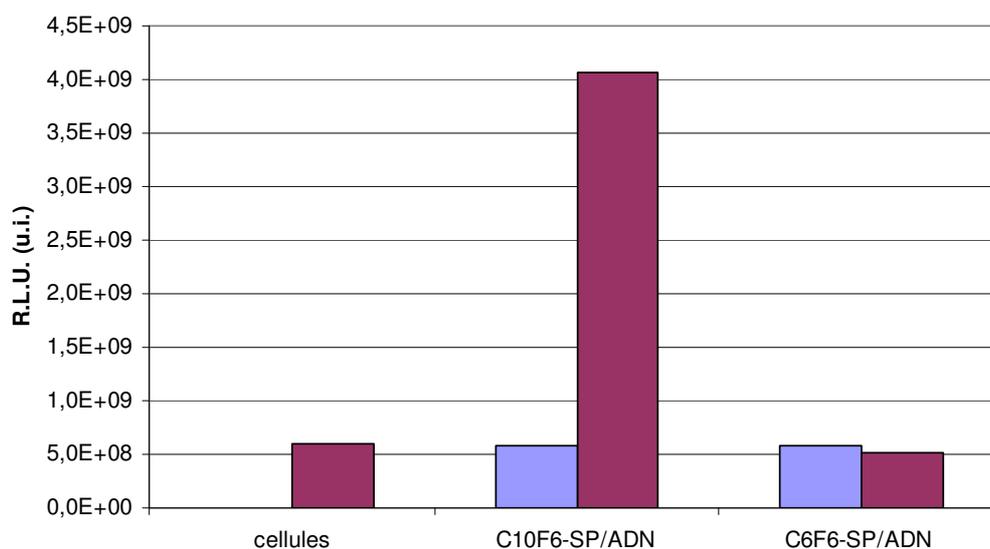


Figure 4.20. Activité de transfection sur cellules BHK-21 de $C_{10}F_6$ Sp (bleu) et $C_{10}F_6$ Sp/DOPE (1/2) (bordeaux) à un rapport N/P 5, 2 μ g/puits, dans NaCl 150 mM et en présence de 10% de SVF.

Évaluation du rapport N/P optimal

Les résultats obtenus en transfectant des cellules BHK-21 à différents rapports N/P ont mis en évidence qu'un rapport N/P de 3 entraîne une transfection optimale pour un lipide fluoré polycationique comme le C₁₀F₆-Sp (Figure 4.21). Nous avons dès lors effectué les tests de transfection à cette valeur du rapport N/P.

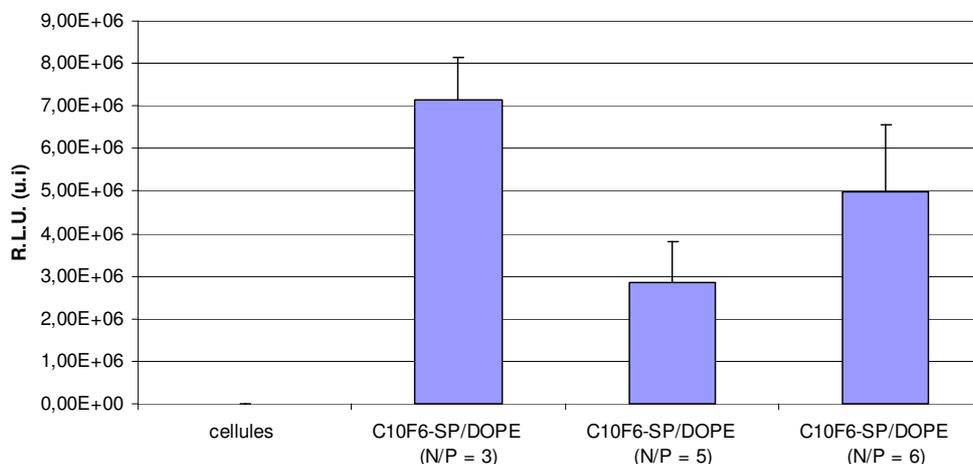


Figure 4.21. Activité de transfection des complexes C₁₀F₆Sp/DOPE-ADN à différents rapports N/P, en présence de 10 % de SVF.

Influence du sérum

Nous avons évalué l'influence de la présence de sérum lors de la préparation des lipoplexes sur l'efficacité de transfection par les différents lipides polycationiques fluorés. Ces évaluations ont été réalisées sur la lignée cellulaire HepG2 et montrent que la présence de SVF ne modifie pas sensiblement l'activité des lipoplexes (Figure 4.22).

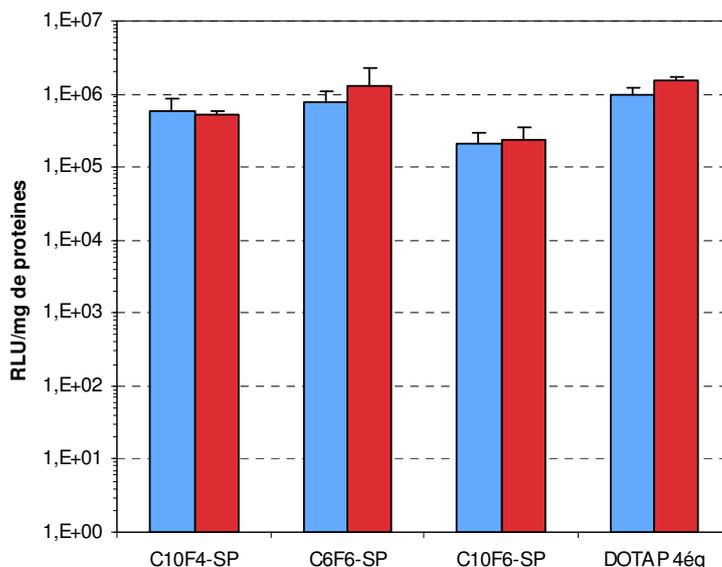


Figure 4.22. Influence de la présence de sérum (rouge 0 %, bleu 25 %) lors de la préparation des lipoplexes sur leur efficacité de transfection des cellules HepG2. (2µg d'ADN/puits rapport lipide/DOPE 1/2, N/P de 3).

Cytotoxicité des lipides polycationiques

L'évaluation des formulations polycationiques fluorées fait apparaître une cytotoxicité nettement plus importante que celle du DOGS (Figure 4.23). Il semble que la longueur de la chaîne fluorée n'a que peu d'impact sur la cytotoxicité des lipides. On peut noter que le lipide possédant le meilleur potentiel de transfection ($C_{10}F_6Sp$) est aussi le moins toxique.

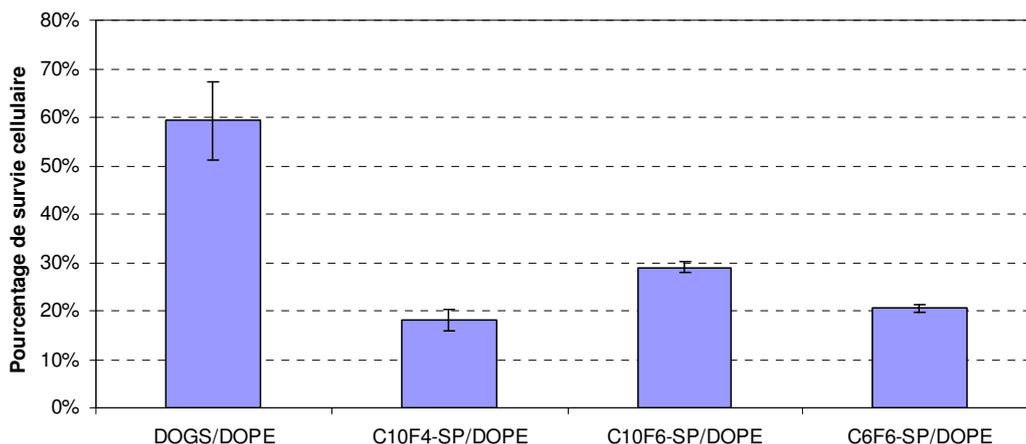


Figure 4.23. Évaluation de la cytotoxicité des lipoplexes formulés avec les lipides polycationiques (rapport lipide/DOPE 1/2, N/P 3) en présence de 10% de SVF, sur des cellules BHK 21 pour 50.000 cellules (18 μ M de lipides cationiques dans 1ml de milieu) par mesure de l'activité enzymatique des mitochondries cellulaires (MTT).

2.3 Conclusion

Les lipides cationiques hémifluorés synthétisés au laboratoire ont révélé des propriétés d'auto-assemblage intéressantes. En présence d'ADN et de DOPE, le lipide monocationique $C_{10}F_6$ -TMA s'auto-assemble en particules de même taille que celles préparées à partir du DOTAP. Le lipide $C_{10}F_{6i}$ -TMA semble s'agréger en particules plus grosses qui évoluent vers une population assez hétérogène. Les lipoplexes formulés à partir de ces deux lipides présentent une charge positive moins importante que celle des lipoplexes à base de DOTAP. Les lipoplexes fluorés présentent une morphologie très similaire à celle de leurs homologues non fluorés.

Nous avons mis en évidence que nos constructions fluorées résistaient nettement mieux que leurs analogues hydrogénés à la présence de détergents. Cette stabilité accrue permet néanmoins de vectoriser de l'ADN vers le noyau des cellules. Les tests effectués sur trois lignées cellulaires différentes ont révélé que nos constructions présentent les mêmes potentialités de transfection que le lipide de référence, le DOTAP, avec une cytotoxicité équivalente. L'incorporation d'un segment fluoré à proximité de la tête polaire a donc permis

de former des lipoplexes plus stables tout en conservant le potentiel de transfection des vecteurs et sans en augmenter la toxicité. Des tests effectués sur 24 et 48 h ont révélé une augmentation de la transfection à 48 h. Cette augmentation est moins importante que celle observée avec le DOTAP de référence et on peut raisonnablement conclure que la cinétique de transfection n'est pas radicalement modifiée par la présence du fluor dans les lipoplexes ou, tout au moins, qu'elle n'est pas sensiblement ralentie.

Au niveau des lipides polycationiques les tests de stabilité en présence de détergents effectués à des concentrations plus importantes que celles utilisées pour les lipides monocationiques ont révélé que l'incorporation de fluor au sein des lipides, et en particulier à proximité de la tête polaire, permet également de fortement stabiliser les lipoplexes. La taille de ceux-ci est apparue relativement stable au cours du temps. Comme dans le cas des lipides monocationiques, les observations en microscopie n'ont pas révélé de différence de morphologie entre des lipoplexes polycationiques fluorés et non fluorés. Tous les lipides polycationiques testés ont montré un potentiel de transfection intéressants. Cependant, seules les particules formulées avec C₁₀F₆-Sp ont pu transférer des cellules BHK-21 avec une efficacité comparable à celle du DOGS. Enfin, les lipides polycationiques fluorés présentent tous une cytotoxicité supérieure à celle du DOGS de référence.

L'ensemble des travaux qui ont été réalisés sur les lipides cationiques fluorés ont révélé qu'ils complexent l'ADN pour former des particules comparables à celles issues de lipides cationique hydrocarbonés. Nous avons mis en évidence la plus grande stabilité des particules fluorées par rapport à leurs analogues hydrocarbonés en présence de détergent. Cette plus grande stabilité n'affecte pas pour autant leur potentiel de transfection, tandis que leur cytotoxicité est quasi équivalente à celle de leurs analogues hydrogénés, en tout cas en ce qui concerne la série monocationique.

Chapitre 5

Synthèse des lipides fluorés

1 Rappels bibliographiques

1.1 Phosphates et esters phosphoriques

1.1.1 Généralités

Les anhydrides et les esters phosphoriques dominent le monde du vivant. Pour ne citer que quelques exemples, ils sont présents au sein des oligonucléotides, des peptides phosphorylés, des sphingolipides, des glycosyl phosphates et des inositol phosphates. Les analogues de composés phosphorylés naturels sont largement employés en biologie et en médecine. La préparation de ce type de composés peut passer par l'élaboration d'intermédiaires protégés, ce qui facilite grandement les différentes étapes de synthèse et de purification. Il existe différents problèmes liés à la protection et à la déprotection des acides phosphoriques. En effet, le groupement phosphate possède trois fonctions acides, avec des valeurs de pKa différentes ($pK_{a1} = 2,12$; $pK_{a2} = 7,21$; $pK_{a3} = 12,66$).¹¹⁴ Cette large différence de pKa reflète les différences de stabilité en milieu basique des esters correspondants. Par exemple, le temps de demi-vie du triméthylphosphate dans une solution normale de soude à 35° C est de 30 minutes alors qu'il est de 11 ans pour le phosphate de diméthyle.¹¹⁵ Ceci provient du fait qu'une charge négative localisée à proximité de l'atome de phosphore rend beaucoup plus difficile une attaque par un ion hydroxyde ou tout autre nucléophile. Par contre, les esters phosphoriques sont clivés en milieu acide sans grande distinction de sensibilité entre les esters.¹¹⁵

1.1.2 Protection des phosphates

La protection d'un groupe phosphate peut être introduite directement en partant de l'oxychlorure de phosphore. Le groupement protecteur est introduit par réaction du chlorure d'acide avec un alcool pour former la liaison ester désirée (Figure 5.1).

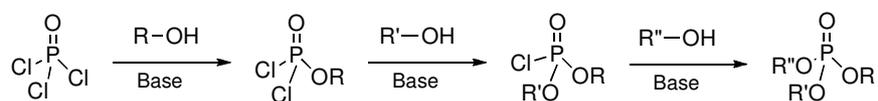


Figure 5.1. Réaction de formation d'un phosphotriester à partir de POCl₃.

On peut contourner le problème de la réactivité modérée de l'oxychlorure de phosphore en utilisant le trichlorure de phosphore, PCl₃, ou un dérivé (Figure 5.2).¹¹⁶ L'oxydation du phosphite intermédiaire en phosphate peut être réalisée sans difficulté avec de l'iode en milieu aqueux.¹¹⁶

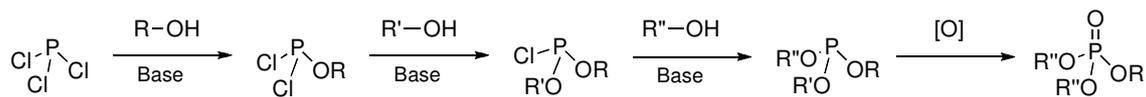


Figure 5.2. Formation de phosphotriester à partir de PCl_3 .

L'inconvénient majeur de cette stratégie réside dans la sensibilité des intermédiaires à tout nucléophile et, en particulier, à l'eau. Pour pallier ce problème, une approche basée sur l'utilisation de phosphoramidites a été développée. Cette voie de synthèse emploie comme réactif de départ des dérivés de type $\text{R'OP}(\text{NR}_2)_2$ qui réagissent avec un équivalent d'alcool (réaction catalysée par des espèces comme le 1*H*-tétrazole) pour former le diester $\text{R'OP}(\text{OR''})\text{NR}_2$ qui est relativement stable et facile à manipuler.¹¹⁷ Le produit de réaction est ensuite facilement converti en phosphite par réaction avec un second alcool (également catalysée par le 1*H*-tétrazole). Pour finir, une réaction d'oxydation à l'iode en milieu aqueux conduit au phosphotriester.

Un certain nombre de protections du groupe phosphate ont été développées au cours des dernières années et ont fait l'objet de plusieurs revues.^{118,119} Nous allons très brièvement passer en revue les principales.

• Groupement phényle

Le groupement phényle est le groupement protecteur type. La déprotection est réalisée en milieu basique par coupure de la liaison P-O. Toutefois, les conditions nécessaires sont assez rudes (chauffage, base concentrée).¹²⁰ Différents substituants peuvent être introduits sur le cycle aromatique pour moduler les conditions de déprotection. L'hydrolyse passe probablement par un intermédiaire pentacoordiné et procède par départ de l'ion phénate qui est un meilleur groupement partant que l'alcoolate (Figure 5.3).

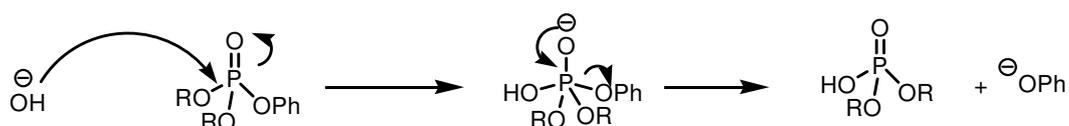


Figure 5.3. Mécanisme réactionnel de la déprotection d'un groupement phényle en milieu basique.

• Groupement cyanoéthyle

Le groupement β -cyanoéthyle est déprotégé en milieu basique par β -élimination (Figure 5.4). L'inconvénient majeur de cette méthode relativement douce est de conduire à des dérivés acryliques qui polymérisent dans le milieu et rendent la mise en œuvre délicate.

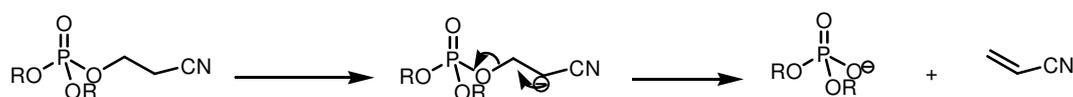


Figure 5.4. Mécanisme réactionnel de déprotection du groupement cyanoéthyle.

- *Groupement méthyle*

Le groupement méthyle est le prototype de protection clivable par réaction de substitution (Figure 5.5). De nombreux nucléophiles ont été décrits pour réaliser cette transformation (NaI,¹²¹ KCN,¹²⁵ NMe₃,¹²² *t*BuNH₂,¹²³ TMSBr¹²⁴...). Cette méthode présente l'avantage de permettre, dans certains cas, une monodéprotection sélective.^{125,126}



Figure 5.5. Mécanisme réactionnel de déprotection du groupement méthyle.

- *Groupement trichloroéthyle*

La déprotection fait intervenir une réaction d'oxydo-réduction.¹²⁷ La réduction par un métal conduit à un anion qui subit une β -élimination pour donner l'anion phosphate correspondant (Figure 5.6). Ce groupement est stable en conditions acides ou légèrement basiques. Il est clivé, par exemple, par le couple Cu/Zn dans le DMF.¹¹⁸

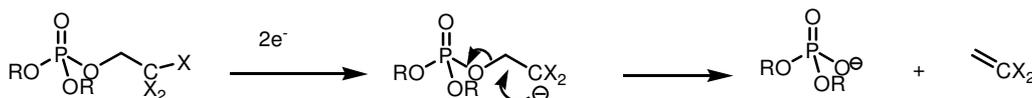


Figure 5.6. Mécanisme de déprotection des groupements trichloroéthyle par réduction.

- *Groupement benzyle*

Le groupement benzyle peut être clivé par hydrogénéolyse, réaction qui présente l'avantage de ne nécessiter qu'une filtration du catalyseur pour obtenir le produit déprotégé.¹²⁸

- *Groupement t-butyle*

Très peu de groupements protecteurs sont clivables en milieu acide et le groupement *t*-butyle en fait partie.¹²⁹ L'inconvénient majeur à l'utilisation de ce groupement est son encombrement stérique qui rend la préparation des esters difficile.

Les groupements méthyle et benzyle sont des groupes protecteurs de choix de par leur facilité d'utilisation et d'élimination. Au cours de notre travail, nous avons opté pour le groupement benzyle en raison de la facilité de mise en œuvre de la déprotection par hydrogénéolyse.

1.2 Phosphatidylcholines

De nombreuses voies d'accès aux phospholipides, phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines en particulier, ont été décrites dans la littérature. Nous ne présenteront que les stratégies que nous avons mises en œuvre dans le cadre de notre travail.

• Estérification de la glycérophosphocholine

Un grand nombre de phospholipides modifiés ont été décrits dans la littérature dont l'accès procède par acylation de la glycérophosphocholine (Figure 5.7).

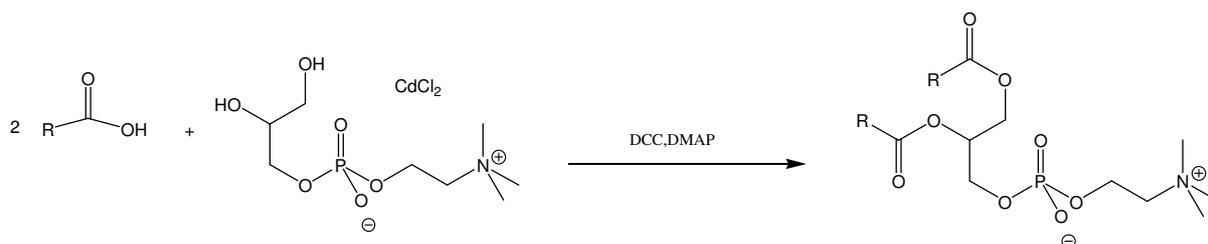


Figure 5.7. Estérification de la glycérophosphocholine par des acides gras.

Ainsi, les acides gras d'intérêt sont mis à réagir avec un complexe de L- α -glycérophosphocholine avec le chlorure de cadmium (plus soluble en milieu organique que la L- α -glycérophosphocholine) en conditions anhydres, en présence de DCC et de DMAP.¹³⁰

• Estérification d'une espèce activée du phosphore V

Une autre voie de synthèse consiste à condenser le 2-bromoéthylidichlorophosphate avec un diacyl glycérol.¹³¹ Cette stratégie a été employée par le groupe de P. Vierling pour la préparation de dérivés localement fluorés de PC.

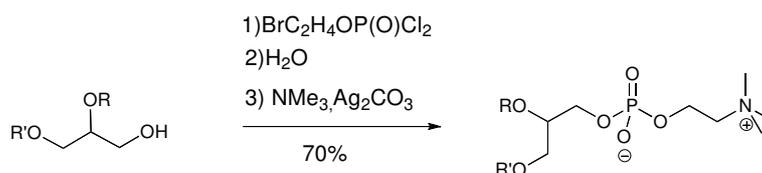


Figure 5.8. Voie de synthèse utilisée pour la synthèse de phosphatidylcholines en deux étapes.

La dernière étape de cette synthèse consiste à fonctionnaliser la tête polaire par substitution du bromure par la triméthylamine. Lorsque cette méthode a été utilisée pour préparer des PC fluorées, des rendements de l'ordre de 70 % ont été obtenus.¹³²

Une méthode de préparation de glycérophosphocholine très similaire consiste à substituer séquentiellement les atomes de chlore de l'oxychlorure de phosphore par un diacylglycérol, le tosylate de choline, puis l'eau (Figure 5.9). Les trois étapes peuvent être

réalisées en « un pot » sans isoler les intermédiaires réactionnels. Cette méthode permet d'atteindre des rendements entre 60 et 90 %.^{132,133}



Figure 5.9. Voie de synthèse utilisée pour la préparation de phosphatidylcholines en une étape.

On peut mentionner en outre la possibilité de passer par un intermédiaire chlorophosphate cyclique (Figure 5.10). Dans un premier temps, une esterification du chlorophosphate en présence de base azotée conduit au phosphotriester cyclique qui, en présence de triméthylamine, évolue vers la phosphatidylcholine.¹³⁴ Le rendement obtenu pour ces deux étapes est de l'ordre de 75 %.

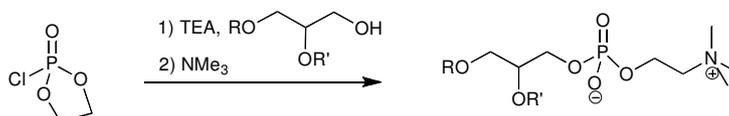


Figure 5.10. Synthèse par l'intermédiaire d'un chlorophosphate cyclique.

1.3 Phosphatidyléthanamines

La synthèse de phosphatidyléthanamines peut procéder par des voies similaires à celles empruntées pour la synthèse des phosphatidylcholines. Ainsi, à partir d'oxychlorure de phosphore, deux atomes de chlore peuvent être consécutivement déplacés par un diacylglycérol et la *N*-Boc-éthanamine, la troisième liaison P-Cl étant ensuite hydrolysée et la fonction amine déprotégée en milieu acide (Figure 5.11). Cette méthode utilisée dans la synthèse de PE fluorée a donné lieu à des rendements entre 50 et 55 %.¹³²

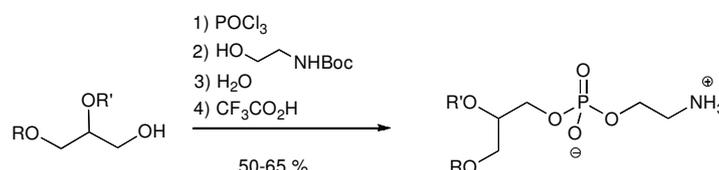


Figure 5.11. Voie de synthèse utilisée pour la préparation de phosphatidyléthanamines.

1.4 Composés hémifluorés

L'étape clé de la synthèse des acides gras hémifluorés est la formation de la liaison CF₂-CH₂. Celle-ci procède essentiellement par perfluoroalkylation d'alcènes. La réaction est

radicalaire et, selon les conditions expérimentales et les réactifs mis en jeu, elle peut être oxydante ou réductrice (Figure 5.12).

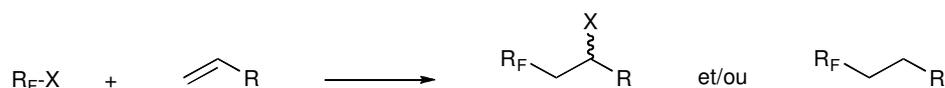


Figure 5.12. Réaction de perfluoroalkylation d'alcène.

1.4.1 Fluoroalkylation d'alcènes

Différentes réactions d'addition d'halogénures perfluorés sur des alcènes sont décrites dans la littérature. Celles-ci utilisent notamment les réactifs suivants : Zn/NiCl₂/PPh₃,¹³⁵ Cu,¹³⁶ (NH₄)₂S₂O₈/HCO₂Na,¹³⁷ Na₂S₂O₄.¹³⁸

• Complexe Zn/NiCl₂/PPh₃

Chen et son équipe ont mis au point une réaction catalysée par un complexe métallique du nickel(0) permettant de fonctionnaliser des perfluoroalcanes chlorés (Figure 5.13).¹³⁵

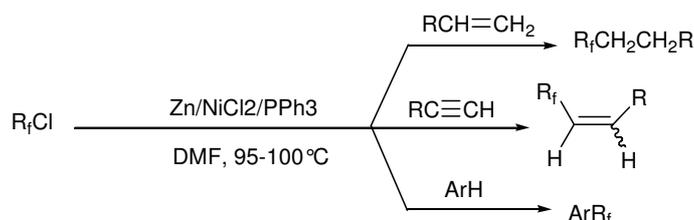


Figure 5.13. Réaction de couplage catalysée par le nickel(0), selon Chen *et al.*

L'équipe du Dr Chen suggère un mécanisme radicalaire SET (single electron transfert) qui va aboutir à un radical R_F[•] qui va ensuite s'additionner sur l'alcène engendrant l'intermédiaire A. Ce dernier n'est pas suffisamment réactif pour propager la réaction car la liaison R_FCl est trop forte. Cependant il va capter un hydrogène du solvant. La formation de composé R_FH tend à confirmer cette hypothèse. La quantité de produit secondaire R_FH est fortement diminuée par la présence de PPh₃, mais le mécanisme n'est pas encore clairement établi. De manière similaire, le radical R_F[•] s'additionne sur des alcynes ou des composés aromatiques et engendre un alcène perfluoroalkylé ou des composés aromatiques substitués.

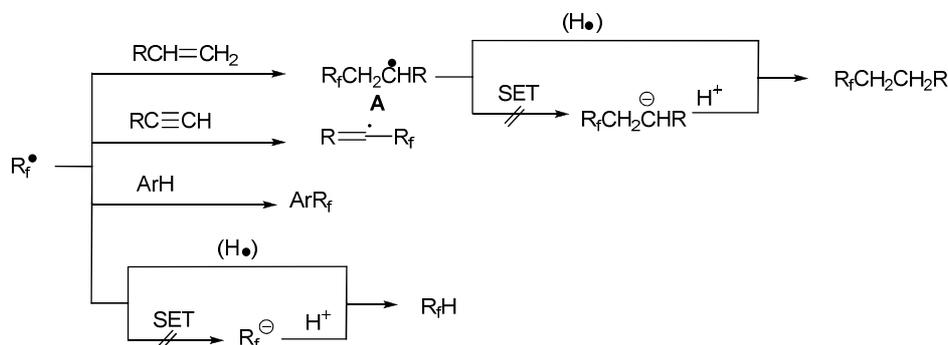
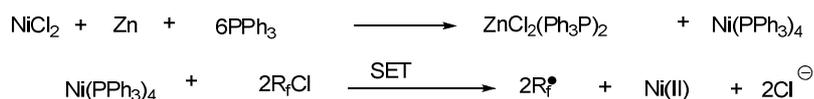


Figure 5.14. Mécanisme réactionnel proposé par l'équipe du Dr Chen.

• *Catalyse au Cu*

Chen a également développé l'addition d'halogénures fluorés sur des substrats éthyléniques en présence de cuivre (Figure 5.15).¹³⁶ L'influence des solvants utilisés pour cette réaction a été étudié. Ainsi, un solvant électrodonneur tel que le HMPA ou la pyridine vont orienter la réaction vers le produit B alors que des solvants moins électrodonneurs vont favoriser la formation du composé A.

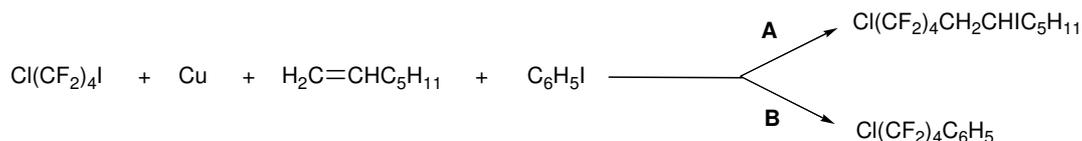


Figure 5.15. Réaction de couplage catalysée par le cuivre, selon Chen *et al.*

L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène serait que des solvants peu ou pas électrodonneurs favorisent la stabilisation du radical R_f^\bullet alors que des solvants électrodonneurs stabilisent RfCuI .

• *Couple $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCO}_2\text{Na}$*

Le couple redox $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCO}_2\text{Na}$ est également décrit comme permettant la fonctionnalisation de perfluoroalcanes.¹³⁷

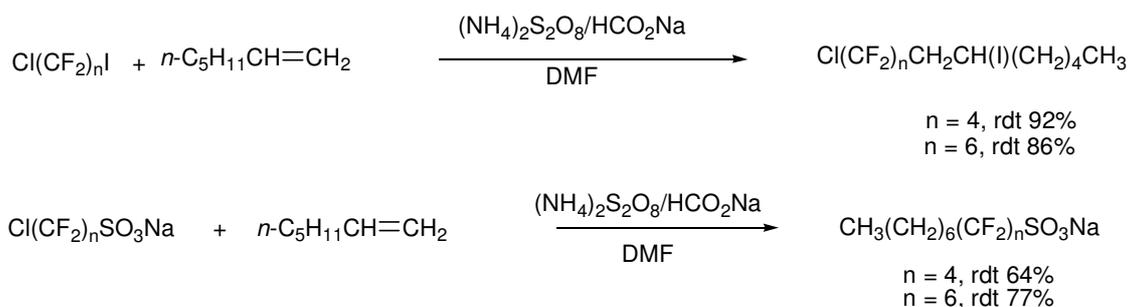


Figure 5.16. Réaction de couplage faisant intervenir $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCO}_2\text{Na}$, selon Hu *et al.*

Cette réaction a lieu dans des solvants polaires aprotiques. Elle semble être initiée par un transfert monoélectronique. Des tests de couplage effectués sur des dérivés bifonctionnels chloro iodoperfluoroalkane montrent que quelle que soit la stœchiométrie utilisée, seule la liaison carbone iode est clivée.

• *Couple $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NaHCO}_3$* ¹³⁸

Dans le cas des chloroperfluoroalkanes, le radical R_F^\bullet initié par le couple $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NaHCO}_3$ s'additionne sur la double liaison puis arrache plus ou moins rapidement un radical hydrogéné au solvant (Figure 5.16).¹³⁹ Dans le cas des chloroperfluoroalkanes (R_FCl), le couplage est réducteur mais les rendements obtenus sont généralement modestes.

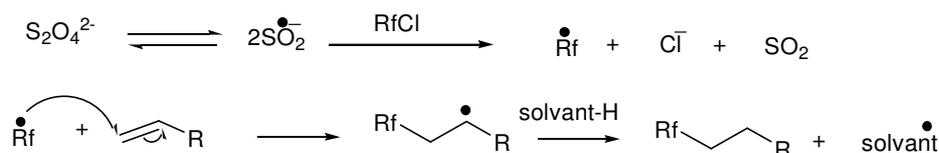


Figure 5.17. Mécanisme réactionnel de couplage d'alcène avec un composé chloroperfluoré.¹³⁸

Dans le cas des iodoperfluoroalkanes (R_FI), le couplage est plus efficace mais conduit au produit oxydé (Figure 5.17). Le mécanisme réactionnel fait également intervenir un radical R_F^\bullet qui s'additionne sur la double liaison pour former un second radical qui participe à la propagation de la réaction et aboutit à un dérivé iodé en générant un autre radical R_F^\bullet .

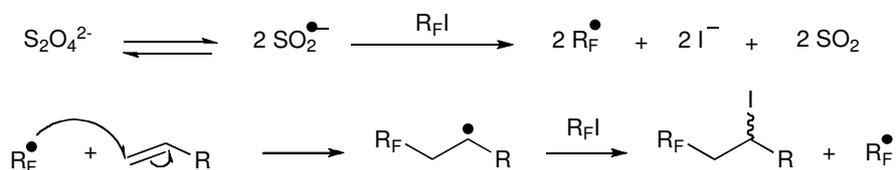


Figure 5.18. Mécanisme réactionnel de couplage d'alcène avec un dérivé iodoperfluoré.

L'initiation de la réaction radicalaire est également décrite à l'aide d'une quantité catalytique de triéthylborane en présence d'oxygène.¹⁴⁰

1.4.2 Acides gras hémifluorés

À notre connaissance, les seuls acides gras hémifluorés décrits dans la littérature présentent le segment fluoré à l'extrémité de la chaîne.

Les premiers acides partiellement fluorés décrits ont été synthétisés par couplage de dérivés iodoperfluoroalkanes sur des alcènes possédant déjà un groupement acide protégé (Figure 5.19.). La réaction de couplage radicalaire est initiée par de l'AIBN ou du di-*t*-terbutyl peroxide. De manière générale, les produits de couplage iodés ne sont pas purifiés

directement mais réduit par du zinc en présence d'alcool, puis une déprotection de la fonction acide permet de recristalliser le produit.¹⁴¹

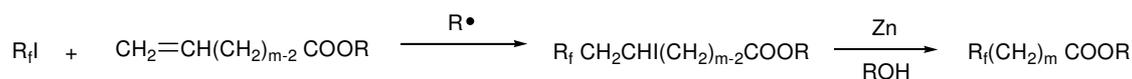


Figure 5.19. Synthèse d'acides gras hémifluorés

Les travaux de Brace ont également porté sur la synthèse d'acides insaturés (Figure 5.20.). Un couplage radicalaire d'un iodoperfluoroalkane avec un alcyne permet d'obtenir un iodure qui va ensuite être réduit en présence d'acide. Cette réaction est rapportée comme stéréospécifique et conduit à la formation d'une double liaison trans (E).

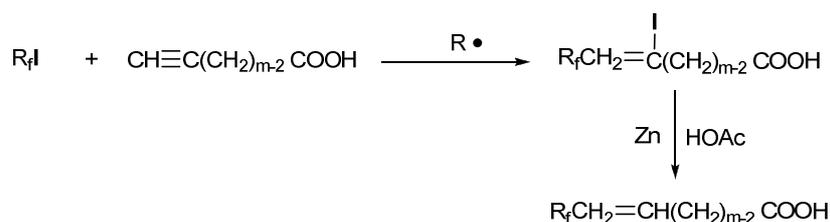


Figure 5.20. Synthèse d'acides gras insaturés.

Une autre méthode permettant d'obtenir des acides présentant une insaturation entre les parties fluorées et hydrogénées consiste en une élimination de HI en présence de base. Cependant la présence de la base entraîne souvent la formation de produits secondaires issus d'une élimination de HF (Figure 5.21.).¹⁴²

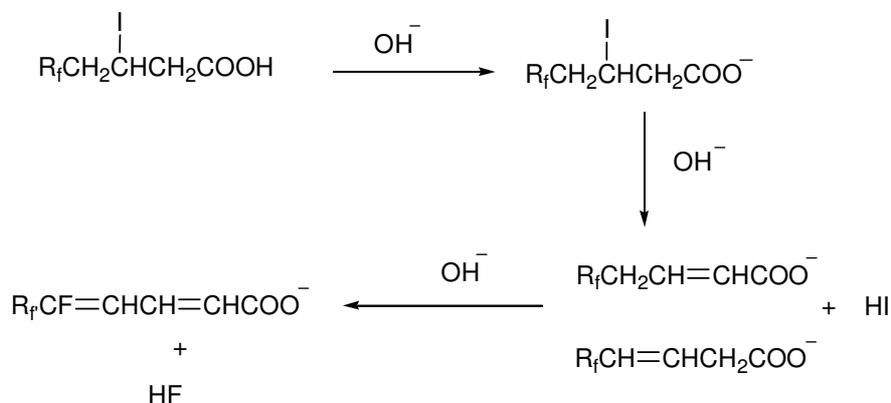


Figure 5.21. Réaction d'élimination de HI suivit d'une élimination de HF

Enfin une dernière méthode d'obtention d'une insaturation consiste à effectuer le couplage et la réduction en une fois (la réaction radicalaire catalysée par CuCl₂/2-aminoethanol et l' α , β -déhydroiodation.). Cette méthode permet d'obtenir essentiellement une configuration E.¹³²

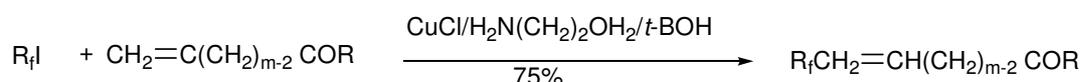


Figure 5.22. Synthèse de composé hémifluoré insaturé.

2 Synthèse des phospholipides fluorés

La stratégie de synthèse que nous avons utilisée s'articule autour de quatre étapes (Figure 5.23) :

- synthèse d'un acide gras localement fluoré ;
- synthèse d'un précurseur de tête polaire ;
- condensation de deux équivalents d'acide gras avec le précurseur de tête polaire ;
- déprotection et fonctionnalisation finales.

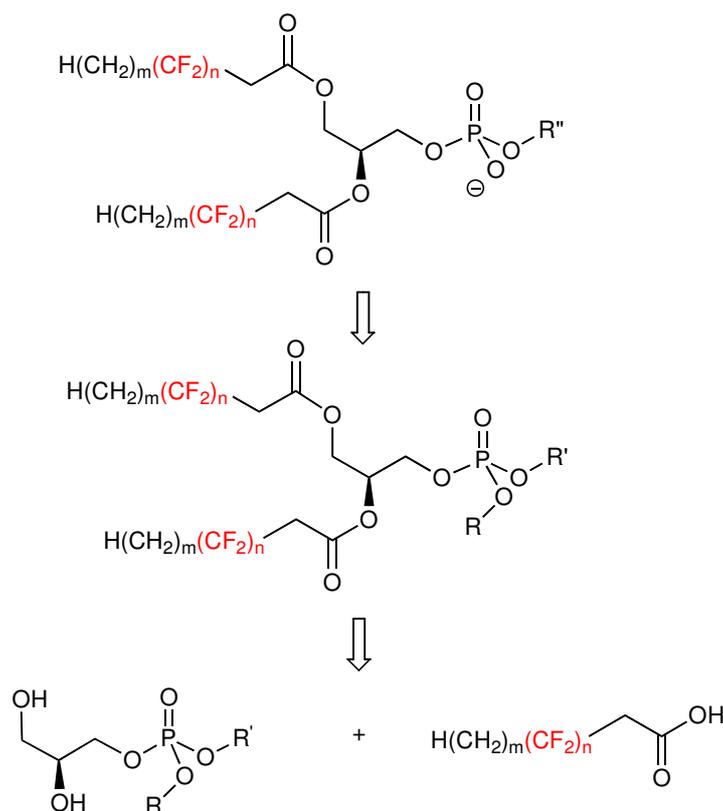


Figure 5.23. Rétrosynthèse des phospholipides cibles.

2.1 Synthèse des acides gras hémifluorés

Comme on l'a vu plus haut, l'étape clé de la synthèse des acides gras hémifluorés est la formation de la liaison $\text{CF}_2\text{-CH}_2$. Dans notre cas, il s'agit de former deux liaisons de ce type sur un substrat pour conduire à un produit qui devra être dissymétrique. Les composés perfluorés bifonctionnels commerciaux sont relativement peu nombreux et le plus souvent symétriques. Ce sont essentiellement des dihalogéno-perfluoroalkanes $\text{X}(\text{CF}_2)_n\text{X}$, (chlorures, bromures et iodures), des diols $\text{HOCH}_2(\text{CF}_2)\text{CH}_2\text{OH}$ ou des diacides $\text{HO}_2\text{C}(\text{CF}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$. Nous avons choisi de préparer nos acides à partir de dihalogéno-perfluoroalkanes, composés qui

permettent de mettre en œuvre les voies de synthèse les plus courtes. La stratégie de synthèse que nous avons envisagée s'articule autour de deux étapes : l'hétérobifonctionnalisation d'un dihalogéno-perfluoroalkane, suivie de la transformation adéquate pour accéder à l'acide visé (Figure 5.24).

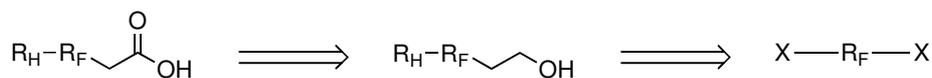


Figure 5.24. Schéma rétrosynthétique décrivant l'accès aux acides fluorés.

Des études antérieures avaient été réalisées au laboratoire par Clémentine Féau puis Stéphane Schweitzer concernant un couplage de type « Wurtz » à partir d'un dérivé dibromé relativement bon marché (Figure 5.25).^{143,144}

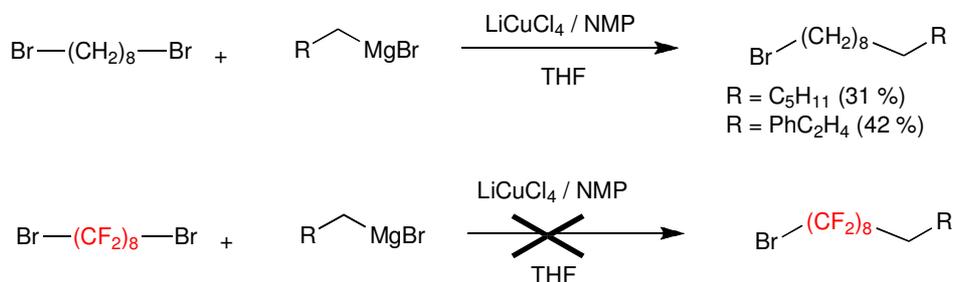


Figure 5.25. Essais de couplages de type « Wurtz ».

Les conditions opératoires optimisées en série hydrocarbonée avaient permis d'isoler 42 % du produit de monocouplage entre le 1,8-dibromooctane et le bromure de phénéthyl-magnésium. Cependant, dans les mêmes conditions, le substrat fluoré (1,8-dibromoperfluoro-octane) n'est pas suffisamment réactif pour donner lieu au couplage recherché. Une autre stratégie a donc été développée qui passe par la fluoroalkylation d'un substrat éthylénique, réaction largement décrite comme on l'a vu plus haut.

2.1.1 Acides gras hémifluorés linéaires

Dans un premier temps nous avons envisagé de tirer profit de la différence de réactivité entre les iodo- et chloroperfluoroalkane pour introduire des groupes différents de part et d'autre de la chaîne. Cependant, les coûts des réactifs hétérobifonctionnels chloriodoperfluoroalkanes et les faibles rendements de couplage que nous avons pu obtenir avec les dérivés chlorés nous ont rapidement dissuadés de continuer dans cette voie et nous nous sommes orientés vers l'utilisation de diiodoperfluoroalkanes symétriques (Figure 5.26).

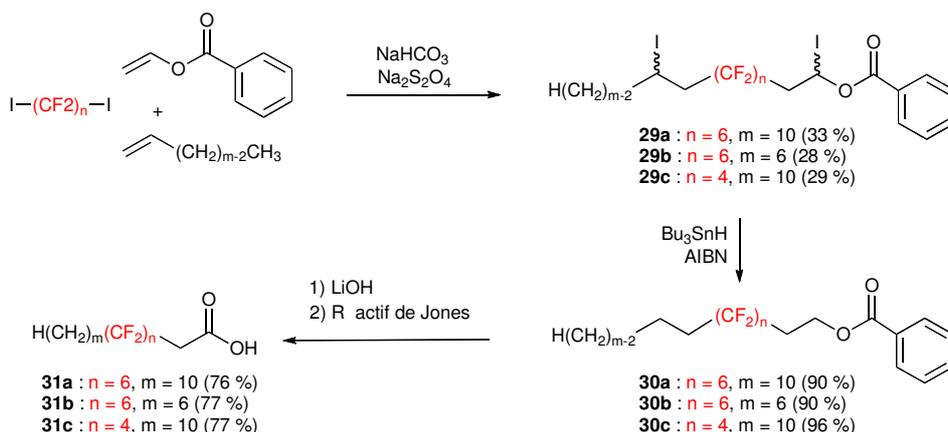


Figure 5.26. Synthèse des acides hémifluorés linéaires.

Nous avons ainsi débuté la synthèse des acides par l'addition radicalaire d'un diiodoperfluoroalcane sur deux alcènes, en présence de dithionite de sodium.¹⁴⁵ Par cette méthode, des rendements de l'ordre de 30 % en dérivés désymétrisés **29a-c** ont été obtenus. On attend dans cette réaction un rendement théorique maximum de 50%. En effet, l'addition du diiodoalcane sur un mélange équimolaire des 2 alcènes se fait de façon statistique et le produit attendu est accompagné de deux produits secondaires symétriques, issus de la double addition sur le benzoate de vinyle, d'une part, et sur l'oléfine, d'autre part. En pratique, il apparaît que l'oléfine est légèrement plus réactive que le benzoate de vinyle. En effet, nous obtenons en fin de réaction plus de 30 % du composé issu de la double addition sur celle-ci. Afin de compenser le manque de réactivité de l'ester vinylique, on pourrait être tenté de modifier le ratio des réactifs mis en présence. Cependant, les composés **29a-c** et le benzoate de vinyle comigrent sur silice et modifier la stœchiométrie des réactifs rendrait encore plus difficile une étape de purification déjà délicate. Le diiodoalcane obtenu est ensuite réduit. Cette transformation est réalisée par l'hydrure de tributylétain en présence d'AIBN, dans l'éther anhydre, et fournit les composés **30a-b** avec des rendements très satisfaisants.¹⁴⁶ Les alcools primaires sont ensuite classiquement déprotégés en milieu basique à l'aide de lithine dans le méthanol et directement oxydés en acide gras **31a-b** par le réactif de Jones.¹⁴⁷ Nous avons également synthétisé des acides totalement perfluorés par simple oxydation de des alcools commerciaux (Figure 5.27).

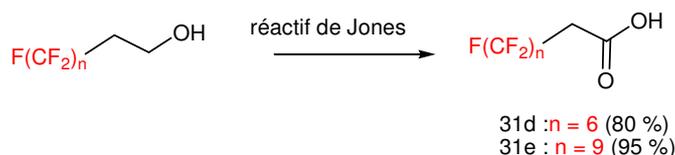


Figure 5.27. Synthèse des acides perfluorés linéaires.

2.1.2 Acide gras linéaire 2,2,3,3-tétrahydroperfluoré

Afin de contourner le problème évoqué plus haut de l'élimination de HF dans les esters fluorés, nous avons synthétisé un acide gras hémifluoré présentant deux groupes méthylènes entre le carboxyle et le segment fluoré. Avec ce composé, les protons en α de la fonction ester sont moins acides ce qui minimise d'autant la réaction d'élimination. La préparation de cet acide a été réalisée en utilisant une stratégie similaire à la précédente (Figure 5.28).

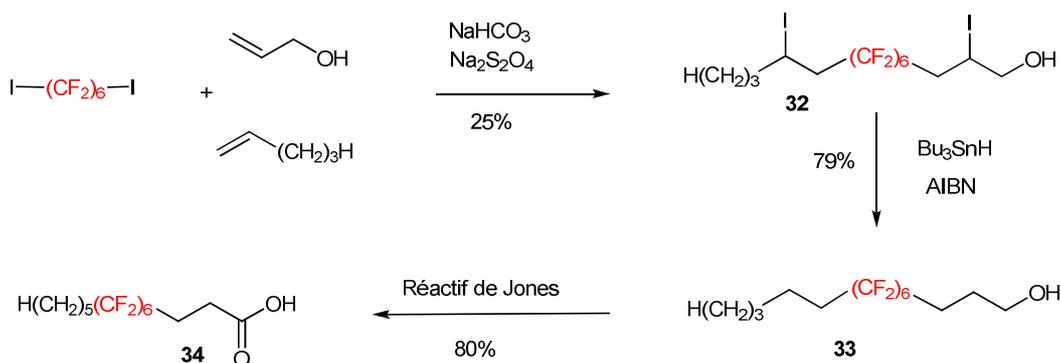


Figure 5.28. Synthèse de l'acide $\text{C}_{5\beta}\text{F}_6\text{-COOH}$ 34.

L'addition radicalaire du diiodoperfluorohexane sur un mélange équimolaire de 1-pentène et d'alcool allylique, initiée par du dithionite de sodium, conduit au composé **32** qui est réduit par l'hydruide de tributylétain. L'alcool **33** obtenu est ensuite transformé en acide **34** par le réactif de Jones.

2.1.3 Acides gras hémifluorés ramifiés

La stratégie de synthèse des acides gras hémifluorés ramifiés est la même que celle utilisée pour la préparation des acides linéaires, à la différence près que nous avons utilisé des alcènes substitués, *trans*-4-octène, 7-tétradécène et 9-octadécène (Figure 5.29).

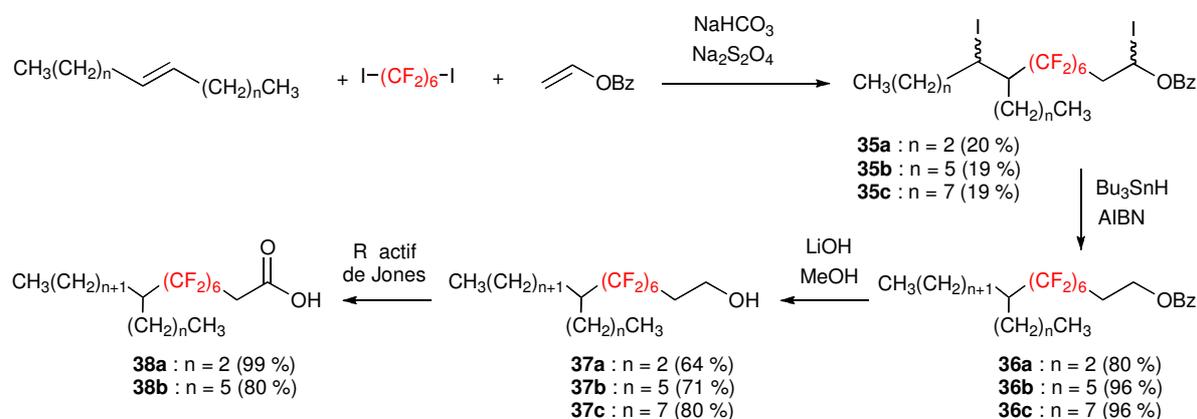


Figure 5.29. Synthèse des acides gras hémifluorés ramifiés.

L'homologue ramifié avec $n = 7$ n'a été utilisé que pour la préparation du composé ramifié monocaténaire. L'alcool **37c** n'a donc pas été oxydé en acide.

2.1.4 Acide gras hémifluoré insaturé

Le problème principal que nous avons rencontré lors de cette synthèse d'acide gras insaturé a été le contrôle de la stéréochimie de la double liaison. En effet, dans la DOPE, la double liaison des acides gras est en configuration *Z* et c'est cette configuration qu'il nous a fallu respecter. Dans cette optique, un alcyne terminal a été utilisé comme substrat pour l'addition oxydante du diiodoperfluoroalcane (Figure 5.30). Différentes conditions réactionnelles ont été testées pour la mise au point de la réaction.

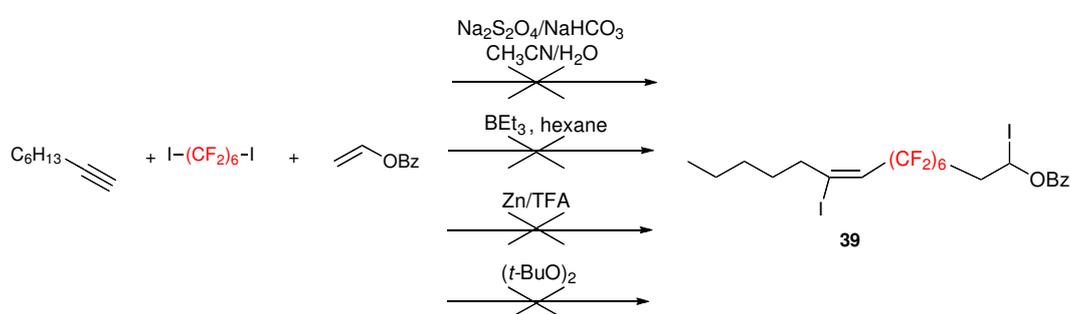


Figure 5.30. Présentation de différentes conditions testées pour obtenir le composé **39**.

Les premiers essais de couplage ont été réalisés à l'aide de dithionite de sodium comme initiateur de radicaux. Cette réaction a donné lieu à la formation d'un grand nombre de produits secondaires et nous n'avons pas réussi à isoler l'alcène **39**. En utilisant le triéthyl borane comme initiateur, au bout de 12 heures de réaction à $50\text{ }^\circ\text{C}$, nous n'avons pas pu identifier l'alcène **39** et avons récupéré 80 % du benzoate de départ et 88 % d'octyne. Le couplage en présence de zinc et d'acide trifluoroacétique¹⁴⁸ a permis d'obtenir, après 2 heures à température ambiante, 24 % de couplage à l'alcyne (visualisé en RMN du fluor) et nous avons récupéré 58 % du benzoate de départ et 52 % d'octyne. La réaction de couplage au peroxyde de *tert*-butyle ne s'est pas révélée plus concluante et a fourni, après 9 heures à $100\text{ }^\circ\text{C}$, 24 % de produit de double couplage avec l'alcyne et 48% de produit de double couplage avec le benzoate de vinyle (visualisé par RMN). On a également identifié 64 % d'octyne, 49 % de benzoate de vinyle et 54 % de iodoperfluoroalcane qui n'ont pas réagi. C'est finalement lorsque nous avons mis en œuvre le couplage en présence d'AIBN que nous avons pu obtenir 22 % du composé **39**, avec un rapport *Z/E* de 13/87 (Figure 5.31).

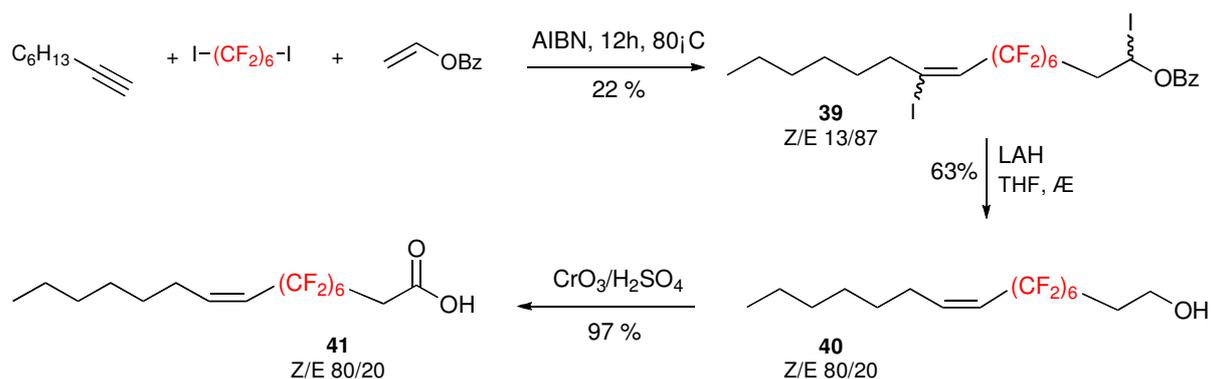


Figure 5.31. Synthèse de l'acide gras hémifluoré insaturé **41**.

Nous avons noté la présence de produits secondaires formés au cours de la réaction qui correspondent à des doubles adduits avec le benzoate de vinyle (Figure 5.32). Ces produits ont été détectés en RMN mais n'ont pas été isolés des bruts réactionnels.

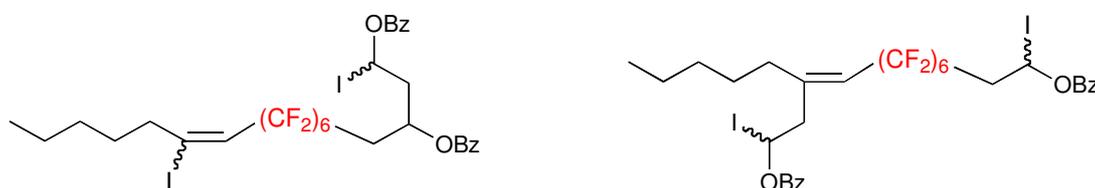


Figure 5.32. Produits secondaires formés lors de la réaction de couplage catalysée par l'AIBN.

La réduction du composé **39** par voie radicalaire ($n-Bu_3SnH/AIBN$) s'accompagne d'une isomérisation du radical vinyle intermédiaire et l'alcène est obtenu avec un ratio Z/E de 60/40. Dans ce cas, la réduction par $LiAlH_4$ qui procède par un mécanisme ionique s'est avérée plus adaptée et le produit réduit est obtenu avec un ratio Z/E de 80/20.¹⁴⁹ De plus, le benzoate est également réduit, ce qui entraîne la déprotection de l'alcool primaire et fournit, en une seule étape, l'alcool **40**. Les deux isomères n'ont cependant pas pu être séparés et le mélange a été directement oxydé pour donner l'acide **41** sous forme d'un mélange Z/E 80/20. L'acide **41** a été utilisé tel quel dans les réactions ultérieures d'estérification.

2.2 Synthèse des précurseurs des têtes polaires

Selon notre stratégie de synthèse, trois précurseurs de têtes polaires sont nécessaires pour accéder aux phosphatidylcholines, phosphatidylglycérols et phosphatidyléthanolamines (Figure 5.33.). Tous ces précurseurs présentent un motif glycérol dont le centre C^2 est stéréocontrôlé.

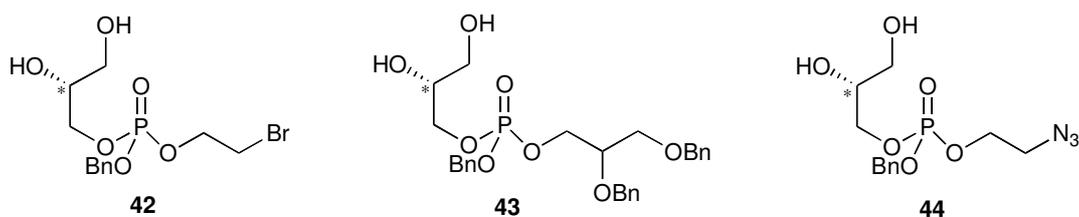


Figure 5.33. Présentation des différents précurseurs de têtes polaires impliqués dans notre stratégie de synthèse.

Synthèse du (*R*)-(-)-isopropylidène glycérol

Pour préparer des phospholipides dont la structure est la plus proche possible de celle des phospholipides naturels, la synthèse du précurseur de la tête polaire a tout d'abord nécessité la préparation du (*R*)-(-)-isopropylidène glycérol, un énantiomère du solketal, selon un protocole largement décrit dans la littérature (Figure 5.34).^{150,151}

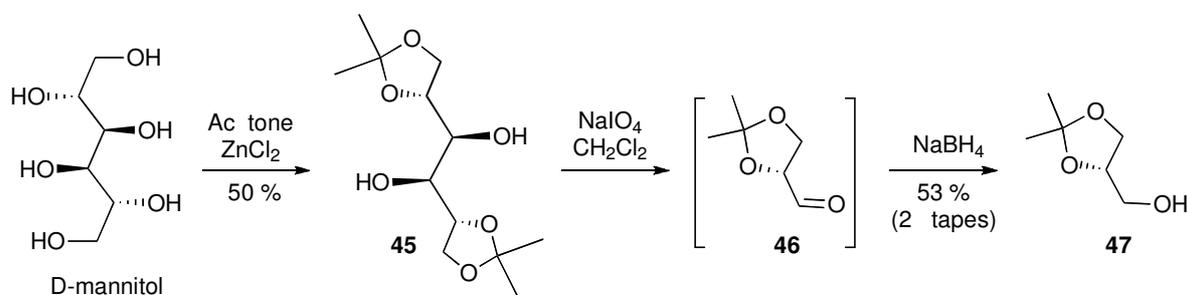


Figure 5.34. Synthèse du (*R*)-(-)-isopropylidène glycérol à partir du D-mannitol.

Nous sommes partis du D-mannitol commercial sur lequel nous avons protégé les alcools en positions 1, 2, 5 et 6 par deux groupements acétonides (composé **45**). Une coupure oxydante a ensuite permis d'obtenir l'aldéhyde **46** qui est réduit pour fournir la molécule cible. L'alcool **47** ainsi obtenu sera employé pour préparer les précurseurs de têtes polaires appropriés. Ces précurseurs procèdent de réactions de condensation avec une espèce activée du phosphore(V) ou (III).

Accès aux phosphotriesters à partir de PCl_3 ou $POCl_3$

Notre première stratégie de synthèse est fondée sur trois réactions successives de substitution nucléophile sur le chlorure ou l'oxychlorure de phosphore par trois alcools différents : le solketal, l'alcool benzylique et le bromoéthanol (Figure 5.35). Cette triple transformation est réalisée en « un pot » par addition séquentielle des alcools sur l'électrophile en présence de base. Afin d'optimiser cette réaction, différentes conditions réactionnelles ont été testées. La mise au point de la réaction a été réalisée avec le solketal, forme racémique moins onéreuse de l'isopropylidène glycérol.

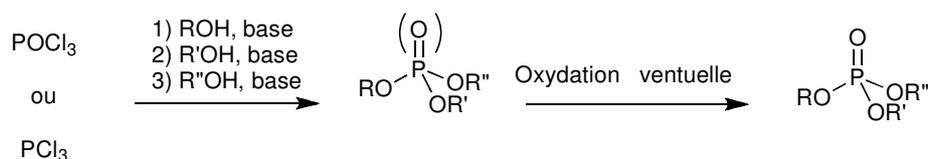


Figure 5.35. Substitutions nucléophiles successives sur P(X)Cl₃ par 3 alcools (X = O, ••).

Entrée	Électrophile	Alcool			Base	Oxydant	Rendement (%)
		R ₁	R ₂	R ₃			
1	P(O)Cl ₃	BnOH	BnOH	BnOH	<i>n</i> -BuLi	–	90
2	"	"	"	"	Py	–	8
3	"	"	"	"	Et ₃ N	–	5
4	PCl ₃	"	"	"	"	<i>m</i> -CPBA	60
5	"	Solketal	"	BrC ₂ H ₄ OH	"	"	10
6	"	"	"	"	DIPEA	<i>t</i> -BuO ₂ H	12
7	"	"	"	"	"	H ₂ O ₂	16
8	"	BnOH	Solketal	"	"	"	18

Tableau 5.1. Récapitulatif des conditions étudiées au laboratoire.

Pour mettre au point cette réaction, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la préparation du phosphate de tribenzyle. Dans un premier temps, nous avons testé l'addition de benzylate de lithium (généré par action du *n*-BuLi sur l'alcool benzylique) sur POCl₃ (Entrée 1). Cette réaction s'est révélée efficace mais la réactivité trop forte des alcoolates lithiés pourrait conduire à une mauvaise sélectivité lors de l'addition séquentielle de différents alcools. Aussi, avons nous étudié l'addition d'alcool benzylique sur l'électrophile phosphoré en présence de bases azotées (Entrées 2 et 3). Que ce soit en présence de triéthylamine ou de pyridine, ces réactions se sont révélées inefficaces (les rendements obtenus sont inférieurs à 10 %). Nous avons attribué les mauvais résultats obtenus à la faible réactivité du chlorophosphodiester intermédiaire vis-à-vis du troisième alcool. Afin d'augmenter cette réactivité, nous nous sommes tournés vers le trichlorure de phosphore.^{152,153} Dans ce cas, une étape supplémentaire est nécessaire pour oxyder le phosphite obtenu en phosphate. Lorsque l'alcool benzylique est additionné en premier, le triester phosphorylé est obtenu avec un rendement de 60 % (Entrée 4). Nous avons donc retenu ces conditions pour la suite et les avons appliquées à la préparation des têtes polaires.

Tout d'abord, nous avons choisi d'introduire le solketal en début de séquence. En effet, c'est l'alcool le plus encombré et il devrait favoriser la mono substitution. Par la suite sont introduits l'alcool benzylique et le bromoéthanol (Entrée 5). En changeant l'ordre d'addition des deux premiers alcools, nous n'avons observé aucune différence au niveau des rendements (Entrée 8).

Pour l'étape d'oxydation, trois oxydants ont été testés : *m*CPBA, *t*-BuO₂H et H₂O₂ (Entrées 5-7). L'hydroperoxyde de *t*-butyl est anhydre et en solution dans le décène. Par contre H₂O₂ est en solution aqueuse et on pourrait s'attendre à avoir une compétition entre la

réaction d'oxydation du phosphite en phosphate et son hydrolyse en hydrogénophosphite. En pratique, aucune différence notable n'a été observée avec les deux réactifs. En effet, en RMN du phosphore, nous n'observons qu'une très faible proportion d'hydrogénophosphite issu de l'hydrolyse du phosphite ou du chlorophosphite et ce, que nous utilisons *t*-BuO₂H ou H₂O₂. Il apparaît donc que la réaction d'oxydation est beaucoup plus rapide que la réaction d'hydrolyse.

Dans les bruts de réaction (après addition des trois différents alcools et oxydation), nous obtenons un mélange complexe d'esters phosphoriques difficilement séparables sur silice. En suivant la réaction par RMN du phosphore, nous avons constaté que l'étape limitante de la synthèse était l'addition du dernier alcool. Compte tenu de ces difficultés, nous avons envisagé d'étudier une autre voie d'accès.

Accès aux phosphotriesters via un hydrogénophosphite

Dans cette deuxième stratégie de synthèse, nous avons pensé préparer le phosphotriester en deux temps, en formant préalablement le 2-bromoéthyl benzyl hydrogénophosphite **48**, facilement purifiable. Celui-ci est ensuite converti en chlorophosphate **49** et le chlore est déplacé par l'alcoolate du (R)-(-)-isopropylidène glycérol pour conduire au phosphotriester **50** (Figure 5.36).

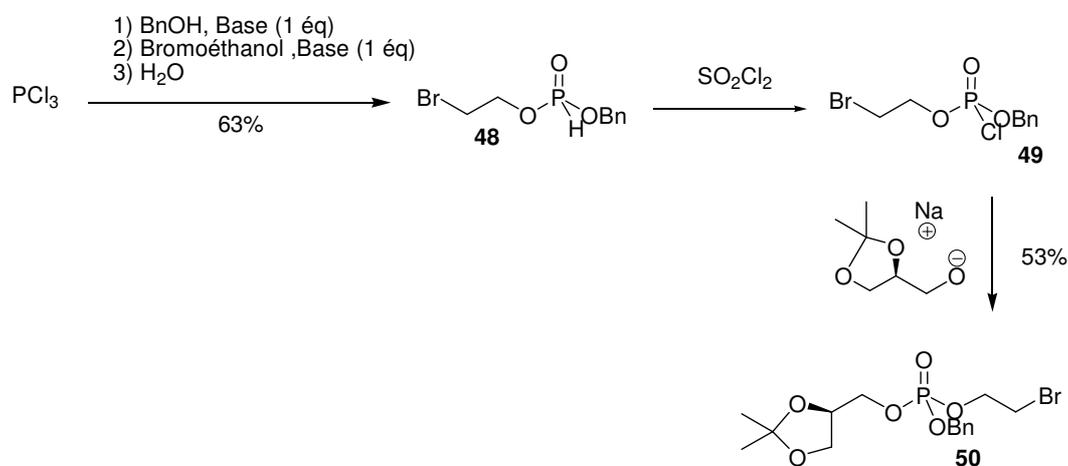


Figure 5.36. Accès au précurseur **47** via un hydrogénophosphite.

Au final, le rendement global obtenu avec cette stratégie est modéré (30 %), mais la séquence présente l'avantage de conduire à moins de produits secondaires, ce qui facilite d'autant les étapes de purification du composé **50**.

La déprotection du glycérol protégé sous forme d'acétal cyclique est réalisée en utilisant une résine acide (Figure 5.37). On récupère ainsi le produit par simple filtration. Toutefois, la réaction de déprotection s'accompagnant d'une dégradation partielle du produit, il est nécessaire de réaliser une purification par chromatographie sur gel de silice.

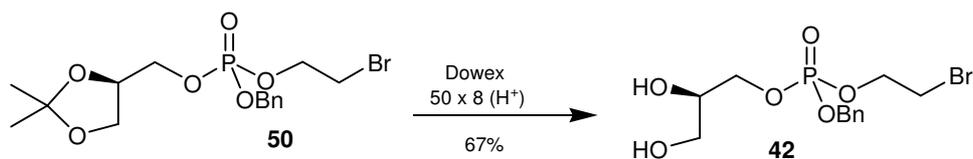


Figure 5.37. Réaction de déprotection du diol.

Étant donnée l'instabilité du diol **42** (celui-ci se dégrade après un stockage prolongé, probablement par cyclisation de l'alcool primaire sur le phosphotriester, cf. Figure 5.38), il est préférable de stocker le précurseur de la tête polaire sous forme d'acétal **50** qui sera transformé en diol juste avant emploi.

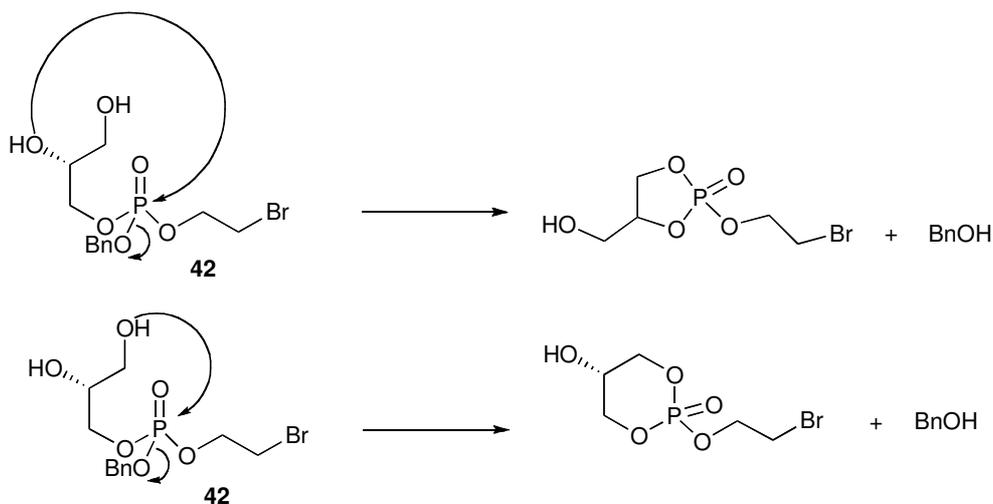


Figure 5.38. Exemples de cyclisation possible du composé **34** après déprotection du diol.

Les efforts que nous avons développés pour passer directement du composé **50** au précurseur de choline correspondant en déplaçant le brome par la diméthylamine (avec méthylation ultérieure par réaction avec MeI) n'ont donné aucun résultat. De même, nous ne sommes pas parvenus à mettre en œuvre la séquence présentée à la figure 5.36 en remplaçant le bromoéthanol par le tosylate de choline.

Une tête polaire tribenzylée a dû être synthétisée comme précurseur de phosphatidylglycérol (cf. Figure 5.29). Nous avons donc synthétisé le 2,3-bis(benzyloxy)propan-1-ol **53** en trois étapes : protection d'un alcool primaire du glycérol par un groupement trityle, benzylation des deux alcools résiduels par réaction avec le bromure de benzyloxy en présence de NaH et, enfin, élimination du groupement protecteur trityl en milieu acide (Figure 5.39).

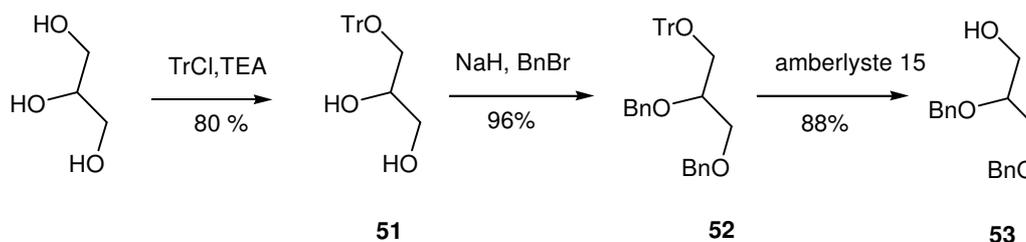


Figure 5.39. Synthèse du 2,3-bis(benzyloxy)propan-1-ol **50**.

Cet alcool **53** est ensuite mis en réaction avec le trichlorure de phosphore de la même manière que décrit précédemment (Figure 5.40). Nous avons utilisé la même stratégie de couplage au phosphore que pour la synthèse du dérivé **50**. Ainsi, la substitution nucléophile de deux atomes de chlore sur PCl_3 par de l'alcool benzylique et le 2,3-bis(benzyloxy)propan-1-ol **53**, suivie d'une hydrolyse, aboutit à l'hydrogénophosphite **54** qui est chloré par réaction avec le chlorure de sulfuryle pour faire l'objet d'une dernière substitution par l'alcoolate du (R)-(-)-isopropylidène glycérol **47**. La déprotection de l'acétal **53** obtenu est effectuée comme précédemment avec une résine acide (Dowex 50x8) pour fournir le diol **54**. Pour les mêmes raisons que mentionnées précédemment, le composé **54** est utilisé immédiatement après déprotection.

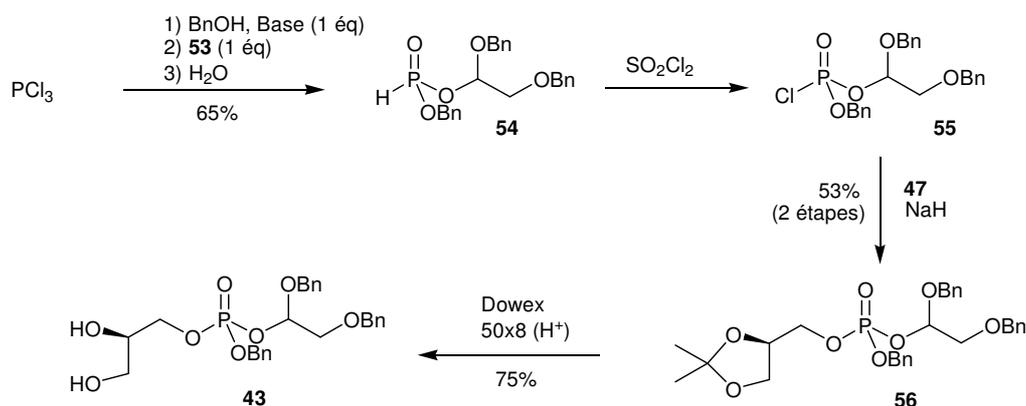


Figure 5.40. Synthèse du précurseur de la tête polaire phosphatidylglycérol.

2.3 Synthèse des phosphatidylcholines

2.3.1 À partir de phosphates de bromoéthyle

Après avoir estérifié le dérivé bromé **42** à l'aide des acides gras hémifluorés **31a-d**, notre stratégie initiale consistait à substituer le brome de **48a-d** par la triméthylamine (Figure 5.41). Cette réaction de substitution devrait s'accompagner de la déprotection simultanée de l'ester benzylique. En effet, les phosphates de benzyle sont clivés par attaque d'une amine tertiaire sur la position benzylique.¹⁵⁴

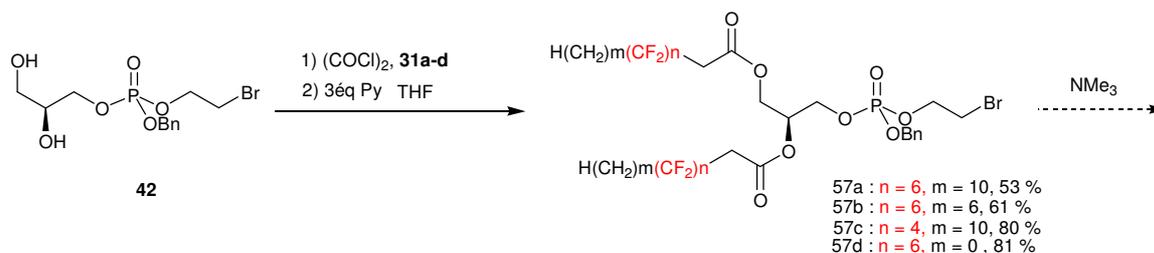


Figure 5.41. Acylation du précurseur **42**.

Les réactions d'acylation du composé **42** ont été mises en œuvre avec les chlorures d'acides hémifluorés préparés à partir des acides correspondants **31a-d**, en présence d'une base azotée. Ces réactions ont donné lieu à des rendements satisfaisants en composés **55a-d**. Avant de mettre en œuvre la dernière étape de synthèse sur nos substrats fluorés, les conditions de fonctionnalisation et déprotection simultanées ont été mises au point sur un composé modèle non fluoré **58** (Figure 5.42). La réaction de **58** avec la triméthylamine a conduit à la phosphatidylcholine correspondante avec un rendement de 75 % lorsqu'elle est menée dans l'acétonitrile. Dans le benzène aucune réaction n'a été observée.

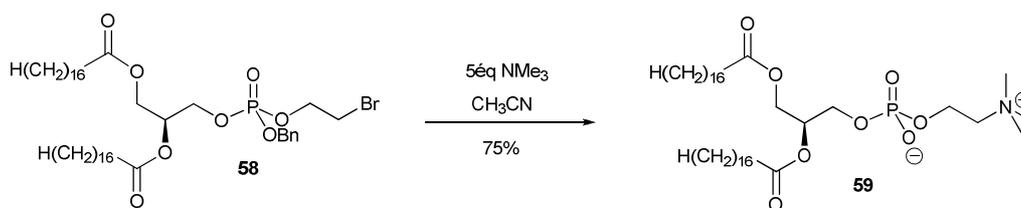


Figure 5.42. Mise au point de la substitution du brome et déprotection du phosphate par la triéthylamine.

Nous avons appliqué le même protocole aux composés fluorés **57a-d** sans succès (Figure 5.43). Dans le cas des substrats hémifluorés, la basicité de la triméthylamine entraîne bien une déprotection de l'ester benzylique et une substitution de l'atome de brome mais également une élimination partielle de HF en α des esters. On a ainsi formation d'une double liaison stabilisée par conjugaison avec la double liaison C=O.

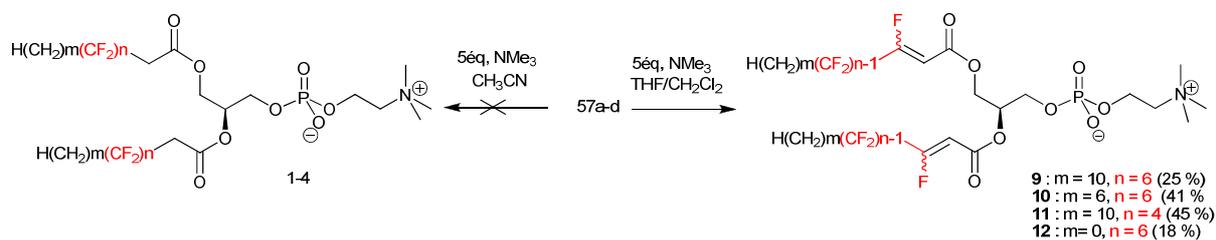


Figure 5.43. Synthèse des phosphatidylcholines insaturées.

Le rendement de cette réaction en produits attendus **1-4 s'**est avéré relativement faible. Ceci est dû en partie à la basicité du milieu qui favorise les transesterifications et à la réaction de substitution du brome qui semble être assez lente. De plus, le caractère amphiphile et zwitterionique du produit de réaction rend sa purification particulièrement difficile. Celle-ci passe par deux chromatographies sur gel de silice et une chromatographie sur gel de silice en

phase inverse (C18). La phosphatidylcholine possédant les esters α,α -dihydro-perfluorés les plus longs ($C_9F_{19}CH_2CO_2R$) n'a jamais pu être isolée, probablement en raison de problèmes de solubilité de l'acide fluoré et des éventuels produits d'acylation.

N'étant pas parvenu à contrôler l'élimination de HF lors de la réaction du précurseur bromé **57a-d** avec la triméthylamine, nous avons étudié d'autres voies d'accès aux composés **1-4** à partir de l'oxychlorure de phosphore et à partir de la phosphocholine.

2.3.2 À partir de la glycérophosphocholine

Les essais de couplage direct entre la glycérophosphocholine (GPC) et les acides fluorés en présence de DCC/DMAP se sont révélés infructueux du fait de la présence d'un proton acide en α de l'ester. En effet, en milieu basique (présence de DMAP), nous avons observé une élimination d'HF conduisant à la formation d'une double liaison en α de l'ester. L'abstraction du proton en α du carboxyle pourrait également procéder par un mécanisme intramoléculaire (Figure 5.44).

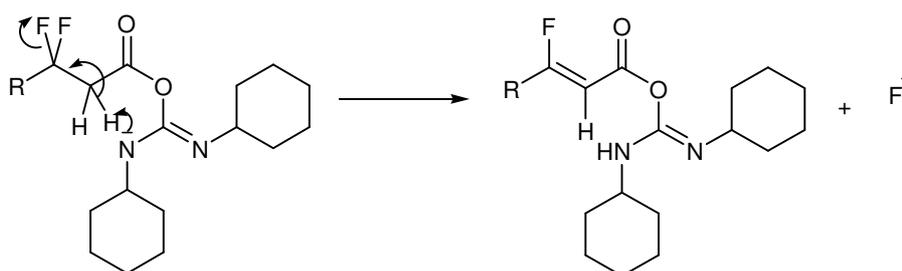


Figure 5.44. Mécanisme intramoléculaire d'élimination de HF.

Ayant constaté que la pyridine n'était pas suffisamment basique pour induire cette élimination, nous avons couplé nos acides hémifluorés **31a-d** à la glycérophosphocholine en passant par les chlorures d'acides correspondants, en présence de pyridine (Figure 5.45).

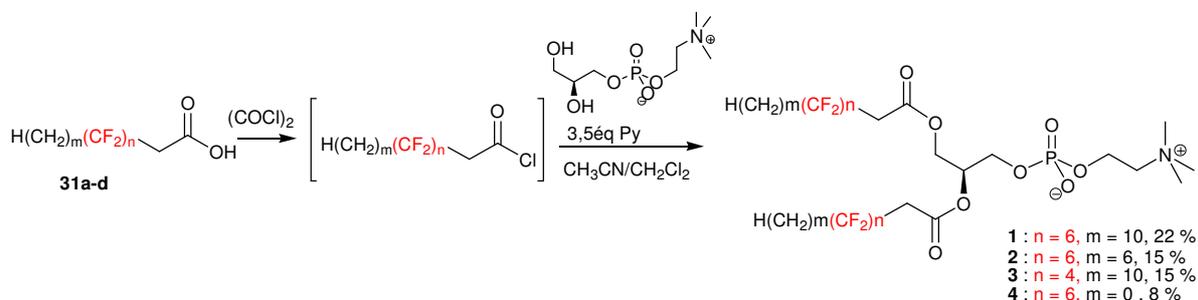


Figure 5.45. Synthèse des analogues perfluorés de phosphatidylcholine.

Le problème majeur de cette étape résulte de la nécessité de disposer de glycérophosphocholine anhydre, ce composé étant très fortement hygroscopique et peu soluble dans les solvants organiques. Nous l'avons ainsi solubilisé partiellement et évaporé plusieurs fois dans un mélange CH₃CN/toluène (l'acétonitrile polaire solubilisant partiellement le diol et le toluène formant un azéotrope négatif avec l'eau permettant ainsi son élimination plus ou moins efficace). Les réactions d'acylation ont été réalisées en pré-traitant la glycérophosphocholine avec des tamis moléculaires 3Å broyés et activés pour tenter d'éliminer de l'eau résiduelle dans un mélange CH₃CN/CH₂Cl₂ avant addition des chlorures d'acides, le milieu réactionnel étant placée sous ultrasons pour homogénéisation. L'utilisation d'un complexe entre la glycérophosphocholine et le chlorure de cadmium est décrit dans la littérature pour améliorer ce type de réaction.¹³⁰ En effet, le fait de complexer la GPC avec le chlorure de cadmium la rend plus soluble et moins hygroscopique. Les essais que nous avons effectués au laboratoire ont permis d'atteindre des rendements comparables à ceux de l'estérification de la GPC nue. Cependant il s'avéra difficile de se débarrasser des sels de cadmium et ceci même par chromatographie.

La purification des composés **1-4** a été réalisée de la même manière que pour les phosphatidylcholines insaturés, c'est-à-dire par deux chromatographies sur gel de silice successives (une sur phase normale et une sur phase inverse C18). Ils ont été obtenus avec des rendements relativement modestes de 15 à 22 %. Les chlorures d'acide fluorés C₆F₁₃CH₂COCl et C₉F₁₉CH₂COCl étant très faiblement solubles dans le milieu réactionnel, ceci peut être à l'origine du rendement encore plus modeste (8 % pour le composé **4**) voire nul (pour m = 0 et n = 9) de la réaction.

Les phosphatidylcholines ramifiées **16** et **17** ont été préparées de façon similaire aux composés saturés (Figure 5.46).

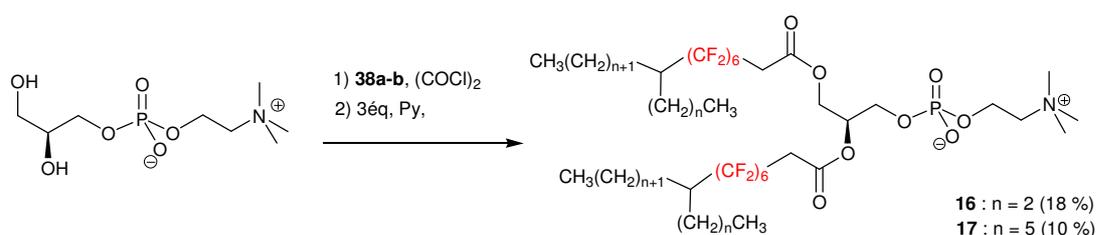


Figure 5.46. Synthèse des phosphatidylcholines ramifiées.

2.3.3 Phosphocholine monocaténaire **20**

La phosphocholine **20** ne comporte pas de motif glycérol et est plus facile d'accès et plus stable que les diacylglycérophosphocholines précédentes (absence d'ester carboxylique et aucun risque d'élimination de molécule de HF en milieu basique). Elle a été préparée selon le schéma présenté à la figure 5.47.

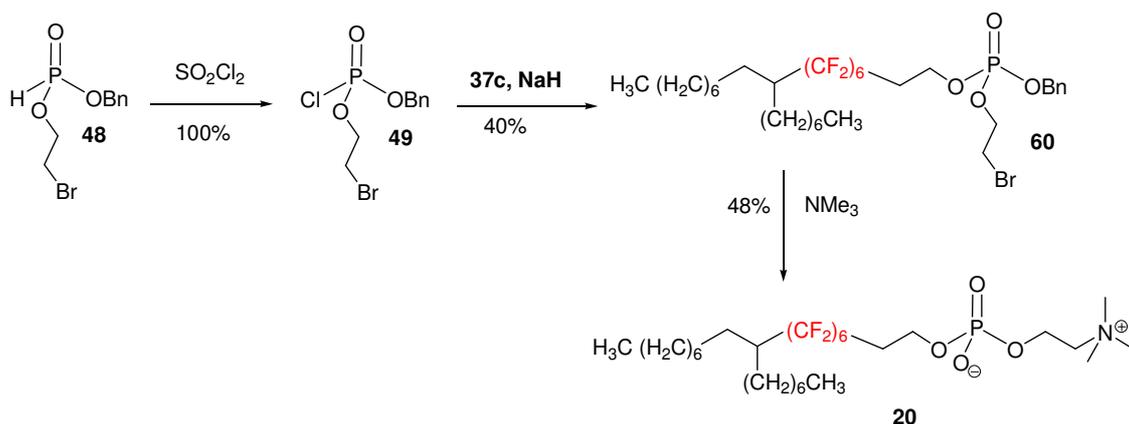


Figure 5.47. Synthèse du composé monocaténaire C_{18R}F₆-PC **20**.

L'alcool ramifié **37c** est condensé avec le chlorophosphate de benzyle et de bromoéthyle **49** (issu de l'hydrogénophosphite **48**) pour donner le précurseur monocaténaire de phosphocholine **60**. La dernière étape de la synthèse consiste à déprotéger l'ester benzylique et à substituer l'atome de brome par la triméthylamine. Le composé **20** est ainsi obtenu avec un rendement global de 19% à partir de l'hydrogénophosphite **48**.

2.3.4 Phosphocholine **14**

Ce composé est obtenu de façon similaire aux précédents (Figure 5.48).

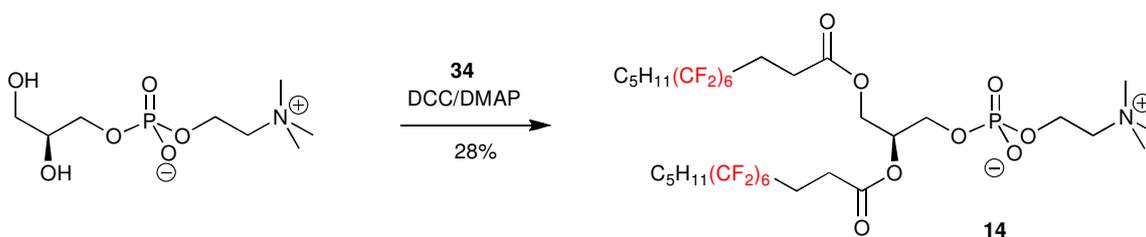


Figure 5.48. Synthèse du composé C₆F₆β-PC **14**.

Étant donné l'acidité moindre des protons présents sur le groupement méthylène en α du carbonyle, nous avons pu condenser l'acide **34** avec la glycérophosphocholine *via* l'utilisation du couple DCC/DMAP. Cette méthode nous a permis de nous affranchir des contraintes liées à la présence d'eau. En effet, la DCC agissant comme un déshydratant (avec formation de DCU), en excès il va compenser la présence d'eau éventuelle sans qu'il soit besoin d'utiliser un excès d'agent acylant (comme c'est le cas en passant par le chlorure d'acide). Nous avons obtenu le composé **14** avec un rendement de 28 %.

2.4 Synthèse des phosphatidylglycérols

2.4.1 Phosphatidylglycérols à chaînes linéaires

Le couplage du diol **43** aux acides hémiperfluorés a été effectué comme précédemment en passant par les chlorures d'acides, en présence de pyridine (Figure 5.49). Les groupements protecteurs benzyliques ont ensuite été éliminés par hydrogénolyse catalysée par du Pd/C. Les rendements atteints lors de ces synthèses sont nettement plus élevés que lors de la synthèse des PC et ceci s'explique en partie par la plus grande solubilité du synthon phosphoré dans les solvants organiques. Afin de pallier toute dégradation liée à l'acidité intrinsèque du produit final, nous avons réalisé l'hydrolyse en présence de formate de sodium afin de neutraliser le monoacide phosphorique dès sa formation.

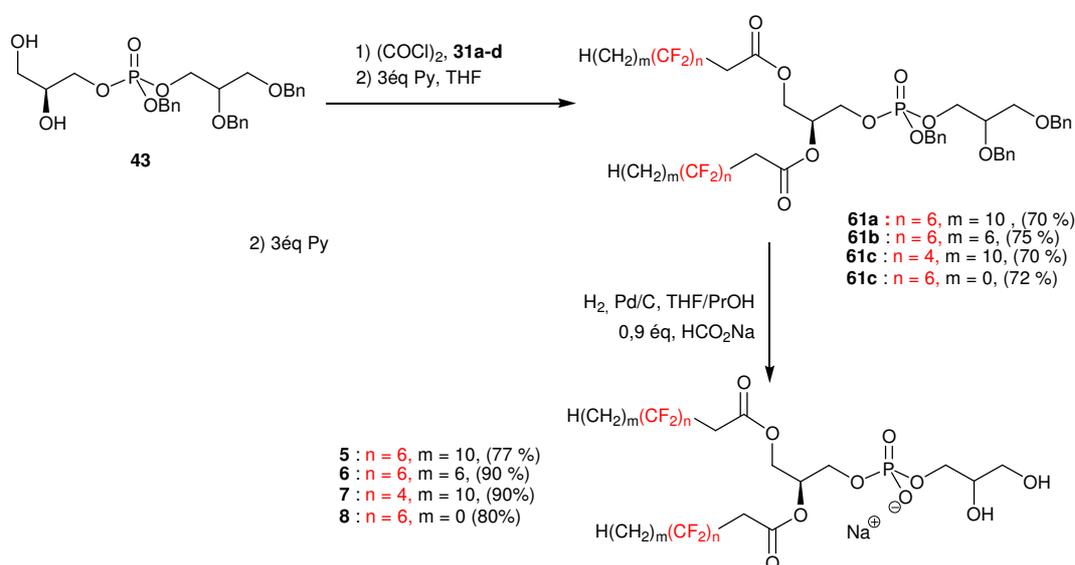


Figure 5.49. Synthèse des PG hémifluorées **5-8**.

2.4.2 Phosphatidylglycérol **15**

La préparation du composé **15** est similaire à celle des précédents (Figure 5.50). Le couplage de l'acide **34** sur la tête polaire **43** est réalisé à l'aide du couple DCC/DMAP avec un rendement de 90 %. La déprotection du composé **62** par hydrogénolyse catalysée par Pd/C n'a pas posé de problème particulier.

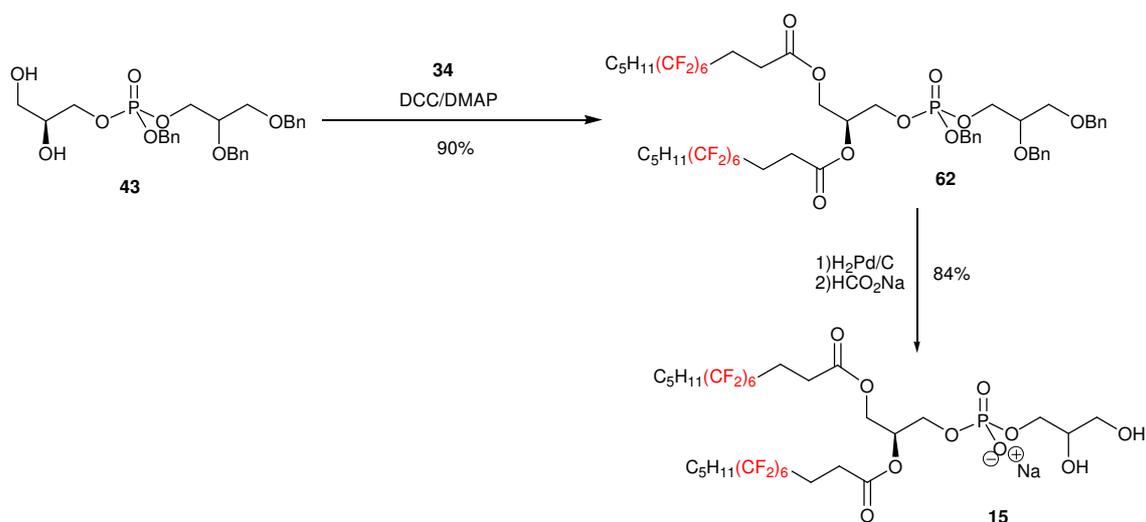


Figure 5.50. Synthèse du composé $\text{C}_5\text{F}_{6\beta}$ -PG **15**.

2.4.3 Phosphatidylglycérols ramifiés

Les PG hémifluorés ramifiés ont été obtenus de la même manière que les composés linéaires, par réaction du diol **43** avec le chlorure d'acide ramifié correspondant, suivie d'une débenzylation par hydrogénolyse catalytique (Figure 5.51).

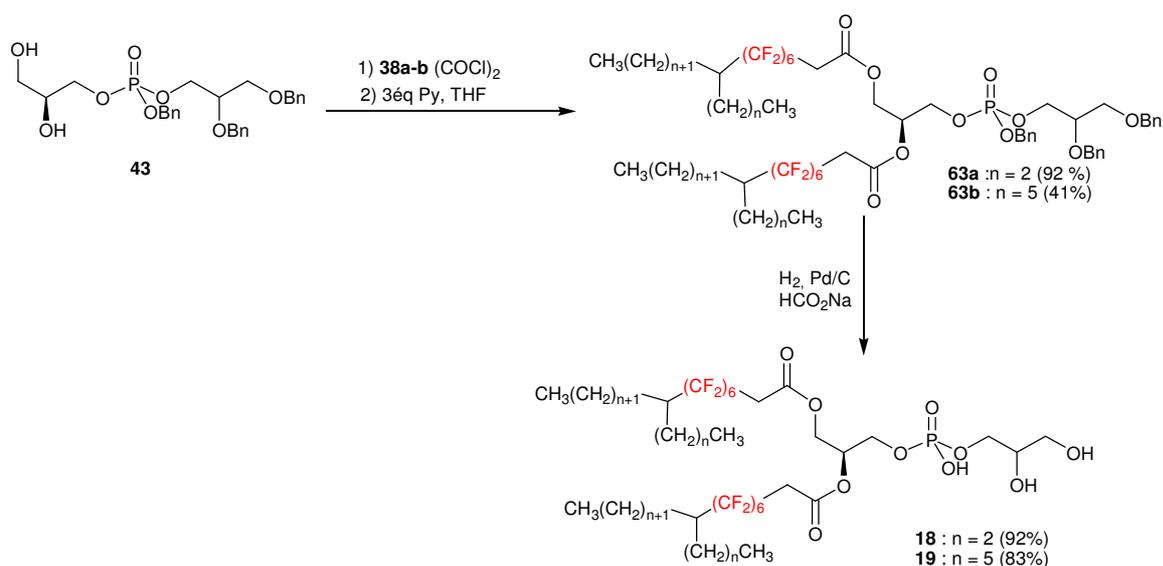


Figure 5.51. Schéma de synthèse des phosphatidylglycérol ramifiés **18** et **19**.

2.4.4 Synthèse de l'analogue de dioléoylphosphatidyléthanolamine

La synthèse de l'analogue de la phosphatidyléthanolamine a nécessité la préparation d'une tête polaire comportant un groupement azoture précurseur de la fonction amine. Ainsi, nous avons substitué l'atome de brome du précurseur **47** par un azoture avant de déprotéger

l'acétal par une résine acide pour obtenir le diol **44** (Figure 5.52). Celui-ci est ensuite acylé par le chlorure de l'acide hémifluoré insaturé **41** pour conduire au composé **64** qui est débenzylé par réaction avec le bromure de triméthylsilane, après hydrolyse de l'ester silylé intermédiaire. L'azoture **65** est enfin réduit par une réaction de Staudinger par la triphénylphosphine en présence d'eau pour conduire à l'analogue de DOPE **28**.

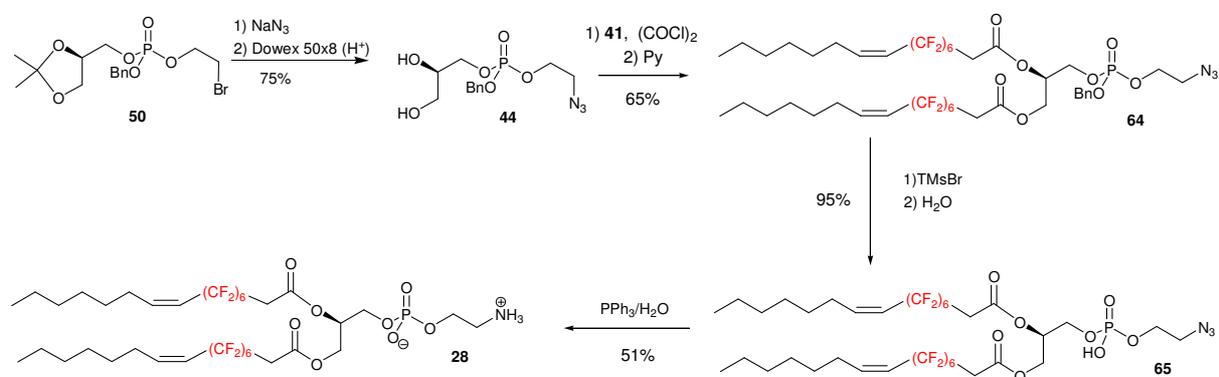


Figure 5.52. Synthèse de la tête polaire précurseur de phosphatidyléthanolamine.

3 Synthèse des lipides cationiques fluorés

3.1 Lipides monocationiques

La stratégie utilisée pour accéder aux analogues fluorés du DOTAP passe par l'estérification d'un intermédiaire possédant une amine tertiaire, suivie de la quaternarisation de cette dernière (Figure 5.53).¹⁵⁵

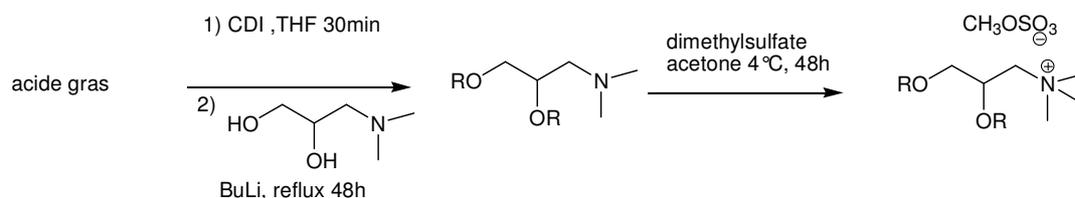


Figure 5.53. Synthèse classique de DOTAP

Le problème lié à l'utilisation d'une amine tertiaire est que la basicité de cette dernière risque d'engendrer une élimination de HF. Nous avons donc exploré une autre voie de synthèse utilisant le chlorure de 2,3-dihydroxy-1,1,1-triméthylaminopropane **67** et avons effectué des essais préliminaires en série non fluorée (Figure 5.54).

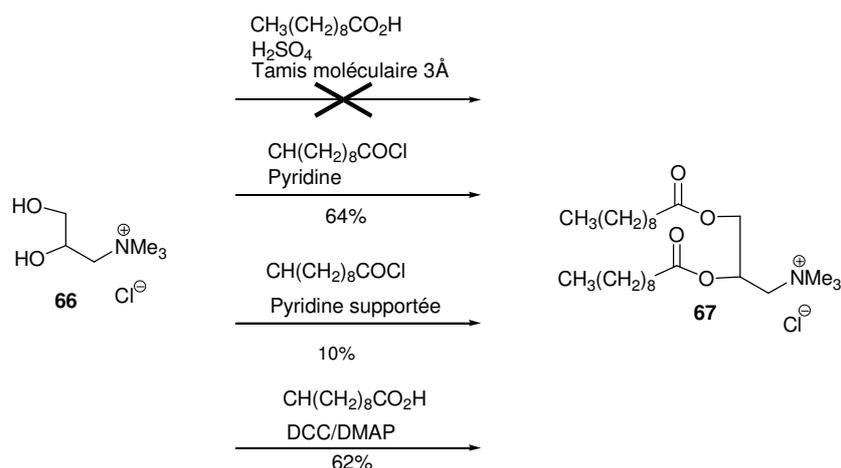


Figure 5.54. Mise au point de la réaction d'estérification

Nous avons tout d'abord essayé d'estérifier le diol **66** par de l'acide décanoïque, en condition acide, dans le toluène et en présence de tamis moléculaire 3Å. Aucune réaction n'a été observée, probablement en raison de la faible solubilité du diol dans le milieu. Nous avons alors effectué une estérification en utilisant le chlorure d'acide en présence de pyridine. Cette réaction s'est révélée concluante et a fourni le composé **67** attendu avec 64% de rendement. Afin d'éliminer plus facilement les sels de pyridinium, nous avons envisagé une réaction mettant en jeu de la pyridine supportée. Les essais menés au laboratoire ont essentiellement conduit au composé monocaténaire, avec seulement 10 % de composé bicaténaire **67**. Enfin, un couplage à l'aide du couple DCC/DMAP s'est révélé aussi concluant que celui passant par le chlorure d'acide et utilisant la pyridine. Partant de ces résultats, nous avons envisagé la préparation des composés **21** à **23** en couplant les acides correspondants au diol **66** à l'aide de DCC et DMAP. Malheureusement, en plus de produits résultant de l'élimination de HF comme précédemment observé lors de la synthèse des PC et PG, nous observons d'autres produits secondaires qui sont des produits d'addition de Michael sur la (les) double(s) liaison(s) formée(s). Nous avons donc choisi d'estérifier nos acides en passant par les chlorures d'acides en présence de pyridine (Figure 5.55). Dans ces conditions, nous observons la formation d'environ 10 % de produit issu de l'élimination de HF en α des groupes carbonyles. Étant donnée la difficulté de séparation des différents composés et la nécessité de disposer de produits purs pour les études physicochimiques et biologiques, nous avons décidé de provoquer l'élimination par traitement en milieu basique (passage des diesters sur une cartouche d'hydrogénocarbonate de sodium).

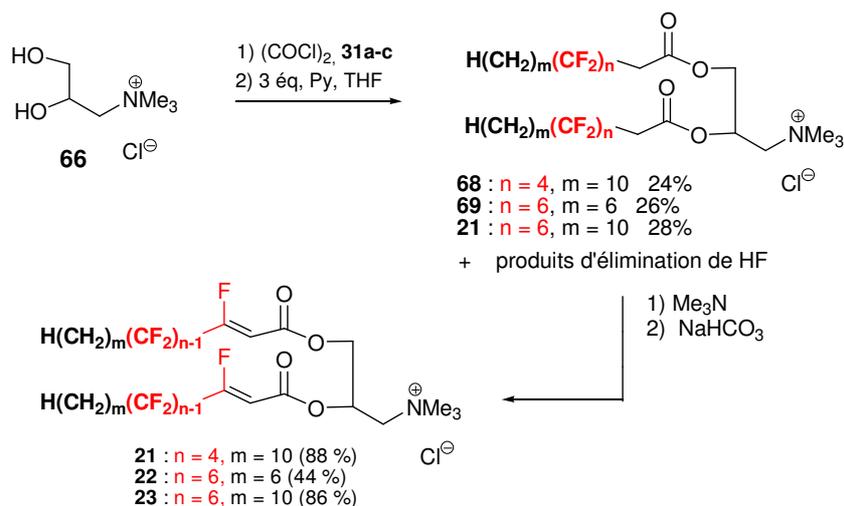


Figure 5.55. Synthèse des analogues fluorés de DOTAP.

3.2 Lipides polycationiques

La première étape de la synthèse des lipides polycationiques est une acylation sélective de l'aminopropanediol par la carboxyspermine (Figure 5.56). Le produit obtenu **70** est ensuite estérifié par les différents acides gras hémifluorés **31a-c** qui sont convertis intermédiairement en chlorures d'acides. La dernière étape de cette synthèse est une déprotection des groupements amines par l'acide trifluoroacétique.

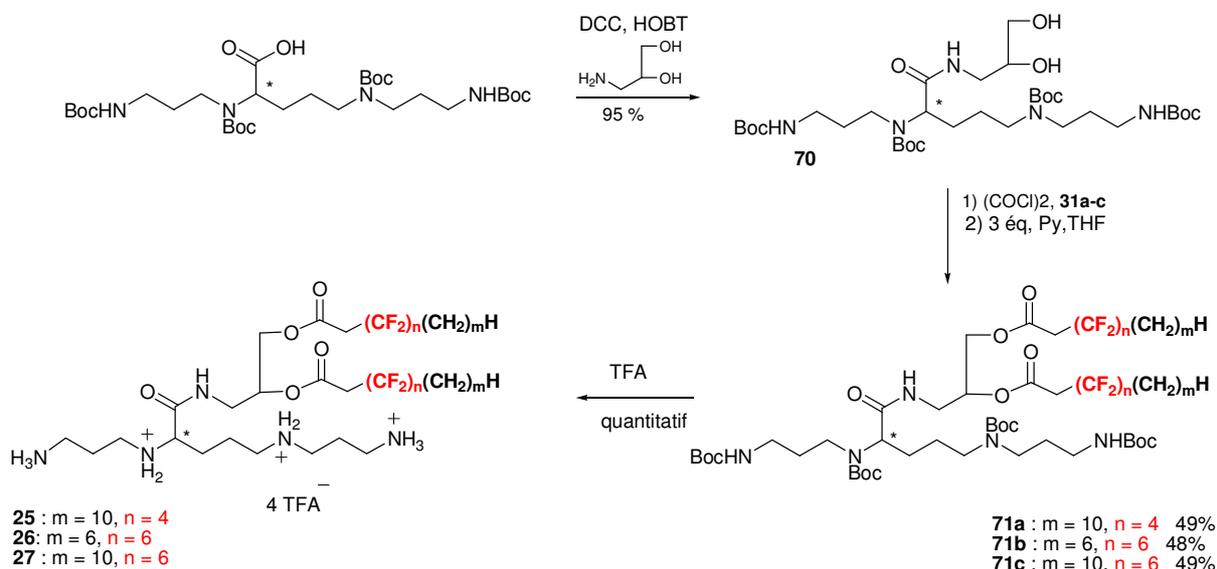


Figure 5.56. Synthèse des lipides polycationiques.

4 Conclusion

Dans la première partie de notre travail, nous avons synthétisé des acides gras localement fluorés. La réaction clé de cette synthèse consiste à coupler deux alcènes sur un dérivé du type dihalogéno-perfluoroalcane. Une étude méthodologique de la réaction d'addition a permis de sélectionner les dérivés de diiodo-perfluoroalcanes comme substrats de départ. Ces derniers, étant moins onéreux que les perfluoroalcanes fonctionnalisés par deux halogènes différents (chlore et brome) de part et d'autre de la chaîne perfluorée. Cette méthode de préparation, bien que présentant des rendements modestes, nous a permis d'accéder aux synthons linéaires désirés. Cette stratégie de synthèse a ensuite été appliquée à la préparation de dérivés d'acides gras ramifiés ou comportant une insaturation.

Dans une deuxième partie, consacrée à la synthèse des dérivés de phospholipides cibles, nous avons préparé les précurseurs des différentes têtes polaires par fonctionnalisation du trichlorure de phosphore à l'aide de trois différents alcools. Les différents acides hémifluorés ont ensuite été couplés aux précurseurs des têtes polaires par réaction d'estérification. Cette étape a mis en avant un problème lié à la forte acidité des protons situés en α de la chaîne perfluorée et de la fonction acide conduisant à l'élimination d'une molécule de HF en milieu basique. Différentes conditions de couplage ont été testées et les molécules cibles saturées ont finalement été obtenues par condensation du chlorure d'acide fluoré aux têtes polaires correspondantes suivie d'un clivage des groupements protecteurs. Dans le cas de la synthèse de dérivés de phosphocholine un traitement final à la triméthylamine a été nécessaire. Ces conditions basiques ont conduit uniquement à la formation de composés insaturés par élimination de HF. Cette réaction secondaire nous a permis de compléter notre bibliothèque de molécules avec des composés comportant des insaturations. Afin d'accéder aux analogues de phosphocholine saturés nous avons été amenés à modifier notre stratégie de synthèse. Ainsi, la glycérophosphocholine a été employée comme substrat de départ dans la réaction d'estérification. La difficulté rencontrée à cette étape est essentiellement liée à la grande sensibilité de la réaction à la présence d'eau et des précautions particulières ont dû être prises lors du séchage de la glycérophosphocholine (composé chargé). La purification des produits finaux s'est également avérée délicate. L'utilisation de différents supports de purification (silice et silice phase inverse) nous a néanmoins permis d'obtenir les différents composés attendus avec une bonne pureté.

Une autre manière de contourner le problème d'élimination lors de la synthèse des dérivés de phospholipides qui a été envisagée, consiste à modifier la structure de la chaîne grasse hémifluorée en introduisant un groupement méthylène supplémentaire entre la fonction ester et le segment perfluoré (utilisation d'un acide fluoré en bêta). Plusieurs composés "bêta" ont été préparés.

Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à la préparation de composés cationiques hémifluorés. La synthèse des molécules monocationiques (dérivés de DOTAP)

destinées au transfert de gène s'est heurtée au même problème d'élimination de HF évoqué précédemment. Ainsi, lors du couplage des acides gras hémifluorés sous forme de chlorure d'acide au chlorure de 2,3-dihydroxypropyltriméthylammonium environ 10% de produit insaturé sont isolés. Etant donné les difficultés de séparation des dérivés saturés et insaturés et afin de disposer de composés suffisamment purs pour pouvoir réaliser les études physicochimiques et biologiques ultérieures dans de bonnes conditions, nous avons choisi d'éliminer totalement nos produits par traitement en milieu basique. Il faut noter que pour être en mesure de caractériser une éventuelle importance de cette insaturation sur les propriétés d'autoassemblage de nos composés, nous avons conservé le composé C₁₀F₆-TMA pour les études biologiques tout en prenant en compte le fait qu'il soit constitué de 10 % de produit d'élimination. Les composés polycationiques (dérivés de spermine) ont été préparés à l'aide d'une stratégie similaire basée sur une réaction d'estérification d'un dérivé protégé de spermine avec nos différents acides hémifluorés. Cette synthèse n'a pas posé de problème particulier.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Les travaux développés dans le cadre de cette thèse visaient à étudier le potentiel que peut présenter l'utilisation de composés hémifluorés dans des applications de vectorisation. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à des applications qui font appel à la mise en œuvre de systèmes lipidiques auto-organisés. Les éléments de base de tels systèmes sont des lipides amphiphiles qui peuvent avoir des structures diverses et variées et nous nous sommes interrogés sur les propriétés qui pourraient découler de l'introduction de segments fluoroalkylés à proximité de la tête polaire de ces composés amphiphiles. Nous avons ciblé deux applications particulières, l'encapsulation de principes actifs dans des liposomes et la condensation d'ADN pour la délivrance de gènes, et avons conçu diverses architectures lipidiques hémifluorées pour évaluer leurs performances dans ces applications.

Différentes voies de synthèses ont ainsi été développées pour accéder à une trentaine de lipides fluorés originaux. L'étude de leurs propriétés a permis de faire un certain nombre de constatations et de formuler quelques relations entre structure et propriétés.

Dans le cadre des applications en encapsulation, tous les composés synthétisés au laboratoire possèdent effectivement des propriétés d'auto-assemblage et forment des monocouches à l'interface air/eau. Aucun ne présente de transition de phase, phase fluide à phase condensée, dans une gamme de température allant de -20 à $+80$ °C. Les mesures en DSC réalisées sur les phospholipides hémifluorés préparés ont révélé que certains de nos composés présentent des transitions de phase faiblement énergétiques. Les observations au microscope optique en lumière polarisée nous ont permis de démontrer que ces composés sont dans une phase cristal-liquide, sur toute la gamme de température explorée, et que les transitions de phase observées sont donc des transitions cristal liquide à cristal liquide. Afin de mieux caractériser ces phases, deux composés ont été sélectionnés pour des expériences de diffraction de rayons X. La transition de phase visible avec le lipide linéaire $C_{10}F_6$ -PC s'est révélée être une transition de phase lamellaire à phase hexagonale, alors que le lipide ramifié $C_{8R}F_6$ -PG s'est révélé être dans une phase hexagonale sur toute la gamme de température explorée. Cependant, ces études ont été menées sur échantillon sec et des expériences complémentaires sur échantillon hydraté seraient nécessaires pour déterminer si la même transition est observée en milieu aqueux. Pour étudier le potentiel d'encapsulation des liposomes formulés par les composés que nous avons développés, nous avons, dans un premier temps, établi un protocole standard à partir duquel nous avons formulé l'ensemble des liposomes. Les tests de stabilité réalisés avec les liposomes en milieu tamponné ont révélé que nos constructions ne se montrent, en général, pas plus stables que des constructions à base

de lipides fluorés en bout de chaîne et présentent une stabilité à peu près équivalente à celle de liposomes non fluorés. On peut supposer qu'un segment fluoré unique au centre d'une bicouche lipidique confère une meilleure stabilité en milieu neutre que deux segments fluorés disposés de part et d'autre d'une couche lipophile. Cette relative baisse de stabilité due à la fragmentation du segment fluoré serait cependant compensée par une meilleure résistance à l'insertion d'éléments lipophiles dans la membrane. En effet, en présence de lipases et de sérum, nos constructions se révèlent sensiblement plus stables que des liposomes formulés à partir de lipides non fluorés ou fluorés en bout de chaîne. Ce dernier point revêt bien entendu un intérêt tout particulier dans le cadre du développement de futures applications *in vivo*.

En ce qui concerne les structures lipidiques ramifiées, nous ne sommes pas parvenus à les utiliser pour encapsuler de la carboxyfluorescéine et les clichés de microscopie électronique ont mis en évidence la présence de structures tubulaires, vraisemblablement ouvertes.

Dans le cadre des applications en transfection, les lipides cationiques hémifluorés synthétisés ont également révélé des propriétés d'auto-assemblage intéressantes. La taille, le potentiel zêta et la morphologie des particules formées par l'auto-assemblage de nos lipides fluorés avec de l'ADN se sont révélés être similaires à ceux observés pour des lipoplexes hydrocarbonés de référence. Par des expériences de relargage d'ADN, nous avons pu mettre en évidence que nos constructions fluorées résistent nettement mieux que des constructions classiques à la présence de détergents. L'incorporation d'un segment fluoré à proximité de la tête polaire a donc permis de former des lipoplexes plus stables tout en conservant le potentiel de transfection de nos vecteurs, comme nous avons pu le montrer sur différentes lignées cellulaires. La stabilité accrue de nos particules devrait pouvoir être mise à profit dans des applications en transfection *in vivo*.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent clairement l'intérêt que présente l'ajout d'un segment fluoré à proximité de la tête polaire d'un lipide pour la stabilité de ces autoassemblages, particulièrement en présence d'éléments perturbateurs. Ces travaux et plus particulièrement ceux démontrant que ces phases lipidiques fluorées sont plus cohésives que des phases lipidiques classiques ouvrent quelques perspectives intéressantes qui mériteraient d'être développées, par exemple, nous pourrions incorporer des PEG à nos constructions. En effet l'incorporation de PEG à la surface de vecteurs permet d'augmenter leur temps de demi-vie dans les fluides physiologiques en formant une enveloppe protectrice qui rend les constructions lipidiques moins sensibles à l'adsorption de protéines ou d'enzymes et retarde les interactions avec le système immunitaire. Les composés PEGylés ancrés dans une membrane classique peuvent toutefois s'échapper des vecteurs. Tsuchida et al¹⁵⁶ ont démontré qu'il y avait une relation entre les forces hydrophobes qui lient ce composé à la membrane et leur relargage. Le fait de posséder des ancrs hémifluorés pourrait permettre de fixer plus fortement ce genre de composé et donc d'améliorer le temps de demi-vie des particules dans le sang. Cette phase fluorée pourrait bien évidemment permettre d'ancrer

d'autres éléments tels que des peptides de ciblage. Afin de disposer de vecteurs pouvant fusionner plus facilement avec la membrane cellulaire, nous pourrions également introduire un peptide fusogène à la surface de nos vecteurs. Le fluor empêchant de tels vecteurs de fusionner entre eux, les préparations pourraient présenter des propriétés de stabilité intéressantes (sans agrégation) et ils ne montreraient leurs propriétés fusogéniques qu'une fois en présence de membranes hydrocarbonées.

Partie expérimentale

1. Partie expérimentale de chimie

1.1 Solvants et réactifs

Les solvants anhydres utilisés ont été préparés par distillation sous argon, en présence de leur agent déshydratant respectif :

- THF : sodium/benzophénone
- Éther : sodium/benzophénone
- Dichlorométhane : CaH_2
- Acétonitrile : CaH_2

Les autres solvants et co-solvants anhydres ont été préparés à partir de solvants commerciaux de qualité CLHP par addition de sodium filé ou de tamis moléculaire activé (TM 4Å) :

Fil de sodium :

- Benzène, Toluène, Triéthylamine

Tamis moléculaire 4Å :

- Méthanol
- Éthanol
- DMF
- DMSO
- Acétate d'éthyle
- Chloroforme
- Tétrachlorure de carbone

Les produits commerciaux ont été utilisés sans aucune purification à l'exception des composés suivants :

- Trichlorure de phosphore : distillation à pression atmosphérique
- Oxychlorure de phosphore : distillation sous vide
- Diéthylamine : distillation à pression atmosphérique
- Alcool benzylique : distillation sous vide

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Chromatographie

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince de silice (Merck 0,25 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄, 40-60 μm , 230-400 mesh ASTM) ou de silice "greffée" en phase inverse (Merck 0,20 mm, RP-18, WF₂₅₄). La révélation des plaques a été effectuée par illumination ultraviolette à 254 ou 365 nm, puis par pulvérisation d'un révélateur (acide phosphomolybdique, vanilline ou ninhydrine) suivi d'un chauffage à 200°C, ou par exposition de la plaque à des vapeurs d'iode. Les dérivés phosphorés sous forme acide ont été révélés à l'aide du bleu de phosphomolybdène, sans chauffage.

Les chromatographies sur colonne de silice ont été réalisées en employant la silice Merck (Kieselgel 60, 40-60 μm , 230-400 mesh ASTM). Le système d'élution est précisé pour chaque purification.

1.2.2 Spectroscopie Infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre (Thermo-Fischer Scientific). Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

1.2.3 Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur des appareils Brüker WP-200 SY, équipé d'une sonde $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 5 mm (Dual) pour le proton (fréquence d'irradiation : 200 MHz) et pour le carbone 13 (fréquence d'irradiation : 50 MHz), d'une sonde large bande X/ ^1H 5 mm (BBigr) pour le proton et pour le phosphore 31 (fréquence d'irradiation : 81 MHz) ou d'une sonde $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ 5 mm (Dual) pour le fluor 19 (fréquence d'irradiation : 188 MHz), et Brüker DPX 300 (300 MHz), équipé d'une sonde $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 5 mm (Dual) pour le proton (fréquence d'irradiation : 300 MHz) et pour le carbone 13 (fréquence d'irradiation : 75 MHz) ou d'une sonde large bande à détection inverse et gradients-z 5 mm (BBigr) pour le proton, pour le phosphore 31 (fréquence d'irradiation : 121 MHz). Les spectres ^{13}C et ^{31}P ont été découplés du proton pendant l'acquisition. Les paramètres utilisés pour le proton et pour le phosphore 31 permettent d'obtenir des informations quantitatives par intégration des différents pics.

- **Références**

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport à la référence standard pour le noyau considéré :

- Proton	TMS à 0,00 ppm
- Carbone 13	TMS à 0,00 ppm
- Phosphore 31	H_3PO_4 85% à 0,00 ppm
- Fluor 19	$\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ à -76,99 ppm

Dans la majorité des cas, une référence secondaire dont le déplacement chimique est connu est utilisée à la place de la référence standard :

Noyau	Solvant	Référence	Déplacement chimique (ppm)
^1H	CDCl_3	CHCl_3	7,27
	CD_3OD	CD_2HOD	3,31
	$\text{DMSO-}d_6$	$\text{CD}_2\text{HSOCD}_3$	2,50
	D_2O	HDO	4,63
^{13}C	CDCl_3	CDCl_3	77,0
	CD_3OD	CD_3OD	49,0
	$\text{DMSO-}d_6$	CD_3SOCD_3	39,7
	D_2O	<i>tert</i> -butanol interne	70,3 et 30,2

³¹ P	Tous	H ₃ PO ₄ 85% externe*	0
¹⁹ F	Tous	CFCl ₃ externe*	0

(*) L'expérience RMN est réalisée en présence d'un capillaire contenant la référence. Le spectre est calibré sur le pic correspondant à la référence.

- **Systèmes de spins**

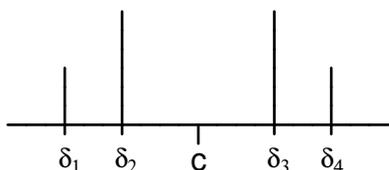
Pour les systèmes de spins du premier ordre, les déplacements chimiques et les constantes de couplage J (exprimés en Hz) ont été lus directement sur le spectre. La description des spectres utilise les abréviations suivantes :

s :	singulet	quint :	quintuplet
d :	doublet	sext :	sextuplet
t :	triplet	h :	heptuplet
q :	quadruplet	m :	multiplet

Pour les systèmes de spin du second ordre, les déplacements chimiques réels et les constantes de couplage ont été calculés pour les systèmes simples (AB, ABX)

Méthodes de calcul des déplacements chimiques et des constantes de couplage pour les systèmes AB et ABX

Système AB



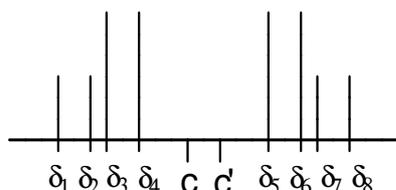
$$\text{avec } \begin{cases} c = \frac{\delta_1 + \delta_4}{2} = \frac{\delta_2 + \delta_3}{2} \\ \Delta\delta = |\delta_A - \delta_B| = \sqrt{(\delta_1 - \delta_4)(\delta_2 - \delta_3)} \end{cases}$$

$$\delta_A = c + \frac{\Delta\delta}{2}$$

$$\delta_B = c - \frac{\Delta\delta}{2}$$

$$J_{AB} = \nu(\delta_1 - \delta_2) = \nu(\delta_3 - \delta_4)$$

Système ABX



$$\text{avec } \begin{cases} c = \frac{\delta_1 + \delta_7}{2} ; c' = \frac{\delta_2 + \delta_8}{2} \\ \Delta\delta = \sqrt{(\delta_1 - \delta_7)(\delta_3 - \delta_5)} ; \Delta\delta' = \sqrt{(\delta_2 - \delta_8)(\delta_4 - \delta_6)} \\ \delta_a = c + \frac{\Delta\delta}{2} ; \delta_b = c - \frac{\Delta\delta}{2} \\ \delta_{a'} = c' + \frac{\Delta\delta'}{2} ; \delta_{b'} = c' - \frac{\Delta\delta'}{2} \end{cases}$$

$$\delta_A = \frac{\delta_a + \delta_{a'}}{2}$$

$$\delta_B = \frac{\delta_b + \delta_{b'}}{2}$$

$$J_{AB} = \nu(\delta_1 - \delta_3) = \nu(\delta_2 - \delta_4)$$

$$J_{AX} = \nu(\delta_a - \delta_{a'})$$

$$J_{BX} = \nu(\delta_b - \delta_{b'})$$

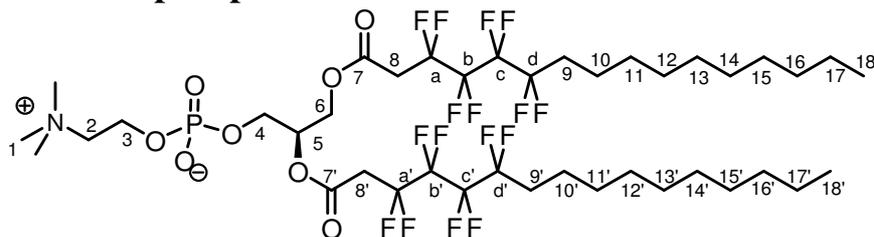
Les notations standards pour les systèmes de spins ont été utilisées : chaque spin est représenté par une lettre. La position de cette lettre dans l'alphabet reflète la différence de déplacement chimique entre les spins. Si plusieurs noyaux sont portés par le même atome, ils sont notés A_x , où x représente le nombre de noyaux s'ils sont magnétiquement équivalents (par ex. A_2B_2), et A, A', A'' dans le cas contraire (par ex. $AA'BX$), sauf pour les systèmes AA' et $AA'X$ désignés respectivement AB et ABX .

Le signe des constantes de couplage spécifiées dans les descriptions de spectres RMN n'a pas été déterminée expérimentalement mais correspond au signe généralement observé pour la structure considérée.

Les attributions des signaux des spectres ont été effectués dans la mesure du possible, par comparaison aux données de la littérature, ou à des molécules de structures voisines, ou encore grâce à des expériences complémentaires DEPT135, irradiations, COSY, HMBC, HMQC...).

1.3 Modes Opérateurs et analyses

1 1,2-di(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluorohexadécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine



$C_{40}H_{64}F_{16}NO_8P$
MM : 1021,89 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **1** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **3** à partir de l'acide **31c** (198 mg, 496 μ mol, 3 éq) et de la glycérophosphocholine commerciale (42 mg, 165 μ mol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 25 mg (24 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 15 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ ($CHCl_3/MeOH/H_2O$ 10/6/1).

RMN 1H ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,15-5,00 (m, 1H, H_5); 4,30-3,90 (m, 4H, H_4 , H_3); 3,85-3,70 (m, 2H, H_6); 3,35-3,25 (m, 2H, H_2); 3,03-2,81 (m, 11H, H_8 , H_8' , H_1); 1,90-1,65 (m, 4H, H_9 , H_9'); 1,35-0,80 (m, 32H, H_{10-17} , $H_{10'-17'}$); 0,65-0,50 (m, 6H, H_{18} , $H_{18'}$).

RMN ^{13}C ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,50 et 163,28 (2s, C_7 , $C_{7'}$); 125-100 (CF_2); 71,16 (C_5); 65,81 (C_2); 62,78 (C_4 , C_6); 58,69 (C_3); 53,37 (C_1); 36,21 et 36,09 (2t, $^2J_{C-F} = 21,7\text{Hz}$, C_8 , $C_{8'}$); 31,28 (C_{16} , $C_{16'}$); 30,31 (t, $^2J_{C-F} = 22,2\text{Hz}$, C_9 , $C_{9'}$); 29,00-28,50 (C_{11-15} , $C_{11'-15'}$); 22,03 (C_{17} , $C_{17'}$); 19,55 (C_{10} , $C_{10'}$); 13,18 (C_{18} , $C_{18'}$).

RMN ^{19}F ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-110,1 à -110,0 (m, 4F, F_a , F_a'); -112,6 à -112,7 (m, 4F, F_d , F_d'); -121,5 à -121,6 (m, 8F, F_b , F_b' , F_c , F_c').

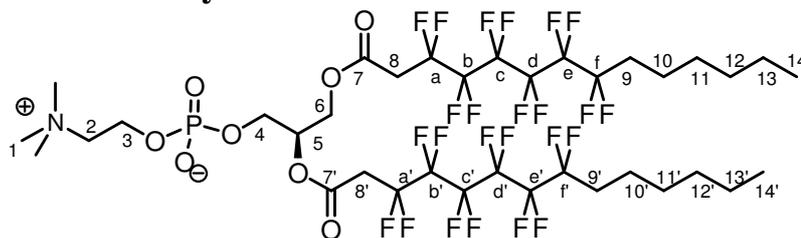
RMN ^{31}P ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1 121 MHz) δ (ppm) :

0,31 (s).

IR ν (cm^{-1}):

3383, 2953, 2923, 2852, 1749, 1469, 1378, 1231, 1165, 1094, 1053, 969, 838, 668.

2 (2-[[2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro tétradécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



$C_{36}H_{48}F_{24}NO_8P$
 MM : 1109,7 g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **2** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **3** à partir de l'acide **31b** (184 mg, 413 μ mol, 3 éq) et de la glycérophosphocholine commerciale (35,4 mg, 138 μ mol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 24 mg (21 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 15 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ ($CHCl_3/MeOH/H_2O$ 10/6/1).

RMN ¹H ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,10-5,00 (m, 1H, H₅); 4,30-3,90 (m, 4H, H₄, H₃); 3,80-3,70 (m, 2H, H₆); 3,35-3,28 (m, 2H, H₂); 3,05-2,81 (m, 11H, H₈, H_{8'}, H₁); 1,88-1,65 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,35-0,80 (m, 16H, H₁₀₋₁₃, H_{10'-13'}); 0,65-0,50 (m, 6H, H₁₄, H_{14'}).

RMN ¹³C ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,43 et 163,21 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 71,15 (C₅); 65,68 (C₂); 62,73 (C₆); 62,56 (C₄); 58,61 (C₃); 53,16 (C₁); 36,25-35,45 (m, C₈, C_{8'}); 30,71 (C₁₂, C_{12'}); 30,16 (t, ²J_{C-F} = 22,3 Hz, C₉, C_{9'}); 28,05 (C₁₁, C_{11'}); 21,66 (C₁₃, C_{13'}); 19,38 (C₁₀, C_{10'}); 12,84 (C₁₄, C_{14'}).

RMN ¹⁹F ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,8 à -110,0 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,8 à -120,0 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,1 à -121,8 (m, 8F, F_b, F_{b'}, F_e, F_{e'}).

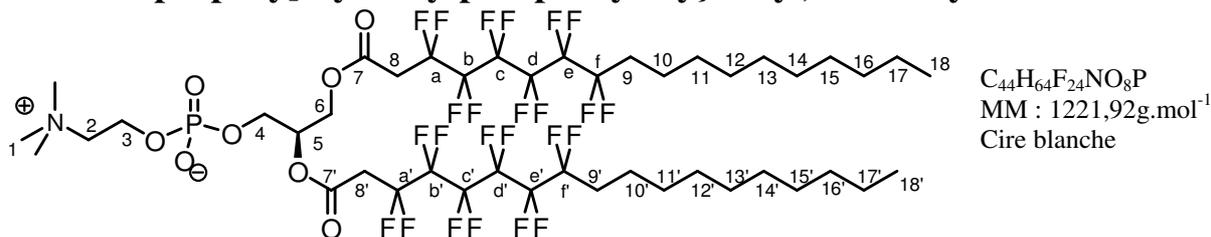
RMN ³¹P ($CDCl_3/CD_3OD$ 121 MHz) δ (ppm) :

0,31 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3377, 2953, 2921, 2852, 1748, 1469, 1384, 1183, 1137, 1090, 1053, 969, 797, 721, 702, 630, 563, 542.

3 (2-([2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro octadécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy)-éthyl)-triméthyl-ammonium



MODE OPÉRATOIRE

À 225 mg (449 μmol , 4 éq) d'acide **31a** dans 2 mL de CH₂Cl₂, on ajoute 195 μL (2,25 μmol , 20 éq) de chlorure d'oxalyle et une quantité catalytique de DMF (1 μL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le chlorure d'acide est repris et évaporé 3 fois dans du toluène. On solubilise finalement le produit dans 4 mL de CH₂Cl₂. Cette solution est ajoutée à 3 mL de CH₃CN contenant 28,9 mg de glycérophosphocholine (112 μmol , 1 éq) commerciale qui a été préalablement reprise et évaporé 3 fois dans un mélange CH₃CN/toluène anhydre (une sonication est nécessaire pour solubiliser le diol), du tamis moléculaire 3Å broyé et une spatule de célite (préalablement flambée sous vide). On rajoute 37 μL (450 μmol , 4 éq) de pyridine. La réaction est laissée sous irradiation aux ultrasons pendant 1 h, puis sous agitation à température ambiante une nuit. On additionne ensuite 10 μL d'eau et on filtre sur sable et célite. Le brut réactionnel récupéré est adsorbé sur silice et purifié par chromatographie sur Silice (éluant : CHCl₃/MeOH/H₂O 95/5/0→10/6/1), puis sur silice phase inverse RPC18 (Bondelut[®] C₁₈) (éluant : MeOH/H₂O 8/2→100/0). On obtient ainsi 30,5 mg (25 μmol) d'une cire blanche soit un rendement de 22 %. Nous avons également isolé 15 mg de produit monoestérifié **13** (lyso-PC) soit un rendement de 15%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,15-5,00 (m, 1H, H₅); 4,30-3,90 (m, 4H, H₄, H₃); 3,85-3,70 (m, 2H, H₆); 3,33-3,22 (m, 2H, H₂); 3,03-2,81 (m, 11H, H₈, H_{8'}, H₁); 1,90-1,65 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,35-0,80 (m, 32H, H₁₀₋₁₇, H_{10'-17'}); 0,65-0,50 (m, 6H, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,50 et 163,28 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 71,11 (C₅); 65,76 (C₂); 62,85-62,65 (C₄, C₆); 58,67 (C₃); 53,30 (C₁); 36,30-35,45 (m, C₈, C_{8'}); 31,25 (C₁₆, C_{16'}); 30,26 (t, ²J_{C-F} = 22,2 Hz, C₉, C_{9'}); 30,00-28,40 (C₁₁₋₁₅, C_{11'-15'}); 21,99 (C₁₇, C_{17'}); 19,50 (C₁₀, C_{10'}); 13,12 (C₁₈, C_{18'}).

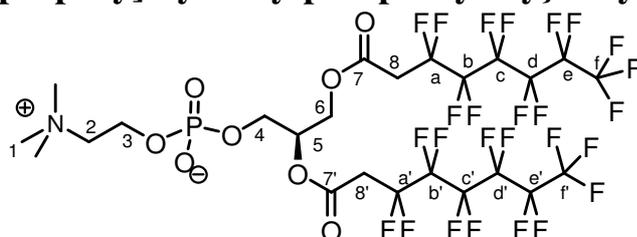
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,8 à -110,0 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -112,5 à -112,6 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,8 à -120,0 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,1 à -121,7 (m, 8F, F_b, F_{b'}, F_e, F_{e'}).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 121 MHz) δ (ppm) :
0,31 (s).

IR ν (cm⁻¹):
3377, 2953, 2921, 2852, 1748, 1469, 1384, 1183, 1137, 1090, 1053, 969, 797, 721,
702, 630, 563, 542.

4 (2-[[2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridécafluoro octanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₂₄H₂₂F₂₆NO₈P
MM : 977,37g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **4** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **3** à partir de l'acide **31D** (313 mg, 828 μmol, 3,5 éq) et de la glycérophosphocholine commerciale (60,8 mg, 236 μmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 18 mg (19 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 8 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

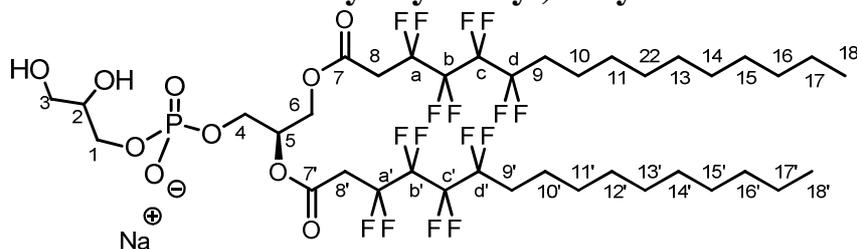
RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
5,05-4,95 (m, 1H, H₅); 4,26-3,90 (m, 4H, H₄, H₃); 3,80-3,65 (m, 2H, H₆); 3,28-3,15 (m, 2H, H₂); 3,03-2,81 (m, 11H, H₈, H_{8'}, H₁).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
-79,80 à -79,90 (m, 6F, F_f, F_{f'}); -110,6 à -110,8 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -120,6 à -120,8 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -121,6 à -121,8 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -125,0 à -125,1 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
-0,04 (s).

IR ν (cm⁻¹):
3361, 2925, 2853, 2512, 1748, 1652, 1456, 1361, 1232, 1201, 1143, 1118, 1088, 1065,
1015, 971, 746, 724, 710.

5 **3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluoro hexadécanoate de 2-[(2,3-dihydroxypropoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hexadécanoyloxyméthyl)-éthyle**



$C_{38}H_{58}F_{16}NaO_{10}P$
 MM : 1032,80g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **5** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **7** à partir du précurseur **61c** (17 mg, 13,2µmol). On obtient ainsi 13 mg (11,9µmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
 5,15-4,98 (m, 1H, H₅); 4,31-4,00 (m, 2H, H₄); 3,85-3,72 (m, 2H, H₆); 3,70-3,22 (m, 5H, H₁₋₃); 2,99-2,88 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,78-1,55 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,30-1,19 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,18-0,92 (m, 14H, H₁₁₋₁₈); 0,56 (t, ³J₁₇₋₁₈ = ³J_{17'-18'} = 6,6Hz, 6H, H₁₈, H_{18'}).

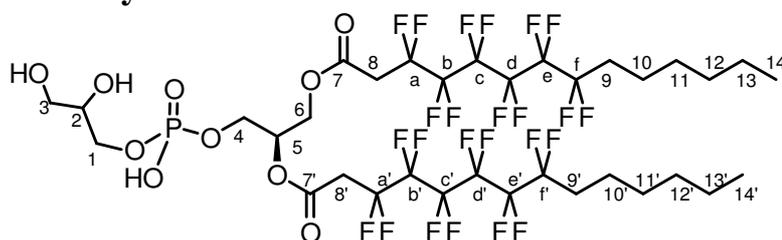
RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :
 163,60 (C₇); 163,30 (C_{7'}); 121,00-100,00 (C_{a-d}, C_{a'-d'}); 70,38 (C₂); 69,92 (C₅); 67,51 (C₃), 63,83 (C₄), 62,21 (C₁); 61,74 (C₆); 36,14 (m, C₈, C_{8'}); 31,25 (C₁₆); 29,98 (t, ²J_{C-F} = 22,4Hz, C₉, C_{9'}); 28,98-28,50 (m, C₁₁₋₁₆, C_{11'-16'}); 21,99 (s, C₁₇, C_{17'}); 19,52 (s, C₁₀, C_{10'}); 13,10 (s, C₁₈, C_{18'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
 -110,4 à 110,5 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -113,0 à -113,1 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -121,8 à -122,0 (m, 8F, F_{b-c}, F_{b'-c'}).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
 1,9 (s).

IR ν (cm⁻¹):
 3342, 2923, 2854, 1754, 1467, 1380, 1164, 1106, 1037, 866, 737, 646, 523.

6 **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-tétradécanoate de 2-[(2,3-dihydroxy-propoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-tétradécanoyloxyméthyl)-éthyle**



C₃₄H₄₃F₂₄O₁₀P
MM : 1098,63g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **6** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **7** à partir du précurseur **61b** (165 mg, 120 µmol). On obtient ainsi 118 mg (108 µmol) d'une cire blanche soit un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,05-4,95 (m, 1H, H₅); 4,31-3,95 (m, 2H, H₄); 3,70-3,61 (m, 2H, H₆); 3,55-3,18 (m, 5H, H₁₋₃); 2,99-2,82 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,70-1,53 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,20-1,15 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,02-0,87 (m, 14H, H₁₁₋₁₈); 0,52-0,48 (m, 6H, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,38 et 163,11 (C₇, C_{7'}); 120-100 (CF₂); 70,57 (C₂); 69,97 (C₅); 67,56 (C₁); 63,79 (C₄); 62,46 (C₃); 61,74 (C₆); 36,02 et 35,90 (2t, ²J_{C-F} = 21,5 Hz, C₈, C_{8'}); 30,80 (C₁₂, C_{12'}); 30,26 (t, ³J_{C-F} = 22,2 Hz, C₉, C_{9'}); 28,13 (C₁₁, C_{11'}); 21,75 (C₁₃, C_{13'}); 19,46 (C₁₀, C_{10'}); 12,96 (C₁₄, C_{14'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-110,2 à -110,3 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -112,9 à -113,0 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -120,2 à -120,4 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,5 à -121,7 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -122,1 à 122,2 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

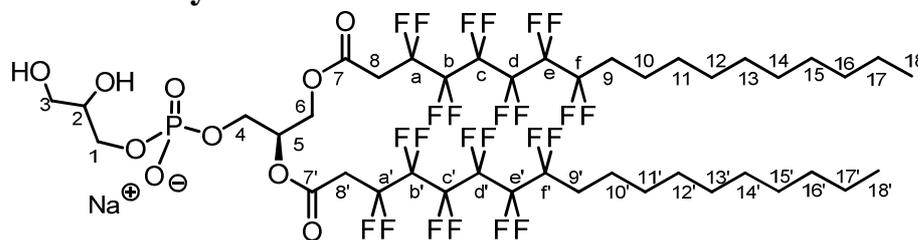
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

1,91 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3376, 2957, 2860, 2494, 1753, 1461, 1381, 1186, 1138, 1046, 881, 795, 694, 627, 520.

7 **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro octadécanoate de 2-[(2,3-dihydroxy-propoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécanoyloxyméthyl)-éthyle**



C₄₂H₅₈F₂₄NaO₁₀P
MM : 1232,83 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans 5 mL d'un mélange de THF et d'isopropanol 50/50 on introduit le composé **61a** (207 mg, 139 μ mol) ainsi que 5 mg de catalyseur Pd/C 10%. Le montage est purgé et placé sous atmosphère d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 3 heures. On filtre ensuite le catalyseur sur célite et on purifie le produit sur silice (éluant CHCl₃ → CHCl₃/MeOH 6/4 → CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1). On obtient ainsi 130 mg (107 μ mol) d'une cire blanche avec un rendement de 77 %. Pour finir, on neutralise la solution en ajoutant 0,9 équivalents de formate de sodium (96 μ L d'une solution à 1M dans l'EtOH) et on évapore le solvant organique pour stocker notre produit à -20C°.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,5-5,20 (m, 1H, H₅); 4,55-3,45 (m, 9H, H₁₋₃, H₄, H₆); 3,35-3,00 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 2,10-1,83 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,65-1,45 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,35-1,00 (m, 28H, H₁₁₋₁₇, H_{11'-17'}) 0,81 (t, 6H, ³J₁₇₋₁₈ = ³J_{17'-18'} = 5,5 Hz, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,60 (C₇); 163,30 (C_{7'}); 121,00-100,00 (C_{a-d}, C_{a'-d'}); 70,38 (C₂); 69,92 (C₅); 67,51 (C₃), 63,83 (C₄), 62,21 (C₁); 61,74 (C₆); 36,21 et 35,90 (2t, ²J_{C-F} = 21,4 Hz, C₈, C_{8'}); 31,25 (C₁₆); 29,98 (t, ²J_{C-F} = 22,4 Hz, C₉, C_{9'}); 28,98-28,50 (m, C₁₁₋₁₆, C_{11'-16'}); 21,99 (C₁₇, C_{17'}); 19,52 (C₁₀, C_{10'}); 13,10 (C₁₈, C_{18'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,3 à -111,5 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -113,8 à -114,0 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -121,3 à -121,4 (m, 8F, F_{c-d}, F_{c'-d'}); -122,6 à -122,8 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -123,1 à -123,2 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

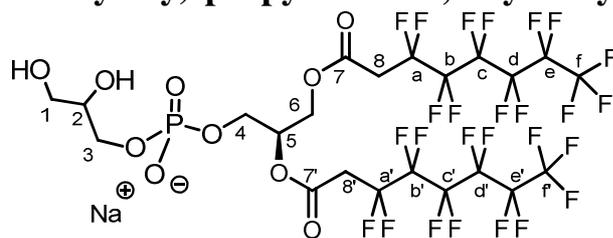
RMN ³¹P (CDCl₃/MeOD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

-0,53 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3346, 2955, 2921, 2852, 1749, 1468, 1379, 1188, 1138, 1109, 1051, 844, 721, 703, 630, 542.

8 Phosphate de (R) -2,3-bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridécafluoro octanoyloxy)-propyle et de 2,3-hydroxy-propyle (sel de sodium)



$C_{22}H_{16}F_{26}NaO_{10}P$
 MM : 988,22g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **8** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **7**, à partir du précurseur **61d** (70 mg, 56,6 μmol). On obtient ainsi 50 mg (56,2 μmol), d'une cire blanche avec un rendement de 80 %.

ANALYSES

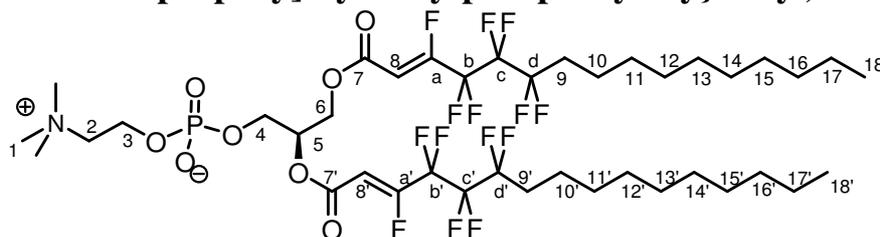
CCM : $R_f = 0,2$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
 5,45-5,30 (m, 1H, H₅); 4,57-4,39 (m, 2H, H₄); 4,06 (t, 2H, ³J₆₋₅ = 5,5 Hz, H₆); 3,90-3,42 (m, 9H, H₁₋₃, H₈, H_{8'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
 -79,8 à -79,7 (m, 6F, F_f, F_{f'}); -110,0 à -109,9 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -120,1 à -120,2 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,1 à -120,2 (m, 8F, F_c, F_d, F_{c'}, F_{d'}); -124,5 à 124,8 (4F, F_e).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
 5,19 (s).

9 (2-[[2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6-heptafluoro octadécanyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



$C_{40}H_{62}F_{14}NO_8P$
 MM : 981,87 g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **9** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **11** à partir du précurseur bromé **29c** (19 mg, 16,7 μmol, 1 éq) et 84 μL (168 μmol, 10 éq) de triméthylamine anhydre (2M dans le THF). Après purification on obtient 7,5 mg (7,6 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 45 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,95 et 5,91 (2d, 2H, ³J_{H-F} = 29,5 Hz, H₈, H_{8'}); 5,35-5,25(m, 1H, H₅); 4,60-3,91 (m, 6H, H₃, H₄, H₆); 3,65-3,45 (m, 2H, H₂); 3,16 (s, 9H, H₁); 2,08-1,75 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,65-1,10 (m, 32H, H₁₀₋₁₇, H_{10'-17'}); 0,80 (t, ³J₁₇₋₁₈ = ³J_{17'-18'} = 6,7 Hz, 6H, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

160,51 et 160,15 (2s, C₇, C_{7'}); 160,00-150,00 (C_a); 125-106 (C_{b-d}); 104,38 et 104,21 (C₈, C_{8'}); 70,87 (C₅); 65,83 (C₂); 62,75-62,55 (C₄, C₆); 58,58 (C₃); 53,32 (C₁); 31,27 (C₁₆, C_{16'}); 30,16 (t, ²J_{C-F} = 21,7 Hz, C₉, C_{9'}); 28,95-28,45 (m, C₁₁₋₁₅, C_{11'-15'}); 22,01 (C₁₇, C_{17'}); 19,48 (C₁₀, C_{10'}); 13,14 (C₁₈, C_{18'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-104,0 à -104,1 (m, 2F, F_a, F_{a'}); -112,3 à -112,5 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -117,0 à -117,1 (m, 4F, F_c, F_{c'}); -123,1 à -123,3 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

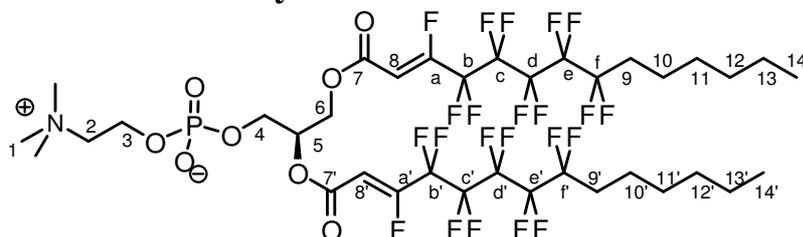
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

0,29 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3392, 2959, 2921, 2854, 1734, 1699, 1471, 1457, 1374, 1236, 1163, 1101, 1065, 970.

10 (2-[[2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-undécafluoro octadécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₃₆H₄₆F₂₂NO₈P
MM : 1069,69 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **10** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **11** à partir du précurseur bromé **57b** (40,3 mg, 32,9 μmol, 1 éq) et 83 μL (166 μmol, 5 éq) de triméthylamine anhydre (2M dans le THF). Après purification, on obtient 13,6 mg (12,7 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 41 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,98 et 5,94 (2d, 2H, ³J_{H-F} = 29,5 Hz, H₈, H_{8'}); 5,35-5,25 (m, 1H, H₅); 4,60-3,91 (m, 6H, H₃, H₄, H₆); 3,55-3,45 (m, 2H, H₂); 3,11 (s, 9H, H₁); 2,08-1,75 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,65-1,10 (m, 16H, H₁₀₋₁₃, H_{10'-13'}); 0,80 (t, ³J₁₃₋₁₄ = ³J_{13'-14'} = 6,7 Hz, 6H, H₁₄, H_{14'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

160,20 et 159,87 (2s, C₇, C_{7'}); 157-151 (C_a, C_{a'}); 125-106 (C_{b-d}); 105,34 et 105,17 (C₈, C_{8'}); 71,02 (C₅); 65,81 (C₂); 62,68 (C₄, C₆); 58,90 (C₃); 53,30 (C₁); 30,78 (C₁₂, C_{12'}); 30,22 (t, ²J_{C-F} = 21,7 Hz, C₉, C_{9'}); 28,11 (C₁₁, C_{11'}); 21,73 (C₁₃, C_{13'}); 19,43 (C₁₀, C_{10'}); 13,31 (C₁₄, C_{14'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-105,0 à -105,1 (m, 2F, F_a, F_{a'}); -112,7 à -112,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -117,1 à -117,3 (m, 4F, F_c, F_{c'}); -120,0 à -120,2 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,4 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,9 à -122,1 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

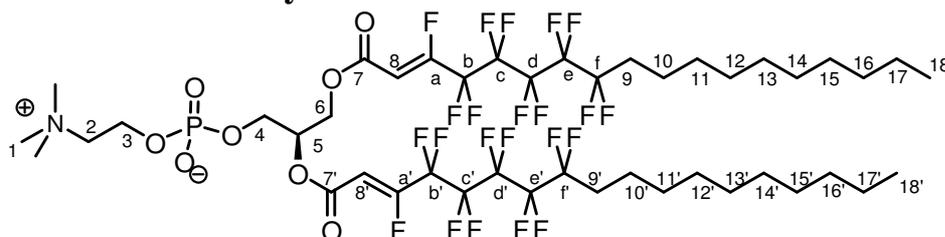
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

1,88 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3392, 2959, 2921, 2861, 1734, 1698, 1653, 1471, 1374, 1236, 1190, 1135, 1091, 1053, 970, 727, 707, 646, 544.

11 (2-[[2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-undécafluoro octadécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy}-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₄₄H₆₂F₂₂NO₈P
MM : 1181,9 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

À 101 mg (75,7 μmol, 1 éq) de composé **57a** en solution dans 4 mL de CH₃CN anhydre dans un tube scellé on ajoute 290 μL (580 μmol, 7,5 éq) de triméthyle amine anhydre (2M dans le THF). Le milieu réactionnel est agité 4 jours à température ambiante, puis le solvant est évaporé, le résidu obtenu est adsorbé sur silice et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CHCl₃/MeOH/H₂O 100/0/0→60/40/0→10/6/1). On récupère ainsi 22,8 mg (19,3 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 25%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

6,00 et 5,96 (2d, 2H, ³J_{H-F} = 29,7 Hz, H₈, H_{8'}); 5,40-5,30 (m, 1H, H₅); 4,60-4,01 (m, 6H, H₃, H₄, H₆); 3,60-3,45 (m, 2H, H₂); 3,14 (s, 9H, H₁); 2,05-1,85 (m, 4H, H₉, H_{9'}); 1,65-1,40 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,35-1,10 (m, 28H, H₁₁₋₁₇, H_{11'-17'}); 0,80 (t, ³J₁₈₋₁₇ = ³J_{18'-17'} = 6,7 Hz, 6H, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

160,35 et 160,00 (2s, C₇, C_{7'}); 125-106 (CF₂); 105,37 et 105,20 (C₈, C_{8'}); 71,11 (C₅); 66,00 (C₂); 62,85-62,80 (C₄, C₆); 58,63 (C₃); 53,50 (C₁); 31,36 (C₁₆, C_{16'}); 30,35 (t, ²J_{C-F} = 21,7 Hz, C₉, C_{9'}); 29,00-28,55 (m, C₁₁₋₁₅, C_{11'-15'}); 22,12 (C₁₇, C_{17'}); 19,59 (C₁₀, C_{10'}); 13,31 (C₁₈, C_{18'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-105,0 à -105,2 (m, 2F, F_a, F_{a'}); -112,7 à -112,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -117,1 à -117,3 (m, 4F, F_c, F_{c'}); -120,0 à -120,2 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,4 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,9 à -122,1 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

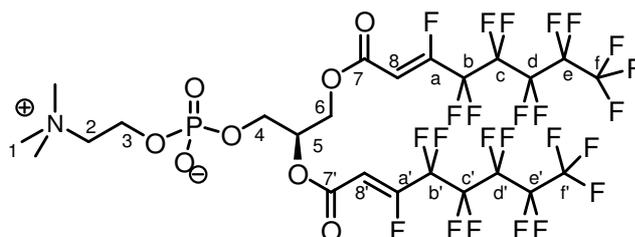
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD, 121 MHz) δ (ppm) :

1,92 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3392, 2959, 2921, 2861, 1734, 1698, 1653, 1471, 1374, 1236, 1190, 1135, 1091, 1053, 970, 727, 707, 646, 544.

12 (2-[[2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-dodécafluoro-oct-2-énoxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy}-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₂₄H₂₀F₂₄NO₈P
MM : 937,35g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **12** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **11** à partir du précurseur bromé **57d** (99 mg, 90,0 μmol, 1 éq) et 340 μL (680 μmol, 7,5 éq) de triméthylamine anhydre (2M dans le THF). Après purification, on obtient 15,5 mg (16,5 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 18 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,87 et 5,83 (2d, 2H, ³J_{H-F} = 30,0 Hz, H₈, H_{8'}); 5,15-5,02 (m, 1H, H₅); 4,33-3,99 (m, 2H, H₄); 3,93-3,85 (m, 2H, H₃); 3,80-3,65 (m, 2H, H₆); 3,32-3,20 (m, 2H, H₂); 2,86 (m, 9H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

160,10 et 159,76 (2s, C₇, C_{7'}); 154,00-149,00 (m, C_a, C_{a'}); 125,00-106,00 (C_{b-f}, C_{b'-f'}); 105,82 et 105,65 (C₈, C_{8'}); 71,16 (C₅); 65,89 (C₂); 62,83-62,65 (C₄, C₆); 58,62 (C₃); 53,42 (C₁).

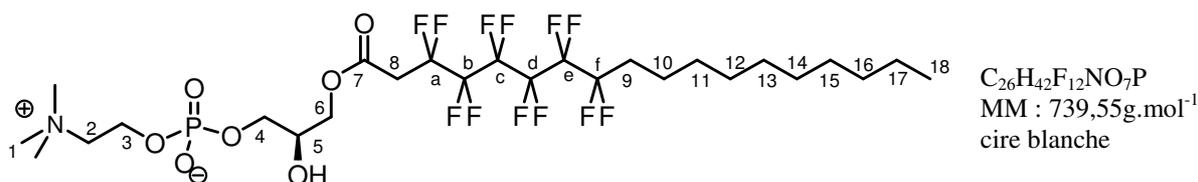
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-74,8 à -74,9 (m, 6F, F_f, F_f); -100,0 à -101,3 (m, 2F, F_a, F_a); -112,5 à -112,7 (m, 4F, F_e, F_e); -116,6 à -117,0 (m, 8F, F_c, F_c, F_d, F_d); -120,1 à -120,2 (m, 4F, F_b, F_b).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD, 121 MHz) δ (ppm) :
4,48 (s).

IR ν (cm⁻¹):
2923, 2854, 2362, 2240, 2061, 1715, 1540, 1457, 1399, 1203, 1142, 966, 669, 443, 427.

13 (2-[[3-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécanoyloxy)-2-hydroxy-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



MODE OPÉRATOIRE

Le composé **13** est un sous produit de la réaction d'estérification permettant d'obtenir le produit **3**. Ce composé monoalkylé a été obtenu par purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/MeOH/eau 100/0/0→10/6/1) Nous avons obtenu 15,3 mg (24 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 15 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,8 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

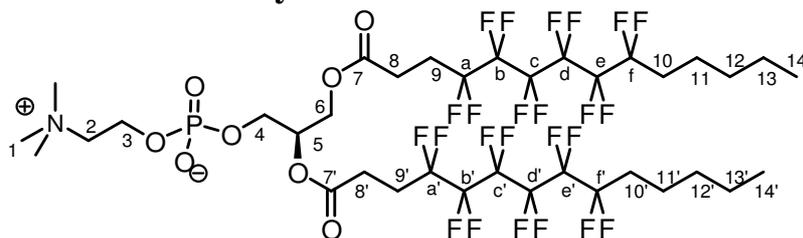
RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
4,10-3,90 (m, 5H, H₃, H₄, H₅); 3,65-3,62 (m, 2H, H₆); 3,40 et 3,42 (2t, ³J₂ = 18,4Hz, et ³J₂ = 17,5 Hz, 2H, H₈) et 3,42 (2 3,35-3,23 (m, 2H, H₂); 2,89 (s, 9H, H₁); 1,90-1,65 (m, 4H, H₉); 1,35-0,80 (m, 16H, H₁₀₋₁₇); 0,65-0,50 (m, 3H, H₁₈).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
-110,8 à -110,9 (m, 2F, F_a); -113,1 à -113,2 (m, 2F, F_f); -120,5 à -120,7 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,8 (m, 2F, F_e); -122,3 à -122,4 (m, 2F, F_b).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
0,42 et -0,30 (2s).

IR ν (cm⁻¹):
3381, 2949, 2921, 2852, 1747, 1593, 1470, 1380, 1194, 1138, 1088, 1055, 968, 767, 561.

14 (2-[[2,3-Bis-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-dodécafluoro-tétradécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



$C_{36}H_{48}F_{24}NO_8P$
 MM : 1109,7g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans un mélange CH₃CN/CH₂Cl₂ (2 mL/1,5 mL), on introduit 180 mg (405 μmol, 2,3 éq) de l'acide **34**, 44 mg (171 μmol, 1 éq) de glycérophosphocholine (préalablement séchée en la reprenant et l'évaporant 3 fois dans un mélange CH₃CN/toluène anhydre), 158 mg (766 μmol, 4,5 éq) de DCC et une quantité catalytique de DMAP (5 mg, 40 μmol, 0,23 éq). Le milieu réactionnel est laissé la nuit au sonicateur, puis on élimine l'ammonium de départ et le précipité de DCU par filtration sur célite. On concentre le filtrat et on adsorbe le résidu sur silice afin d'effectuer une chromatographie sur colonne (éluant : CH₃Cl₃/MeOH/H₂O 95/5/0 → 10/6/1). Une deuxième purification est effectuée sur silice phase inverse RPC18 (Bondelut[®] C₁₈)(éluant MeOH/H₂O 80/20 → 100/00). On récupère ainsi 56 mg (50 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 28 %.

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,20-5,10 (m, 1H, H₅); 4,45-4,30 (m, 1H, H₄); 4,20-4,05 (m, 3H, H₃, H₄); 3,91 (t, ³J₅₋₆ = 6,2 Hz, H₆); 3,55-3,45 (m, 2H, H₂); 3,10 (s, 9H, H₁); 2,70-2,20 (m, 8H, H₈, H₉, H_{8'}, H_{9'}); 2,10-1,75 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,60-1,40 (m, 4H, H₁₁, H_{11'}); 1,35-1,15 (m, 8H, H₁₂, H_{12'}, H₁₃, H_{13'}); 0,90-0,75 (m, 6H, H₁₄, H_{14'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

170,67 et 170,41 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 70,75 (C₅); 65,78 (C₂); 62,90-62,50 (m, C₆, C₄) 58,54 (C₃); 53,26 (C₁); 30,55 (C₁₂, C_{12'}); 30,19 (t, ²J_{C-F} = 22,4 Hz, C₁₀, C_{10'}); 25,72 (t, ³J_{C-F} = 22,1 Hz, C₉, C_{9'}); 24,80-24,60 (m, C₈, C_{8'}); 21,60 (C₁₃, C_{13'}); 12,78 (C₁₄, C_{14'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-113,1 à -113,3 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -113,5 à -113,7 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -120,6 à -120,7 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -122,4 à -122,6 (m, 8F, F_b, F_{b'}, F_e, F_{e'}).

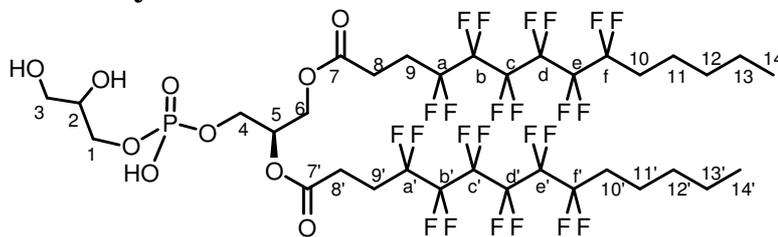
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 81 MHz) δ (ppm) :

0,32 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3377, 2953, 2921, 2852, 1748, 1469, 1384, 1183, 1137, 1090, 1053, 969, 797, 721, 702, 630, 563, 542.

15 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-Dodécafluoro tétradécanoate de 2-[(2,3-dihydroxy-propoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-dodécafluoro-tétradécanoyloxyméthyl)-éthyle



$C_{34}H_{43}F_{24}O_{10}P$
 MM : 1098,63g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans 5 mL d'un mélange de THF et d'isopropanol 50/50 on introduit le composé **62** (50 mg, 36,5 μ mol) ainsi que 5 mg de catalyseur Pd/C 10 %. Le montage est purgé et placé sous atmosphère d'hydrogène. La réaction est laissée à température ambiante 2 heures. On filtre ensuite le catalyseur sur célite et on purifie le produit sur silice (éluant $CHCl_3 \rightarrow CHCl_3/MeOH$ 6/4 $\rightarrow CHCl_3/MeOH/H_2O$ 10/6/1). On obtient ainsi 34 mg (30,9 μ mol) d'une cire blanche avec un rendement de 84 %. Pour finir on neutralise la solution en ajoutant 0,9 équivalents de formate de sodium dans 1 mL d'EtOH et on évapore le solvant organique pour stocker le produit à -20C°.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ ($CHCl_3/MeOH/H_2O$ 10/6/1).

RMN ¹H ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
 5,05-4,80 (m, 1H, H₅); 4,20-4,11 (m, 1H, H₄); 3,98-3,85 (m, 1H, H_{4'}); 3,75-3,25 (m, 7H, H₁₋₃, H₆); 2,37-2,00 (m, 8H, H₈₋₉, H_{8'-9'}); 1,80-1,65 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,33-1,20 (m, 4H, H₁₁, H_{11'}); 1,10-1,00 (m, 8H, H₁₂, H₁₃, H_{12'}, H_{13'}); 0,58 (t, 6H, ³J_{13'-14'} = ³J₁₃₋₁₄ = 6,9 Hz, H₁₄, H_{14'}).

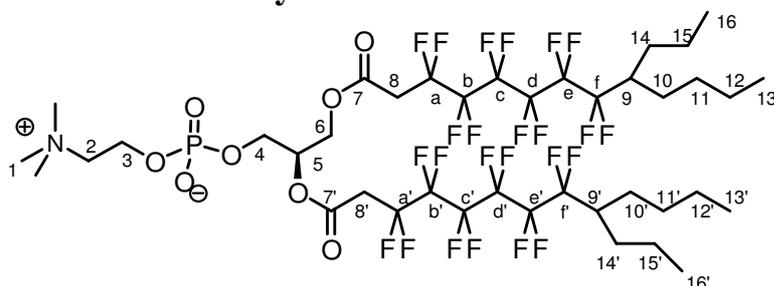
RMN ¹³C ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :
 170,69 et 170,44 (C₇ et C_{7'}); 125-100 (m, CF₂); 70,76 (C₂); 70,43 (C₅); 65,85 (C₁); 62,86 (C₄); 62,61 (C₃); 61,71 (C₆); 30,55 (C₁₂, C_{12'}); 30,18 (t, ²J_{C-F} = 22,35 Hz, C₁₀, C_{10'}); 25,69 (t, ²J_{C-F} = 21,8 Hz, C₉, C_{9'}); 24,80-24,50 (m, C₈, C_{8'}); 21,59 (C₁₃, C_{13'}); 19,14 (C₁₁); 12,76 (C₁₄, C_{14'}).

RMN ¹⁹F ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
 -112,6 à -112,8 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -113,0 à -113,2 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -120,0 à -120,2 (m, 8F, F_{c-d}, F_{c'-d'}); -121,9 à -122,0 (m, 4F, F_b, F_{b'}, F_e, F_{e'}).

RMN ³¹P ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
 -0,47 (s).

IR v (cm⁻¹):
 3351, 2928, 2852, 1743, 1658, 1599, 1351, 1191, 1139, 1111, 983, 835, 690, 647, 565, 534.

16 (2-[[2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyl-tridécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₄₀H₅₆F₂₄NO₈P
MM : 1165,81g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **16** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **3** à partir de l'acide **38a** (303 mg, 641 μmol, 3,5 éq) et de la glycérophosphocholine commerciale (47 mg, 182 μmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 40 mg (34 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 18 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,15-5,00 (m, 1H, H₅); 4,26-3,90 (m, 4H, H₄, H₃); 3,85-3,70 (m, 2H, H₆); 3,35-3,25 (m, 2H, H₂); 3,03-2,81 (m, 11H, H₈, H_{8'}, H₁); 1,90-1,65 (m, 2H, H₉, H_{9'}); 1,45-0,95 (m, 20H, H₁₄₋₁₅, H_{14'-15'}, H₁₀₋₁₂, H_{10'-12'}); 0,65-0,50 (m, 12H, H₁₃, H_{13'}, H₁₆, H_{16'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,52 et 163,29 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 71,08 (C₅); 65,81 (C₂); 62,85-62,40 (C₄, C₆); 58,57 (C₃); 53,25 (C₁); 40,40 (t, ²J_{C-F} = 19,7 Hz, C₈, C_{8'}); 35,89 (t, ²J_{C-F} = 26,3 Hz C₉, C_{9'}); 28,41 (C₁₁, C_{11'}, C₁₄, C_{14'}); 25,88 (C₁₀, C_{10'}); 22,13 (C₁₂, C_{12'}); 19,44 (C₁₅, C_{15'}); 13,17 et 12,88 (C₁₃, C_{13'}, C₁₆, C_{16'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,9 à -110,1 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -111,8 à -111,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -118,5 à -118,7 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -119,7 à -119,9 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,1 à -121,3 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

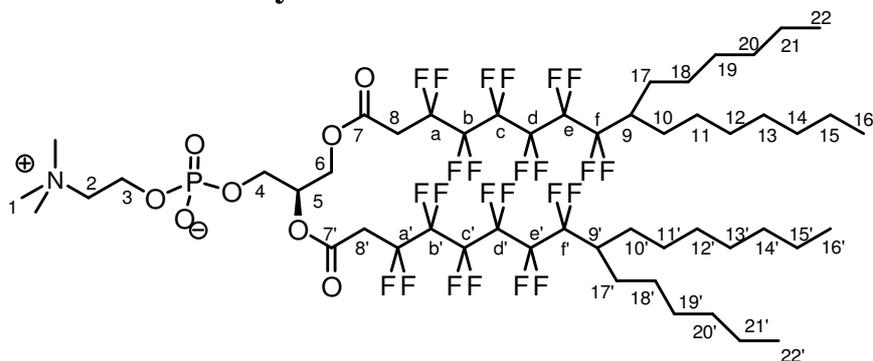
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

0,34 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3380, 2961, 2876, 1753, 1492, 1468, 1381, 1191, 1139, 1091, 970, 699, 630, 558, 464.

17 (2-[[2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-hexyl-hexadécanoyloxy)-propoxy]-hydroxy-phosphoryloxy}-éthyl)-triméthyl-ammonium



$C_{52}H_{80}F_{24}NO_8P$
MM : 1334,13g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **17** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **3** à partir de l'acide **38b** (280 mg, 503 μ mol, 3 éq), et de la glycérophosphocholine commerciale (43 mg, 167 μ mol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 23 mg (17 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 10 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,05-4,95 (m, 1H, H₅); 4, 26-3,85 (m, 4H, H₄, H₃); 3,80-3,765 (m, 2H, H₆); 3,28-3,20 (m, 2H, H₂); 3,03-2,81 (m, 11H, H₈, H_{8'}, H₁); 1,90-1,65 (m, 2H, H₉, H_{9'}); 1,40-0,95 (m, 44H, H₁₀₋₁₅, H_{10'-15'}, H₁₇₋₂₁, H_{17'-21'}); 0,60-0,45 (m, 12H, H₁₆, H_{16'}, H₂₂, H_{22'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,55 et 163,37 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 71,25 (C₅); 65,85 (C₂); 62,85-62,40 (C₄, C₆); 58,58 (C₃); 53,36 (C₁); 40,63 (t, ²J_{C-F} = 19,9 Hz, C₈, C_{8'}); 36,30-35,7 (m, C₉, C_{9'}); 31,18 et 31,00 (2s, C₁₄, C_{14'}, C₂₀, C_{20'}); 29,10-28,40 (C₁₁₋₁₃, C_{11'-13'}, C₁₈₋₁₉, C_{18'-19'}); 26,23 (C₁₀, C_{10'}, C₁₇, C_{17'}); 21,97 (C₁₅, C_{15'}, C₂₁, C_{21'}); 13,13 (C₁₆, C_{16'}, C₂₂, C_{22'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,7 à -110,0 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -111,7 à -111,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -118,5 à -118,7 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -119,7 à -119,9 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -120,9 à -121,3 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

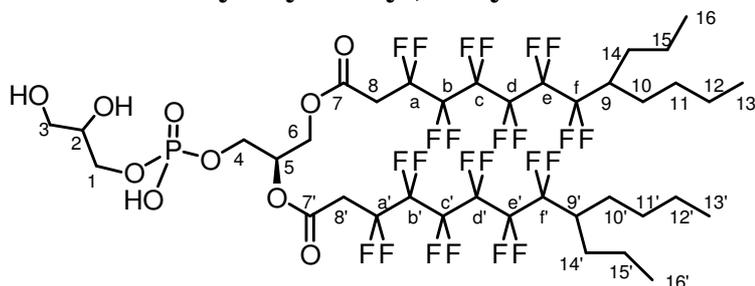
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 81 MHz) δ (ppm) :

0,32 (s).

IR ν (cm⁻¹):

33401, 2956, 2926, 2857, 1751, 1467, 1379, 1194, 1139, 1092, 969, 723, 628, 528, 469, 436, 420.

18 **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-propyl-tridécanoate de 2-[(2,3-dihydroxy-propoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyl-tridécanoyloxyméthyl)-éthyle**



$C_{38}H_{51}F_{24}O_{10}P$
 MM : 1154,74 g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **18** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **7** à partir du précurseur **63a** (95 mg, 66,6 μmol). On obtient ainsi 71 mg (61,5 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 92 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 200 MHz) δ (ppm) :
 5,25-5,00 (m, 1H, H₅); 4, 25-3,96 (m, 2H, H₄); 3,85-3,90 (m, 4H, H₁, H₆); 3,33-3,28 (m, 2H, H₃); 3,03-2,85 (m, 4H, H₈, H₈); 2,00-1,65 (m, 2H, H₉, H₉); 1,45-0,80 (m, 20H, H₁₀₋₁₂, H₁₄, H₁₅, H_{10'-12'}, H_{14'}, H_{15'}); 0,65-0,55 (m, 12H, H₁₃, H₁₆, H_{13'}, H_{16'}).

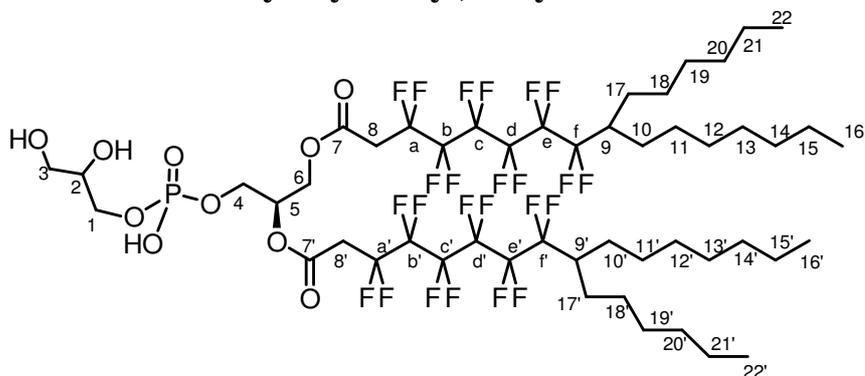
RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :
 163,55 et 163,32 (2s, C₇, C₇); 125-100 (CF₂); 71,28 (C₂); 70,34 (C₅); 65,89 (C₁); 62,95 (C₄); 62,60 (C₃); 61,68 (C₆); 40,40 (t, ²J_{C-F} = 20,0 Hz, C₉, C₉); 36,42-35,40 (m, C₈, C₈); 29,01-28,44 (C₁₁, C₁₄, C_{11'}, C_{14'}); 25,88 (C₁₀, C_{10'}); 22,13 (C₁₂, C_{12'}); 19,43 (C₁₅, C_{15'}); 13,16 et 12,87 (2s, C₁₃, C_{13'}, C₁₆, C_{16'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
 -109,8 à -110,0 (m, 4F, F_a, F_a); -111,8 à -112,0 (m, 4F, F_f, F_f); -118,5 à -118,7 (m, 4F, F_e, F_e); -119,7 à -119,9 (m, 8F, F_c, F_c, F_d, F_d); -121,2 à -121,4 (m, 4F, F_b, F_b).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :
 0,15 (s).

IR ν (cm⁻¹):
 3342, 1750, 1598, 1469, 1356, 1193, 1140, 983, 698, 632, 520, 410.

19 **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-propyl-tridécanoate de 2-[(2,3-dihydroxy-propoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyl-tridécanyloxyméthyl)-éthyle**



$C_{50}H_{75}F_{24}O_{10}P$
MM : 1323,06 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **19** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **7**, à partir du précurseur **63b** (75 mg, 47 μ mol). On obtient ainsi 52 mg (39 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 83 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,25-5,00 (m, 1H, H₅); 4, 30-3,96 (m, 2H, H₄); 3,85-3,40 (m, 5H, H₆, H₁, H₂); 3,33-3,22 (m, 2H, H₃); 3,03-2,81 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 2,00-1,65 (m, 2H, H₉, H_{9'}); 1,45-0,80 (m, 20H, H₁₀₋₁₅, H₁₇₋₂₁, H_{10'-15'}, H_{17'-21'}); 0,65-0,50 (m, 12H, H₁₆, H₂₂, H_{16'}, H_{22'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,54 et 163,33 (2s, C₇, C_{7'}); 125-100 (CF₂); 71,23 (C₂); 70,44 (C₅); 65,89 (C₁); 62,92 (C₄); 62,51 (C₃); 61,72 (C₆); 40,58 (t, ²J_{C-F} = 20,0 Hz, C₉, C_{9'}); 36,08-35,60 (m, C₈, C_{8'}); 31,14 et 30,96 (2s, C₂₀, C_{20'}, C₁₄, C_{14'}); 29,04; 28,76; 28,40 (C₁₁, C_{11'}, C₁₂, C_{12'}, C₁₃, C_{13'}, C₁₈, C_{18'}, C₁₉, C_{19'}); 26,17 (C₁₀, C_{10'}, C₁₇, C_{17'}); 21,90 (C₁₅, C_{15'}, C₂₁, C_{21'}); 13,03 (2s, C₂₂, C_{22'}, C₁₆, C_{16'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,8 à -110,0 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -111,7 à -111,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -118,5 à -118,7 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -119,5 à -120,0 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,2 à -121,4 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

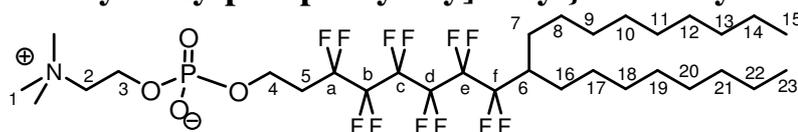
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

-1,47 (s).

IR ν (cm⁻¹):

3307, 2926, 2857, 2356, 2324, 2050, 1748, 1715, 1698, 1681, 1660, 1651, 1633, 1556, 1538, 1455, 1380, 1192, 1139, 835, 696, 629, 518.

20 **{2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-octyl-octadécyloxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-éthyl}-triméthyl-ammonium**



C₃₁H₅₄F₁₂NO₄P
MM : 763,72g..mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans un tube scellé, 160 mg (188 µmol) du produit **60** sont dissous dans 3 mL d'acétonitrile anhydre, puis à froid sont ajoutés 500 µL de triéthylamine (préalablement distillée). La réaction est placée sous agitation trois jours à température ambiante. Le solvant et l'excès de triéthylamine sont évaporés. Le résidu est adsorbé sur silice et le produit purifié par chromatographie (éluant : CHCl₃/MeOH/H₂O 100/0/0→60/40/0→10/6/1). On obtient ainsi 65 mg (85 µmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 45 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

4,06-3,85 (m, 4H, H₃,H₄); 3,31-3,28 (m, 2H, H₂); 2,90 (s, 9H, H₁); 2,31-2,19 (m, 2H, H₅); 1,90-1,78 (m, 1H, H₆); 1,36-0,89 (m, 30H, H₇₋₁₄, H₁₆₋₂₂); 0,61-0,58 (m, 6H, H₁₅, H₂₃).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

65,77 (C₅); 58,40 (C₂); 57,16 (C₃); 53,30 (C₁); 40,57 (t, ³J_{C-F} = 20.0 Hz, C₆); 31,25 et 31,22 (C₁₃ et C₂₁); 29,06-28,56 (m, C₇₋₁₂, C₁₆₋₂₀); 26,19 (C₇, C₁₆); 21,99 (C₁₄, C₂₂); 13,12 (C₁₅, C₂₃).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-107,5 à -107,7 (m, 4F, F_a, F_f); -114,2 à -114,4 (m, 2F, F_e); -115,5 à -115,9 (m, 4F, F_c, F_d); -117,6 à -117,9 (m, 2F, F_e).

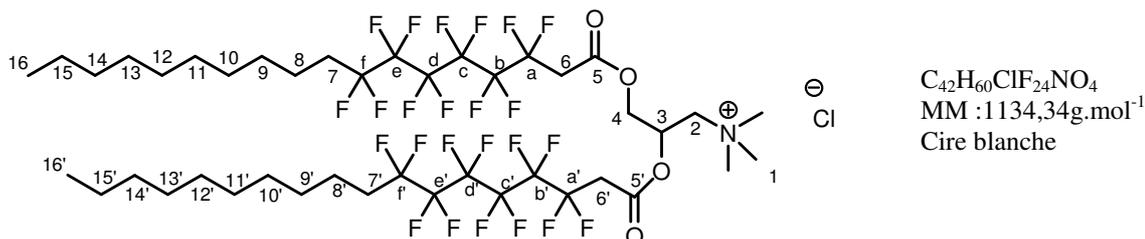
RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 121 MHz) δ (ppm) :

-0,23 (s).

IR ν (cm⁻¹):

2927, 2858, 2353, 2324, 2050, 1980, 1715, 1651, 1633, 1557, 1519, 1505, 1471, 1416, 1372, 1188, 1141, 1078, 1021, 732, 472.

21 Chlorure de [2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécanoyloxy)propyl]-triméthyl-ammonium



MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 182 mg (364 μ mol, 2,2 eq) d'acide **31a** que l'on dissout dans 2 mL de CH_2Cl_2 plus 160 μ L de chlorure d'oxalyle (1,82 mmol, 10,4 eq) et 1 μ L de DMF anhydre. La réaction est laissée 4 heures à température ambiante, puis on évapore la solution. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est repris et évaporé 3 fois dans du toluène anhydre afin d'éliminer toute trace de chlorure d'oxalyle.

Le diol **66** (28 mg, 165 μ mol, 1 eq) est broyé à l'aide d'un mortier puis repris et évaporé 3 fois dans un mélange 5/5 CH_3CN anhydre /toluène anhydre, puis la poudre obtenue est mise en suspension dans 2 mL de THF et 1 mL de CH_2Cl_2 . On additionne 27 μ L (330 μ mol, 2 eq) de pyridine et le chlorure d'acide dans 2 mL de CH_2Cl_2 à cette solution. La solution est mise au bain à ultrasons pendant 2 h puis sous agitation à température ambiante une nuit.

On évapore ensuite le solvant à température ambiante pour éviter la dégradation du produit (risque d'élimination de HF en α de l'ester). Le brut réactionnel est adsorbé sur silice et on purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : $CHCl_3/MeOH$: 100/0 \rightarrow 6/4). On obtient ainsi 54 mg (47 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 28%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ ($CH_3Cl/MeOH/H_2O$ 10/6/1)

RMN ¹H ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,74-5,61(m, 1H, H_3); 4,81-4,68 (m, 1H, H_4); 4,32-4,16 (m, 2H, H_4 , H_2); 3,8-3,68 (m, 1H, H_2); 3,29-3,12 (m, 13H, H_1 , H_6 , H_6); 2,09-1,87 (m, 4H, H_7 , H_7); 1,61-1,47 (m, 4H, H_8 , H_8); 1,40-1,10 (m, 28H, H_{9-15} , $H_{9'-15'}$); 0,71 (t, 6H, $^3J_{15-16} = ^3J_{15'-16'} = 6,5\text{Hz}$ H_{16} , H_{16}).

RMN ¹³C ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,8 163,4 (2s, C_5 , C_5); 67,19 (C_2); 65,17 (C_4); 63,63 (C_3); 53,77 (C_1); 36,4-36,3 (m, C_6 , C_6); 31,51 (C_{14} , C_{14}); 30,8-30,2 (m, C_7 , C_7); 29,1-28,7 (C_{9-13} , $C_{9'-13'}$); 22,27(C_{15} , C_{15}); 19,76 (C_8 , C_8); 13,56 (C_{16} , C_{16}).

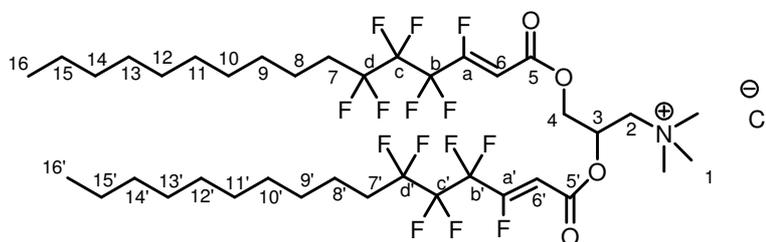
RMN ¹⁹F ($CDCl_3/CD_3OD$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

109,6 à -109,8 et -110,1 à -109,9 (2m, 8F, F_a , F_a); -112,9 à -112,8 (m, 4F, F_f , F_f); -120,2 à -112,0 (m, 8F, F_c , F_c , F_d , F_d); -121,4 à -121,2 (m, F, F_b , F_b); -122,0 à -121,8 (m, 4F, F_e , F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

3388, 2922, 2853, 1754, 1469, 1381, 1189, 1138, 707, 632.

22 Chlorure de [2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6-heptafluoro-hexadéc-2-énoxy)propyl]-triméthyl-ammonium



C₃₈H₅₈ClF₁₄NO₄
MM : 894,3 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **22** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **23**, à partir du produit saturé **68** (8,7 mg, 7,6 μ mol). On obtient ainsi 6 mg (6,7 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 88%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,99 (d, 1H, ³J_{H-F} = 29,56 Hz, H₆ ou H_{6'}); 5,94 (d, 1H, ³J_{H-F} = 29,56 Hz, H₆ ou H_{6'}); 5,73-5,65 (m, 1H, H₃); 4,73-4,65 (m, 1H, H₄); 4,30-4,08 (m, 2H, H_{4'}, H₂); 3,80-3,69 (m, 1H, H_{2'}); 3,21 (s, 9H, H₁); 2,06-1,86 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 1,56-1,42 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,36-1,08 (m, 28H, H₉₋₁₅, H_{9'-15'}); 0,84-0,75 (m, 6H, H₁₆, H_{16'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,8 163,4 (2s, C₅, C_{5'}); 105,32-104,51 (m, 2C, C₆, C_{6'}); 69,13 (C₂); 66,55 (C₄); 63,74 (C₃); 54,58 (C₁); 31,73 (C₁₄); 30,62 (t, ²J_{C-F} = 22,61Hz, 2C, C₇ et C_{7'}); 29,38-28,98 (m, 10C, C₉₋₁₃, C_{9'-13'}); 22,52 (C₁₅, C_{15'}); 19,92 (C₈, C_{8'}); 13,93 (C₁₆, C_{16'}).

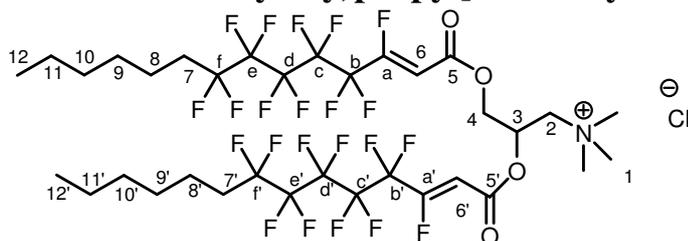
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-103,9 à -104,1 (m, 2F, F_a, F_{a'}); -112,0 à -112,2 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -116,6 à -116,8 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -122,7 à -122,9 (m, 4F, F_c, F_{c'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3390, 2925, 2856, 1734, 1698, 1471, 1373, 1276, 1193, 1163, 1104, 1089, 1052, 423, 412.

23 Chlorure de [2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-undécafluoro-tétradéc-2-énoyloxy)propyl]-triméthyl-ammonium



$C_{34}H_{42}ClF_{22}NO_4$
MM : 982,12g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans un 1 mL de CH₃CN et 0,5 mL de CH₂Cl₂, on introduit 12,5 mg du composé saturé **69** (12,2 μmol, 1 éq) plus 18 μL de triméthylamine (2 M dans le THF) (30,5 μmol, 2,5 éq). La réaction est agitée à température ambiante pendant 2 h, puis on passe la solution sur une cartouche de NaHCO₃ (préalablement broyé dans un mortier) pour éliminer les sels de triméthylamine. On rince cette cartouche au dichlorométhane distillé. On récupère ainsi 5,3 mg d'une cire blanche, soit un rendement de 44%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O : 10/6/1)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

6,04 (d, 1H, ³J_{H-F} = 29,6 Hz, H₆ ou H_{6'}); 5,99 (d, 1H, ³J_{H-F} = 29,6 Hz, H₆ ou H_{6'}); 5,71-5,60 (s, 1H, H₃); 4,75-4,63 (m, 1H, H₂); 4,27-4,03 (m, 2H, H₂, H₄); 3,18 (s, 9H, H₁); 2,10-1,75 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 1,55-1,42 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,30-1,11 (m, 12H, H₉₋₁₁, H_{9'-11'}); 0,83-0,75 (m, 6H, H₁₂, H_{12'}).

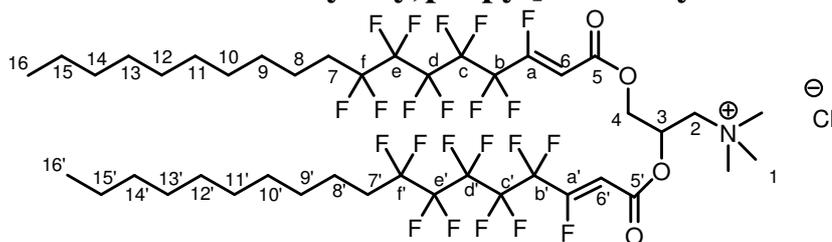
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-105,2 à -105,4 (m, 2F, F_a, F_{a'}); -112,8 à 113,0 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -117,1 à -117,3 (m, 4F, F_c, F_{c'}); -120,1 à -120,3 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,5 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -122,0 à 122,2 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3367, 2959, 2929, 2861, 1737, 1699, 1470, 1375, 1276, 1189, 1135, 1089, 1052, 970, 917, 858, 726, 706, 644, 542, 419.

24 Chlorure de [2,3-Bis-((Z)-3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-undécafluoro-octadéc-2-énoyloxy)propyl]-triméthyl-ammonium



$C_{42}H_{58}ClF_{22}NO_4$
MM : 1094,33g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **24** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **23**, à partir du composé **21** (12 mg, 10,5 μmol). On obtient ainsi 9,9 mg (9 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 86%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} : 10/6/1$)

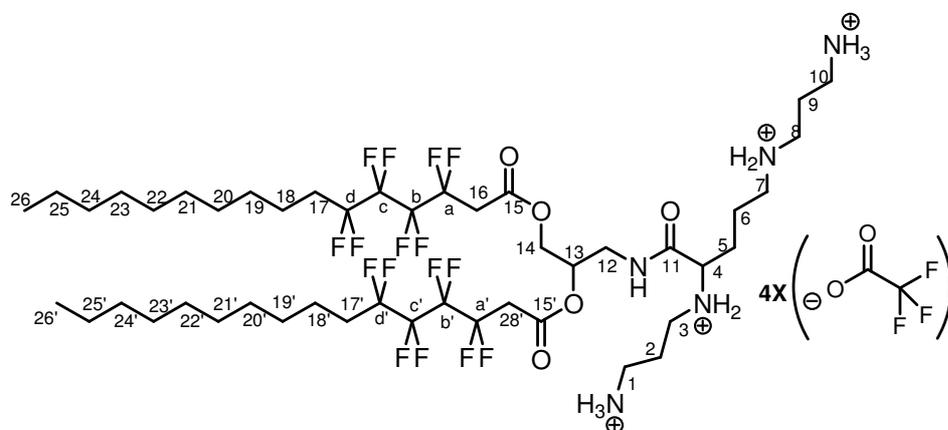
RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :
6,08 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 29,27$ Hz, H_5 ou H_5'); 6,02 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 29,27$ Hz, H_5 ou H_5'); 5,79-5,70 (m, 1H, H_3); 4,80-4,74 (m, 1H, H_2); 4,36-4,29 (m, 2H, H_2 , H_4); 3,91-3,78 (m, 1H, H_4'); 2,82 (s, 9H, H_1); 2,11-1,95 (m, 4H, H_7 , H_7'); 1,58-1,52 (m, 4H, H_8 , H_8'); 1,32-1,15 (m, 28H, H_{9-15} , $\text{H}_{9'-15'}$); 0,84 (m, 6H, H_{16} , $\text{H}_{16'}$).

RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :
160,31 et 159,92 (2s, C_5 , C_5'); 105,32-104,51 (m, 2C, C_6 , C_6'); 67,25 (C_2); 65,4 (C_4); 63,75 (C_3); 54,31 (C_1); 31,73 (C_{14}); 30,75 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 21,58$ Hz, 2C, C_7 et C_7'); 29,56-28,6(m, 10C, C_{9-13} , $\text{C}_{9'-13'}$); 22,52 (C_{15} , $\text{C}_{15'}$); 19,96 (C_8 , C_8'); 13,90 (C_{16} , $\text{C}_{16'}$).

RMN ^{19}F ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :
-106,2 à -106,4 (m, 2F, F_a); -112,7 à -112,8 (m, 4F, F_f , F_f'); -117,1 à -117,3 (m, 4F, F_c , F_c'); -120,0 à -120,2 (m, 4F, F_d , F_d'); -121,3 à -121,5 (m, 4F, F_b , F_b'); -121,8 à -122,0 (m, 4F, F_e , F_e').

IR ν (cm^{-1}) :
3392, 2953, 2924, 2855, 1739, 1699, 1469, 1378, 1269, 1192, 1135, 1100, 971, 859, 708, 647, 543.

25 3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluoro-hexadécanoate de 2-[2,5-bis-(3-amino-propylamino)-pentanoylamino]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hexadécanyloxyméthyl)-éthyle (sel de trifluoroacetate)



MODE OPÉRATOIRE

À 11,4 mg (7,6 μmol , 1 éq) de composé **71a**, on additionne 1 mL de TFA. Le milieu réactionnel est placé sous agitation pendant 3h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et l'on récupère 11,5 mg (7,5 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement quantitatif.

ANALYSES

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,53-5,25 (m, 2H, H_{13} , NH); 4,53-4,05 (m, 2H, H_{14}); 4,10-3,15 (m, 22H, H_{1-10} , H_{12}); 3,10-2,95 (m, 4H, H_{16} , $\text{H}_{16'}$); 2,20-1,10 (m, 44H, H_2 , H_5 , H_6 , H_9 , H_{17-25} , $\text{H}_{17'-25'}$); 0,95-0,80 (m, 6H, H_{26} , $\text{H}_{26'}$).

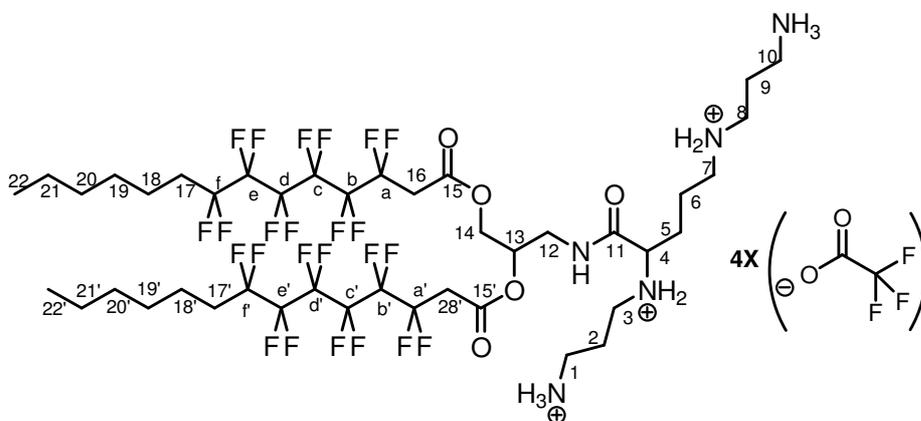
RMN ^{19}F ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-74,7 (s, TFA); -110,4 à -110,9 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -112,8 à -113,4 (m, 4F, F_e , $\text{F}_{e'}$); -122,1 à -122,3 (m, 8F, F_b , $\text{F}_{b'}$, F_c , $\text{F}_{c'}$).

IR ν (cm^{-1}) :

3415, 3039, 2958, 2923, 2854, 1753, 1672, 1467, 1433, 1383, 1169, 1129, 838, 799, 723, 644, 598, 519.

26 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-tétradécanoate de 2-[2,5-bis-(3-amino-propylamino)-pentanoylamino]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-tétradécanyloxyméthyl)-ethyle (sel de trifluoroacetate)



MODE OPÉRATOIRE

À 21,4 mg (13,6 μmol , 1 éq) de composé **71b**, on additionne 1 mL de TFA. Le milieu réactionnel est placé sous agitation pendant 3h à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et l'on récupère 21,9 mg (13,5 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement quantitatif.

ANALYSES

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 200 MHz) δ (ppm) :

5,53-5,25 (m, 2H, H_{13} , NH); 4,53-3,15 (m, 24H, H_{1-10} , H_{12} , H_{14}); 3,10-2,95 (m, 4H, H_{16} , $\text{H}_{16'}$); 2,20-1,10 (m, 28H, H_2 , H_5 , H_6 , H_9 , H_{17-21} , $\text{H}_{17'-21'}$); 0,95-0,80 (m, 6H, H_{22} , $\text{H}_{22'}$).

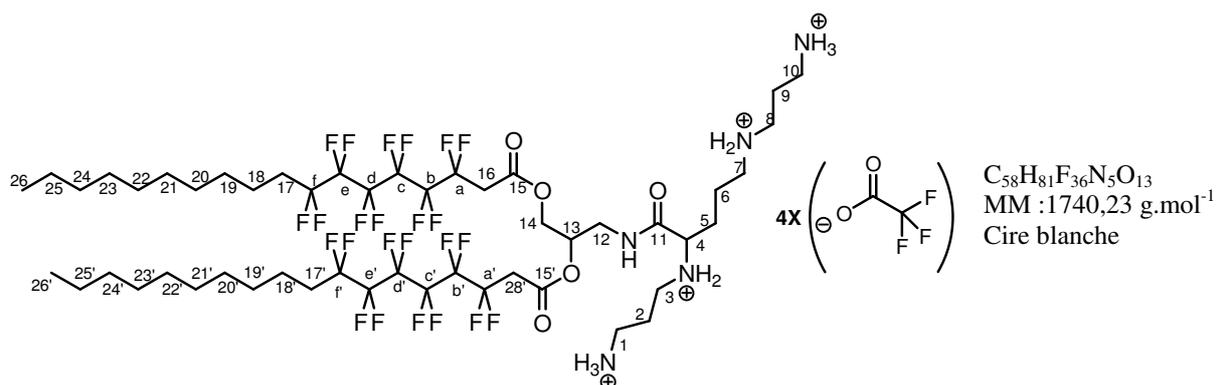
RMN ^{19}F ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-74,7 (s, TFA); -110,5 à -110,7 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -113,2 à -113,4 (m, 4F, F_f , F_f'); -120,5 à -120,8 (m, 8F, F_c , F_c' , F_d , F_d'); -121,8 à -122,0 (m, 4F, F_b , F_b'); -122,3 à -122,5 (m, 4F, F_e , F_e').

IR ν (cm^{-1}) :

3400, 2959, 2929, 2872, 2860, 1750, 1669, 1470, 1433, 1382, 1186, 1135, 1049, 839, 799, 722, 703, 628, 559, 541, 518, 420.

27 **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécanoate de 2-[2,5-bis-(3-amino-propylamino)-pentanoylamino]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorooctadécanyloxyméthyl)-éthyle (sel de trifluoroacetate)**



MODE OPÉRATOIRE

À 23 mg (13,6 μmol , 1 équ) de composé **71c**, on additionne 1 mL de TFA. Le milieu réactionnel est placée sous agitation pendant 3h à température ambiante. L'excès de réactif est ensuite évaporé et l'on récupère 23,5 mg (13,5 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement quantitatif.

ANALYSES

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 200 MHz) δ (ppm) :

5,53-5,25 (m, 2H, H_{13} , NH); 4,53-4,05 (m, 2H, H_{14}); 4,10-3,15 (m, 22H, H_{1-10} , H_{12}); 3,10-2,95 (m, 4H, H_{16} , $\text{H}_{16'}$); 2,20-1,10 (m, 44H, H_2 , H_5 , H_6 , H_9 , H_{17-25} , $\text{H}_{17'-25'}$); 0,95-0,80 (m, 6H, H_{26} , $\text{H}_{26'}$).

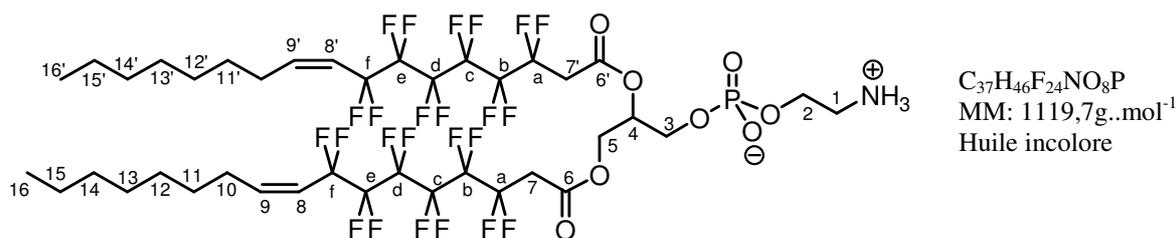
RMN ^{19}F ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-74,6 (s, TFA); -110,5 à -110,7 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -113,1 à -113,3 (m, 4F, F_f , F_f'); -120,5 à -120,8 (m, 8F, F_c , F_c' , F_d , F_d'); -121,8 à -122,0 (m, 4F, F_b , F_b'); -122,3 à -122,5 (m, 4F, F_e , F_e').

IR ν (cm⁻¹) :

3411, 3035, 2921, 2852, 1752, 1667, 1469, 1433, 1384, 1180, 1135, 1052, 839, 798, 722, 704, 630, 561, 541, 518, 416.

28 (Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-heptadéc-9-énoate de 3-[(2-amino-éthoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-2-((Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-heptadéc-9-énoyloxy)-propyl ester



MODE OPÉRATOIRE

À une solution de 6,0 mg de composé **65** (5,24 μ mol, 1 éq) dissout dans un mélange de THF, de CH₂Cl₂, de trifluoroéthanol et de HCl 2 % (1,5 mL/0,5 mL/0,5 mL/50 μ L) sont ajoutés 4,1 mg (15,7 μ mol, 3 éq) de triphénylphosphine. La réaction est placée 48h sous agitation à température ambiante. Le solvant organique est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CHCl₃/MeOH/H₂O 10/0/0→60/40/0→10/6/1). On obtient ainsi 3,0 mg (2,6 μ mol) d'une huile incolore, soit un rendement de 51 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 200 MHz) δ (ppm) :

5,92-5,66 (m, 2H, H₈, H_{8'}); 5,42-4,95 (m, 3H, H₄, H₉, H_{9'}); 4,35-3,93 (m, 6H, H₂, H₃, H₅); 3,82-3,61 (m, 2H, H₁); 3,04-2,75 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 2,05-1,75 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,18-0,90 (m, 16H, H₁₁₋₁₄, H_{11'-14'}); 0,53 (m, 6H, H₁₅, H_{15'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 75 MHz) δ (ppm) :

163,46 (C₆, C_{6'}); 144,98 (C₉, C_{9'}); 125,0-102,0 (CF₂); 115,35 (t, ²J_{C-F} = 23,1 Hz, C₈, C_{8'}); 71,19 (C₄); 62,78 et 62,60 (C₃, C₅); 60,99 (C₂); 39,93 (C₁); 36,20-35,50 (m, C₇, C_{7'}); 31,53 (C₃, C_{3'}); 28,35, 28,15 et 27,92 (C₁₀₋₁₂, C_{10'-12'}); 21,84 (C₁₄, C_{14'}); 13,01 (C₁₅, C_{15'}).

RMN ³¹P (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

1,14 (P).

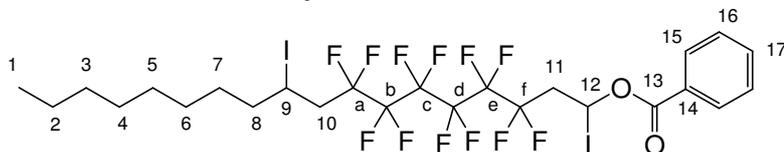
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 1/1, 188 MHz) δ (ppm) :

-104,8 à -104,6 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -110,1 à -109,9 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,9 à -119,7 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,1 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -122,0 à -121,8 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

IR ν (cm⁻¹):

3381, 2959, 2929, 2859, 1750, 1662, 1469, 1379, 1192, 1139, 1091, 969, 798, 761.

29a Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-1,10-diiodooctadécyle



C₂₅H₂₈F₁₂I₂O₂
MM : 842,28 g.mol⁻¹
Cire jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon, on introduit 200 mg (0,36 mmol, 1 éq) de 1,6-diiodoperfluorohexane, 50 μ L (0,36 mmol, 1 éq) de benzoate de vinyle, 70 μ L (0,36 mmol, 1 éq) de décène et 60 mg (0,72 mmol, 2 éq) de NaHCO₃, dans un mélange CH₃CN/H₂O 8/7 (735 μ L). On ajoute ensuite doucement 125 mg (0,72 mmol, 2 éq) de Na₂S₂O₄ à 0°C. On agite le milieu réactionnel à 0°C pendant 50 min, puis on ajoute quelques gouttes d'une solution d'HCl 3 M afin d'ajuster le pH entre 5 et 7. Le milieu réactionnel est laissé à température ambiante pendant 20 min. On ajoute 5 mL d'eau distillée puis on effectue une extraction au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane/CH₂Cl₂ 95/5). On obtient ainsi 100 mg (118 μ mol) d'une cire jaune, soit un rendement de 32 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,45 (hexane/CH₂Cl₂ 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

8,06 (d, 2H, ³J₁₅₋₁₆ = 7,5 Hz, H₁₅); 7,63 (t, 1H, ³J₁₆₋₁₇ = 7,5 Hz, H₁₇); 7,51 (t, 2H, ³J₁₆₋₁₇ = 7,5 Hz, H₁₆); 7,33 (dd, 1H, ³J₁₂₋₁₁ = 10,5 Hz, ³J_{12-11'} = 2,5 Hz, H₁₂); 4,4-4,3 (m, 1H, H₉); 3,52 (m, 1H, H₁₁); 2,91 (m, 1H, H_{11'}); 2,85 (m, 2H, H₁₀); 1,82 (m, 2H, H₈); 1,5-1,2 (m, 12H, H₂₋₇); 0,90 (t, 3H, ³J₁₋₂ = 6,0 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

165,0 (C₁₃); 133,2 (C₁₇); 129,9 (C₁₅); 129,7 (C₁₆); 128,6 (C₁₄); 43,9 (t, ²J_{C-F} = 21,0 Hz, C₁₀); 41,7 (t, ²J_{C-F} = 29,6 Hz, C₁₁); 41,2 (C₁₂); 40,3 (C₉); 32,1 (C₃); 29,5-29,0 (C₄₋₇); 22,6 (C₂); 21,4 (C₈); 14,3 (C₁).

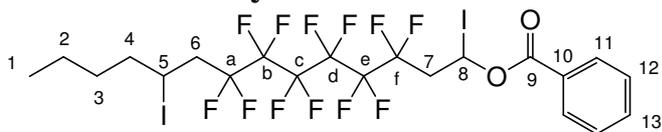
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-121,7 à -121,5 (m, 2F, F_c, F_d); -119,7 à -119,5 (m, 2F, F_b, F_e); -109,4 à -109,2 et -109,6 à -109,4 (2AB, ²J_{aa} = 273,5 Hz, ²J_{ff} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f); -112,7 à -112,5 (2AB, ²J_{aa} = 273,5 Hz, ²J_{ff} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f).

IR ν (cm⁻¹) :

2926, 2855, 2361, 1744, 1602, 1453, 1374, 1340, 1255, 1242, 1190, 1139, 1079, 1056, 1023, 984, 832, 799, 707, 666, 628, 600, 527, 444.

29b Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-1,10-diiodotétradécyle



C₂₁H₂₀F₁₂I₂O₂
 PM : 786,17 g.mol⁻¹
 Cire jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **29b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **29a** à partir de 1,6-diiodoperfluorohexane (5 g, 9,02 mmol, 1 éq), de benzoate de vinyle (1,250 mL, 9,02 mmol, 1 éq) et de 1-hexène (1,27 mL, 9,02 mmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 2 g (2,5 mmol) de composé **29b** soit un rendement de 27 %.

ANALYSES

CCM R_f = 0,6 (hexane/CH₂Cl₂ 80/20).

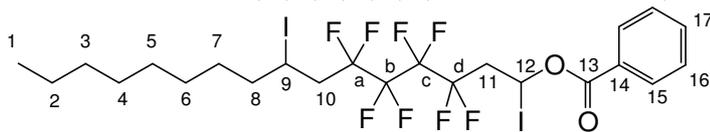
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :
 8,06 (d, 2H, ³J₁₁₋₁₂ = 7,5 Hz, H₁₁); 7,65 (t, 1H, ³J₁₂₋₁₃ = 7,5 Hz, H₁₃); 7,48 (t, 2H, ³J₁₁₋₁₂ = ³J₁₂₋₁₃ = 7,5 Hz, H₁₂); 7,36 (dd, 1H, ³J₈₋₇ = 10,5 Hz, ³J_{8-7'} = 2,4 Hz, H₈); 4,38-4,31 (m, 1H, H₅); 3,60-3,45 (m, 1H, H₇); 3,26-3,10 (m, 1H, H_{7'}); 2,96-2,71 (m, 2H, H₆); 1,84-1,75 (m, 2H, H₄); 1,43-1,27 (m, 4H, H₂-H₃); 0,90 (t, ³J₁₋₂ = 6,0 Hz, 3H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :
 163,42 (C₉); 134,1 (C₁₃); 130 (C₁₁); 128,6 (C₁₂); 128,3 (C₁₀); 125-106 (C_a-C_f); 43,85 (t, ²J_{8-F} = 21 Hz, C₆); 41,7 (t, ²J_{7-F} = 20,7 Hz, C₇); 40,90 (C₈); 39,98 (C₅); 31,6 (C₃); 21,6 (C₂); 20,9 (C₄); 13,78 (C₁).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
 -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_c, F_d); -119,6 à -119,4 (m, 2F, F_b, F_e); -112,7 à -112,5 (2AB, ²J_{aa'} = 273,5 Hz, ²J_{ff'} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f); -109,4 à -109,2 et -109,6 à -109,4 (2AB, ²J_{aa'} = 273,5 Hz, ²J_{ff'} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f).

IR (cm⁻¹) :
 2927, 2856, 1745, 1453, 1378, 1349, 1255, 1192, 1139, 1118, 1079, 1057, 1023, 984, 832, 798, 708, 664, 599, 527, 445.

29c Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-1,8-diiodohexadécyle



C₂₃H₂₈F₈I₂O₂
 MM : 742,26 g.mol⁻¹
 Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **29c** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **29a** à partir de 1,4-diiodoperfluorobutane (5,0 g, 11,01 mmol, 1 éq) de

benzoate de vinyle (1,525 mL, 11,01 mmol, 1 éq) et de 1-décène (2,08 mL, 9,02 mmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 2,4 g (3,23 mmol) du composé **29c**, soit un rendement de 29 %.

ANALYSES

CCM $R_f = 0.6$ (hexane/ CH_2Cl_2 60/20).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

8,06 (d, 2H, $^3J_{15-16} = 7,5$ Hz, H_{15}); 7,63 (t, 1H, $^3J_{16-17} = 7,5$ Hz, H_{17}); 7,48 (t, 2H, $^3J_{16-17} = 7,5$ Hz, H_{16}); 7,34 (d, 1H, $^3J_{12-11} = 10,5$ Hz, H_{12}); 4,38-4,31 (m, 1H, H_9); 3,53-2,71 (m, 4H, H_{11} , H_{10}); 1,79 (m, 2H, H_8); 1,45-1,20 (m, 12H, H_{2-7}); 0,90 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) :

163,36 (C_{13}); 134,00 (C_{17}); 129,99 (C_{15}); 128,64 (C_{16}); 128,36 (C_{14}); 43,93 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 21$ Hz, C_{10}); 41,70 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 29,57$ Hz C_{11}); 41,19 (C_{12}); 40,29 (C_9); 31,75 (C_3); 29,5-29,0 (C_{4-7}); 22,59 (C_2); 21,35 (C_8); 14,04 (C_1).

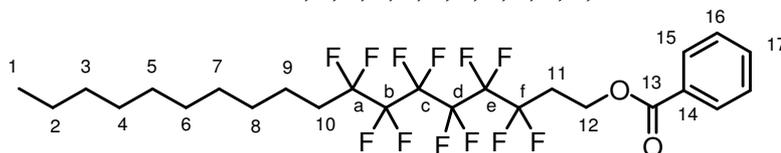
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-121,6 à -121,4 (m, 2F, F_b , F_c); -112,8 (2AB, $^2J_{aa'} = 273,5$ Hz, $^2J_{dd'} = 273,5$ Hz, 2F, F_a , F_d); -109,5 et -109,7 (2AB, $^2J_{aa'} = 273,5$ Hz, $^2J_{dd'} = 273,5$ Hz, 2F, F_a , F_d).

IR ν (cm^{-1}) :

2925, 2854, 2355, 1744, 1651, 1602, 1453, 1373, 1254, 1243, 1168, 1118, 1081, 1058, 1024, 984, 861, 829, 708, 527.

30a Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécyle



$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{F}_{12}\text{O}_2$
MM : 590,49 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans 3 mL d'éther anhydre, on dissout 100 mg (0,12 mmol, 1 éq.) de précurseur iodé **29a** et 2 mg (0,013 mmol, 0,1 éq.) d'AIBN. On additionne un excès (160 μL , 0,588 mmol, 4,5 éq) d'hydruure de tributylétain. Le milieu réactionnel est porté à reflux à l'aide d'une lampe pendant 15 heures sous argon. On concentre ensuite la solution à l'évaporateur rotatif et on purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane/ CH_2Cl_2 90/10). On obtient 65 mg (110 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,35$ (hexane/ CH_2Cl_2 60/40).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

8,06 (d, 2H, $^3J_{15-16} = 7,5$ Hz, H_{15}); 7,64 (t, 1H, $^3J_{16-17} = 7,5$ Hz, H_{17}); 7,46 (t, 1H, $^3J_{15-16} = 7,5$ Hz, H_{16}); 4,64 (t, 2H, $^3J_{11-12} = 6,0$ Hz, H_{12}); 2,60 (tt, $^3J_{\text{H-F}} = 18,3$ Hz,

$^3J_{11-12} = 6,4\text{Hz}$, 2H, H_{11}); 2,25-2,15 (m, 2H, H_{10}); 1,70-1,50 (m, 2H, H_9); 1,28 (m, 14H, H_2 - H_8); 0,89 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0\text{ Hz}$, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) :

164,34 (C_{13}); 133,63 (C_{17}); 130,09 (C_{15}); 128,64 (C_{16} , C_{14}); 57,11 (C_{12}); 32,07 (C_3); 30,93 (t, $^3J_{\text{C-F}} = 20,2\text{ Hz}$, C_{10}); 30,80 (t, $^3J_{\text{C-F}} = 20,2\text{ Hz}$, C_7); 29,31-28,95 (C_4 - C_8); 22,87 (C_2); 20,32 (C_9); 14,27 (C_1).

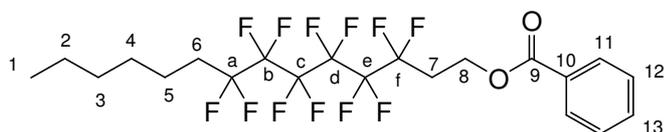
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-110,0 à -109,8 (m, 2F, F_f); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_a); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b , F_e); -121,6 à -121,4 (s, 4F, F_c , F_d).

IR ν (cm^{-1}) :

2958, 2859, 1726, 1603, 1454, 1379, 1316, 1272, 1189, 1139, 1115, 1070, 1027, 1003, 833, 801, 710, 688, 649, 543.

30b Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorotétradécyle



$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{F}_{12}\text{O}_2$
MM : 534.38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **30b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30a** à partir de **29b** (50 mg, 63,6 μmol). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 30 mg (57,2 μmol) d'une cire blanche soit un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ (hexane/ CH_2Cl_2 60/40).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

8,06 (d, 2H, $^3J_{11-12} = 7,5\text{ Hz}$, H_{11}); 7,58 (t, 1H, $^3J_{12-13} = 7,5\text{ Hz}$, H_{13}); 7,46 (t, 2H, $^3J_{11-12} = ^3J_{12-13} = 7,5\text{ Hz}$, H_{12}); 4,64 (t, 2H, $^3J_{7-8} = 6,5\text{ Hz}$, H_8); 2,61 (tt, $^3J_{\text{H-F}} = 18,3\text{ Hz}$, $^3J_{7-8} = 6,5\text{ Hz}$, 2H, H_7); 2,1-1,9 (m, 2H, H_6); 1,7-1,5 (m, 2H, H_5); 1,45-1,3 (m, 6H, H_2 - H_4); 0,89 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0\text{ Hz}$, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) :

163,42 (C_9); 133,21 (C_{13}); 129,65 (C_{11}); 129,59 (C_{10}); 128,41 (C_{12}); 56,92 (C_8); 31,38 (C_4); 30,93 (t, $^3J_{\text{C-F}} = 22,1\text{ Hz}$, C_7); 30,70 (t, $^3J_{\text{C-F}} = 21,6\text{ Hz}$, C_6); 28,76 (C_5); 22,38 (C_3); 20,00 (C_2); 13,42 (C_1).

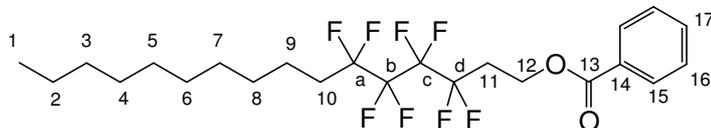
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-110,0 à -109,8 (s, 2F, F_f); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_a); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b , F_e); -121,6 à -121,4 (m, 4F, F_c , F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

2958, 2859, 1726, 1681, 1651, 1556, 1454, 1379, 1316, 1272, 1188, 1138, 1114, 1070, 1027, 1003, 832, 709, 687, 648.

30c Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hxadécyle



C₂₃H₃O₂F₈
MM : 490,47 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **30c** a été obtenu à partir de **29b** (13,85 g, 18,6 mmol), en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30a** à partir de **29c**. Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 8,81 g (17,9 mmol) de composé **30c** avec un rendement de 96 %.

ANALYSES

CCM R_f = 0.5 (hexane/CH₂Cl₂ 60/20).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

8,06 (d, 2H, ³J₁₅₋₁₆ = 7,5 Hz, H₁₅); 7,-63 (t, 1H, ³J_{16 17} = 7,5 Hz, H₁₇) 7,48 (t, 1H, ³J₁₆₋₁₇ = ³J_{15 16} = 7,5 Hz, H₁₆); 4,63 (t, 2H, ³J₁₁₋₁₂ = 6Hz, H₁₂); 2,70-2,50 (m, 2H, H₁₁); 2,20-2,00 (m, 2H, H₁₀); 1,8-1,5 (m, 2H, H₉); 1,40-1,20 (m, 14H, H₂₋₈); 0,90 (t, 3H, ³J₁₋₂ = 6,0 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

166,79 (C₁₃); 133,17 (C₁₇); 129,63-128,30 (C₁₅); 128,42-128,31 (C₁₆, C₁₄); 57,01 (C₁₂); 31,87 (C₃); 30,96 (t, ³J_{H-F} = 21,7 Hz, C₁₀); 30,76 (t, ³J_{H-F} = 22,5 Hz, C₁₁); 29,50-29,12 (m, 4C, C₄₋₈); 22,65 (C₂); 20,13 (C₉); 13,49 (C₁).

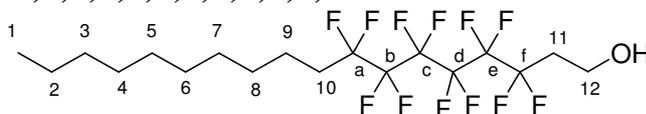
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-121,9 à -121,7 (m, 2F, F_b); -121,5 à -121,3 (m, 2F, F_c); -112,5 à -112,3 (m, 2F, F_a); -111,7 à -111,5 (m, 2F, F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

2924, 2855, 2360, 2341, 1726, 1454, 1378, 1316, 1271, 1219, 1164, 1109, 1070, 1027, 1003, 864, 709, 686, 669, 617, 492.

30'a 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécane-1-ol



C₁₈H₂₆F₁₂O
MM : 486,38 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

À une solution de 5 mL de LiOH 1 M dans le méthanol, on introduit 740 mg (1,25 mmol) du composé **30a**. On laisse le milieu réactionnel sous agitation pendant 3 h à température ambiante. On évapore ensuite le méthanol puis l'on reprend le brut réactionnel dans du dichlorométhane. On effectue un lavage 2 fois à l'eau et une fois avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée, puis on purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂/hexane 40:60). On obtient ainsi 470 mg (0,966 mmol) d'une cire blanche soit un rendement de 77 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,15 (CH₂Cl₂/hexane : 40/60).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,97 (t, 2H, ³J_{H-12} = 5,4 Hz, H₁₂); 2,36 (tt, ³J_{H-F} = 19,0 Hz, ³J_{H-12} = 6,03 Hz, C₁₁); 2,03 (tt, ³J_{H-F} = 18,6 Hz, ³J_{H-9} = 7,62 Hz, C₁₀); 1,70-1,20 (m, 16H, H₂₋₉); 0,89 (t, ³J_{H-2} = 6,0 Hz, 3H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

55,18 (C₁₂); 33,93 (t, ²J_{H-F} = 21,2 Hz, C₁₁); 31,90 (C₃); 30,95 (t, ²J_{H-F} = 22,3 Hz, C₁₀); 29,54-29,15 (m, C₄₋₈); 22,68 (C₂); 20,12 (C₉); 14,02 (C₁).

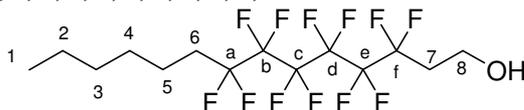
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,4 à -111,2 (m, 2F, F_f); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_a); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b, F_e); -121,6 à -121,4 (m, 4F, F_c, F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

3335, 2922, 2854, 1470, 1381, 1178, 1136, 1049, 687, 647, 568, 540, 445.

30'b 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluorotétradécan-1-ol



C₁₄H₁₈F₁₂O
MM : 430,27 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **30'b** a été obtenu à partir du composé **30b** (3 g, 5,61 mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30'a** à partir de **30a**. Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 2,21 g (5,13 mmol) d'une cire blanche soit un rendement de 91 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,15 (CH₂Cl₂/hexane 50/50).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,93 (t, 2H, $^3J_{7-8} = 6,0$ Hz, H₈); 3,44 (s, 1H, H_{OH}); 2,40 (tt, $^3J_{H-F} = 18,9$ Hz, $^3J_{7-8} = 6,36$ Hz, C₇); 2,05 (tt, $^3J_{H-F} = 18,77$ Hz, $^3J_{6-5} = 8,16$ Hz, C₆); 1,70-1,28 (m, 8H, H₂₋₅); 0,89 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

54,92 (C₈); 33,93 (t, $^2J_{C-F} = 21,3$ Hz, C₇); 31,51 (C₃); 31,02 (t $^2J_{C-F} = 22,46$ Hz, C₆); 28,89 (C₄); 22,46 (C₂); 20,12 (C₅); 13,7 (C₁).

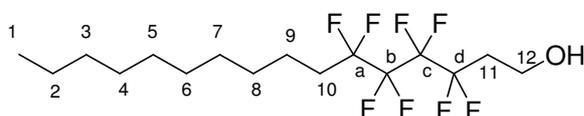
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,5 à -111,2 (m, 2F, F_f); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_a); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b, F_e); -121,6 à -121,4 (m, 4F, F_c, F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

3335, 2958, 1556, 1538, 1470, 1383, 1186, 1137, 1048, 1000, 687, 647, 540, 446.

30'c 3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluorohexadécane-1-ol



C₁₆H₂₆F₈O
MM : 386,36 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **30'c** a été obtenu à partir de **30c** (8,81 g, 17,9 mmol), en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30'a** à partir de **30a**. Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 6,01 g (15,5 mmol) de ce composé soit un rendement de 86%

ANALYSES

CCM R_f = 0,6 (hexane/CH₂Cl₂ 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,92 (t, 2H, $^3J_{11-12} = 6,3$ Hz, H₁₂); 2,50-2,30 (m, 2H, H₁₁); 2,10-1,95 (m, 2H, H₁₀); 1,7-1,5 (m, 2H, H₉); 1,30-1,20 (m, 14H, H₂₋₈); 0,90 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

122,20-110,02 (m, 4C, C_{a-d}); 55,00 (C₁₂); 33,90 (t, $^2J_{C-F} = 21$ Hz, C₁₁); 31,98 (C₃); 30,94 (t, $^2J_{C-F} = 22$ Hz, C₁₀); 129,65-129,25 (m, C₅₋₉); 22,73 (C₂); 20,23 (C₉); 13,97 (C₁).

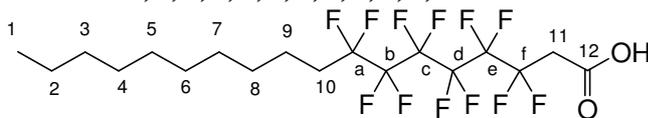
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-122,0 à -121,8 (m, 2F, F_b); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_c); -112,6 à -112,4 (m, 2F, F_a); -111,7 à -111,5 (m, 2F, F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

3356, 2924, 2855, 2359, 2341, 1468, 1379, 1219, 1161, 1108, 1047, 999, 864, 720, 697, 669, 605, 542, 452.

31a Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorooctadécanoïque



$C_{18}H_{24}F_{12}O_2$
MM : 500.16 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **31a** a été obtenu par oxydation du composé **30'a** avec le réactif de Jones (600 mg de CrO_3 dans 1,6 mL d' H_2O plus H_2SO_4 600 μL). À une solution d'alcool **30'a** (2 g, 3,99 mmol) dans un mélange d'acétone (80 mL) et d'eau (1 mL), à température ambiante, on ajoute au goutte à goutte le réactif de Jones jusqu'à obtention d'une coloration rouge brun persistante. Après 1 h à température ambiante on stoppe la réaction par ajout d'isopropanol. La solution est évaporée et reprise dans 5 mL d'eau et extraite 3 fois à l'éther. La phase organique est ensuite lavée par une solution saturée de NaCl puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée. On obtient ainsi 1,64 g (3,28 mmol) d'une cire blanche soit un rendement de 80 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ ($CHCl_3/AcOEt$ 75/25).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) :

3,20 (t, 2H, $^3J_{H-F} = 17$ Hz, H_{11}); 2,05 (tt, $^3J_{H-F} = 18,4$ Hz, $^3J_{10-9} = 7,4$ Hz, 2H, H_{10}); 1,59 (m, 2H, H_9); 1,28 (m, 14H, H_2-H_8); 0,89 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) δ (ppm) :

169,93 (C_{12}); 125,02-105,18 (C_{a-f}); 36,77 (t, $^2J_{C-F} = 23$ Hz, C_{11}); 31,87 (C_3); 30,94 (t, $^2J_{10-F} = 22$ Hz, C_{10}); 29,54-29,1 (C_{8-4}); 22,67 (C_2); 20,12 (C_9) 14,09 (C_1).

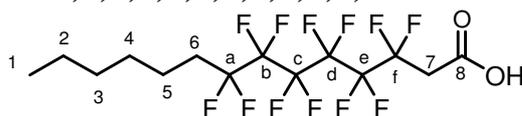
RMN ^{19}F ($CDCl_3$, 188 MHz) δ (ppm) :

-110,0 à -109,8 (m, 2F, F_a); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_f); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_c, F_d); -121,0 à -120,8 (m, 2F, F_b); -121,6 à -121,4 (s, 2F, F_e).

IR ν (cm^{-1}) :

2920, 2855, 2352, 1716, 1651, 1470, 1380, 1321, 1280, 1247, 1212, 1173, 1128, 1109, 1051, 1016, 963, 919, 820, 721, 694, 602, 571, 541, 501.

31b Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorotétradécanoïque



$C_{18}H_{24}F_{12}O_2$
MM : 500,36 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **31b** a été obtenu à partir de **30'b** (1 g, 2,32mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**, c'est-à-dire une

oxydation de l'alcool correspondant par le réactif de Jones. Après filtration et séchage on obtient 930 mg (1,85 mmol) d'une cire blanche soit un rendement de 80%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt} : 80/20$)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

3,2 (t, 2H, $^3J_{\text{H-F}} = 17,0$ Hz, H_7); 2,15-1,92 (tt, $^3J_{\text{H-F}} = 18,8$ Hz, $^3J_{6-5} = 7,7$ Hz, 2H, H_6); 1,82-1,51 (m, 2H, H_5); 1,45-1,25 (m, 4H, H_{2-4}); 0,90 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) :

170,08 (C_8); 120,10-101,21 ($\text{C}_{\text{a-f}}$); 36,07 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 23$ Hz, C_7); 31,39 (C_4); 30,94 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 22$ Hz, C_6); 28,78 (C_3); 22,41 (C_2); 20,07 (C_5); 13,93 (C_1).

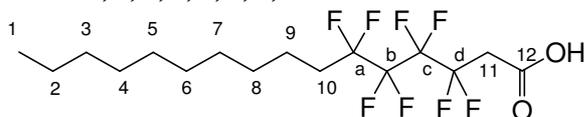
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-110,0 à -109,8 (m, 2F, F_a); -112,4 à -112,2 (m, 2F, F_f); -119,8 à -119,6 (m, 4F, $\text{F}_\text{c}, \text{F}_\text{d}$); -121,0 à -120,9 (m, 2F, F_b); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm^{-1}) :

2954, 2870, 1715, 1434, 1408, 1277, 1216, 1175, 1130, 1111, 1051, 1007, 922, 821, 694, 667, 615, 569, 540,420.

31c Acide 3,3,4,4,5,5,6,6-octafluorohexadécanoïque



$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{F}_8\text{O}_2$
MM : 400,35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **31c** a été obtenu à partir de **30'c** (4,3 g, 11,13 mmol), en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**, c'est-à-dire une oxydation de l'alcool correspondant par le réactif de Jones. Après extraction et séchage, on obtient 3,65 g (9,13 mmol) d'une cire blanche, avec un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM $R_f = 0,2$ ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt} 70/30$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

3,20 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 17,4$ Hz, 2H, H_{11}); 2,04 (tt, $^3J_{\text{H-F}} = 18,4$ Hz, $^3J_{10-9} = 7,4$ Hz, 2H, H_{10}); 1,7-1,55 (m, 2H, H_9); 1,4-1,2 (m, 14H, H_{2-8}); 0,89 (t, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, 3H, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

169,88 (C_{12}); 122,2-110,0 (m, 4C, $\text{C}_{\text{a-d}}$); 36,77 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 22,8$ Hz, C_{11}); 31,88 (C_3); 30,93 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 22,3$ Hz, C_{10}); 29,5-29,12 (m, C_{3-6}); 22,67 (C_2); 20,13 (C_9); 14,09 (C_1).

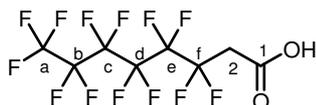
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-121,4 à -121,2 (m, 4F, F_b,F_c); -112,6 à -121,4 (m, 2F, F_a); -110,3 à -110,1 (m, 2F,F_d).

IR ν (cm⁻¹) :

2919, 2851, 1716, 1438, 1404, 1278, 1253, 1241, 1208, 1175, 1107, 1049, 1015, 964, 906, 835, 794, 725, 633, 604, 539, 500, 470.

31d Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridécafluorooctanoïque



C₈H₃F₁₃O₂
MM : 378,09 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **31d** a été obtenu par oxydation au réactif de Jones de l'alcool commercial correspondant. On a appliqué la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**. Après extraction et séchage, on obtient une cire blanche avec un rendement de 80%.

ANALYSES

CCM R_f = 0,2 (CHCl₃/AcOEt 70/30)

RMN ¹H (CD₃OD, 200 MHz) δ (ppm) :
4,64 (t_{app}, ³J_{H-F} = 16,2Hz, H₂).

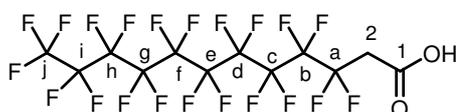
RMN ¹³C (CD₃OD, 50 MHz) δ (ppm) :
167,11 (C₁); 37,36 (t, ²J_{C-F} = 22,4Hz, C₂).

RMN ¹⁹F (CD₃OD, 188 MHz) δ (ppm) :
-78,7 à -78,9 (m, 3F, F_a); -109,4 à -109,2 (m, 2F, F_f); -119,2 à -119,0 (m, 2F ,F_e);
-120,3 à -120,1 (m, 2F, F_c, F_d); -123,6 à -123,4 (m, 2F, F_a).

IR ν (cm⁻¹) :

2357, 2080, 1732, 1361, 1233, 1186, 1141, 1118, 1064, 971, 925, 849, 812, 745, 735, 720, 707, 603, 560, 531.

31e Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-henicosafuorododécanoïque



C₁₁HF₂₁O₂
MM : 563,09 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **31e** a été obtenu par oxydation au réactif de Jones de l'alcool commercial correspondant. On a appliqué la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**. Après extraction et séchage, on obtient une cire blanche avec un rendement de 95%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 10/6/1)

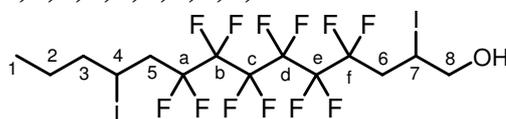
RMN ^1H (CD_3CN :, 300 MHz) δ (ppm) :
2,65 (t, $^3J_{\text{H-F}} = 18,47$ Hz, 2H, H_2).

RMN ^{13}C (CD_3CN :, 75 MHz) δ (ppm) :
165,42 (C_1); 36,90 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 22,0$ Hz, C_2).

RMN ^{19}F (CD_3CN : 188 MHz) δ (ppm) :
-78,5 à -78,7 (m, 3F, F_j); -109,7 à -109,8 (m, 2F, F_a); -119,2 à -119,3 (m, 10F, $\text{F}_{\text{d-h}}$); -120,2 à 120,3 (m, 2F, F_c); -120,5 à 120,6 (m, 2F, F_i); -123,6 à -123,7 (m, 2F, F_b).

IR ν (cm^{-1}) :
2980, 2355, 1712, 1434, 1373, 1342, 1204, 1145, 1116, 1073, 920, 866, 823, 732, 623, 551, 526, 411.

32 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-Dodécafluoro-2,11-diiodotétradécan-1-ol



$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{F}_{12}\text{I}_2\text{O}$
MM : 682,07 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans 54 mL d'une solution d'acétonitrile/eau (8/7), on introduit du 1,6-diiiodoperfluorohexane (6 g, 10,8 mmol, 1 éq), du 1-pentène (1,186 mL, 10,8 mmol ; 1 éq), de l'alcool vinylique (740 μL , 10,8 mmol, 1 éq) et du NaHCO_3 (1,818 g, 21,6 mmol, 2 éq) à 0°C. On ajoute doucement $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (3,76 g, 21,6 mmol, 2 éq) par portion. Le milieu réaction est agitée 20 min à 0°C puis 1 h à température ambiante. On ajoute ensuite quelques gouttes d'une solution d'HCl 3% afin d'atteindre un pH entre 5 et 7. On laisse agiter 15 min à température ambiante puis on évapore l'acétonitrile et on extrait 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée. On purifie ensuite le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : EP/ CH_2Cl_2 6/4). On obtient ainsi 1,5 g (2,2 mmol) d'une huile jaune, soit un rendement de 20%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP}$ 70/30).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

4,50-4,35 (m, 2H, H_7 , H_4); 4,41 (d, $^3J_{7-8} = 5,2\text{Hz}$, 2H, H_8); 3,10-2,60 (m, 4H, H_{5-6}); 1,85-1,20 (m, 4H, H_{2-3}); 0,95 (t, $^3J_{1-2} = 7,2\text{Hz}$, 3H, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

67,81 (C_8); 42,3 (C_3); 41,70 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 21,5\text{Hz}$, C_5); 37,48 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 21,5\text{Hz}$, C_6); 22,82 (C_2); 21,72 (C_4); 20,75 (C_7); 12,82 (C_1).

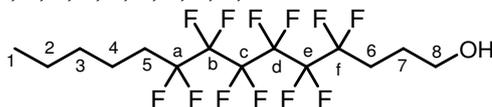
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-109,7 à -109,5 ($\text{AB } ^2J_{\text{aa}'} = 269,7\text{Hz}$, 1F, F_a); -110,5 à -110,3 ($\text{AB } ^2J_{\text{ff}'} = 269,7\text{Hz}$, 1F, F_f); -112,5 à -112,3 ($\text{AB } ^2J_{\text{a'a}} = 269,7\text{Hz}$, 1F, F_a'); -112,8 à -112,6 ($\text{AB } ^2J_{\text{f'f}} = 269,7\text{Hz}$, 1F, F_f'); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b , F_c); -121,8 à -121,6 (m, 4F, F_c , F_d).

IR ν (cm^{-1}) :

3330, 2960, 1463, 1431, 1363, 1261, 1166, 1136, 1053, 1005, 953, 748, 690, 661, 547, 505, 405.

33 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-Dodécafluorotétradécan-1-ol



$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_{12}\text{O}$
MM : 430,27g.mol $^{-1}$
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 18 mL d'éther anhydre on introduit le composé **32** (2,4 g, 3,52 mmol, 1 éq) ainsi que de l'hydruide de tributyl étain (4 mL, 14,1 mmol, 4 éq) plus une quantité catalytique d'AIBN (115 mg, 0,7 mmol, 0,2 éq). On met la solution à reflux sous une lampe halogène pendant 3 heures, puis on ajoute 10 mL d'eau distillé. On extrait 3 fois à l'éther puis on lave cette phase organique avec une solution de NaCl saturée. Cette phase est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : EP/ CH_2Cl_2 1/0→5/5). On obtient ainsi 1,2 g (2,78 mmol) d'une huile incolore avec un rendement de 79 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP}$ 60/40).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

3,74 (t, 2H, $^3J_{7-8} = 6\text{Hz}$, H_8); 2,30-1,78 (m, 6H, H_5 , H_6 , H_7); 1,65-1,51 (m, 2H, H_4); 1,40-1,33 (m, 4H, H_{2-3}); 0,92 (t, 3H, $^3J_{1-2} = 7\text{Hz}$, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

61,49 (C_8); 31,22 (C_3); 30,60 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 23\text{Hz}$, C_5); 27,83 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 22,8\text{Hz}$, C_6); 23,43 (C_7); 22,26 (C_2); 19,78 (C_4); 13,77 (C_1).

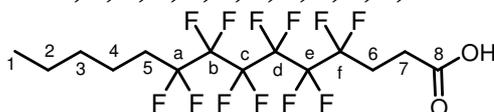
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-112,4 à -112,2 (m, 4F, F_a , F_f); -120,0 à -119,8 (m, 4F, F_b , F_c); -121,8 à -121,6 (m, 4F, F_c , F_d).

IR ν (cm^{-1}) :

3325, 2959, 2875, 1456, 1319, 1187, 1137, 1046, 1019, 954, 730, 704, 687, 648, 568, 538, 472, 441.

34 Acide 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-dodécafluorotétradécanoïque



$C_{14}H_{16}F_{12}O_2$
MM : 444,26g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **34** a été obtenu à partir de **33** (100 mg, 232 μ mol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de l'alcool **33**, c'est-à-dire une oxydation de l'alcool correspondant par le réactif de Jones. Après extraction et séchage on obtient 82 mg (186 μ mol) d'une cire blanche avec un rendement de 80%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (CHCl₃/AcOEt 70/30).

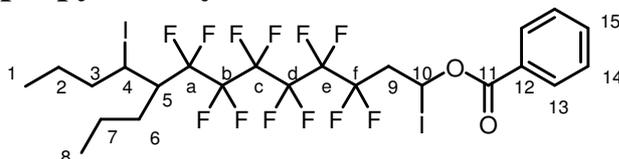
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :
2,71 (t, 2H, ³J₆₋₇ = 7,1 Hz, H₇); 2,62-2,43 (m, 2H, H₆); 2,25-1,96 (m, 2H, H₅); 1,65-1,57 (m, 2H, H₄); 1,42-1,31 (m, 4H, H₂, H₃); 0,90 (t, 3H, ³J₁₋₂ = 7 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :
177,36 (C₈); 31,22 (C₃); 30,60 (t, ²J_{C-F} = 23 Hz, C₅); 26,35 (t, ²J_{C-F} = 21,9 Hz, C₆); 25,39 (C₇); 22,26 (C₂); 19,78 (C₄); 13,75 (C₁).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
-112,4 à -112,2 (m, 2F, F_a); -112,8 à -112,6 (m, 2F, F_f); -119,9 à -119,7 (m, 4F, F_b, F_c);
-121,7 à -121,5 (m, 4F, F_c, F_d).

IR v (cm⁻¹) :
2959, 1718, 1193, 1140, 904, 727, 650, 538.

35a Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-1,10-diiodo-9-propyltridécyle



$C_{23}H_{24}F_{12}I_2O_2$
MM : 814,23 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **35a** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **29a** à partir de 1,6-diiodoperfluorohexane (5,0 g, 9,02 mmol, 1 éq), de benzoate de vinyle (1.250 mL, 9,02 mmol, 1 éq) et de *trans*-4-octène (1,415 mL, 9,02 mmol, 1 éq).

Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 1,5 g (1,84 mmol) de composé **35a** soit un rendement de 20%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP } 10/90$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

8,05 (d, 2H, $^3J_{13-14} = 7,5$ Hz, H_{13}); 7,64 (t, 1H, $^3J_{14-15} = 7,5$ Hz, H_{15}); 7,49 (t, 2H, $^3J_{13-14} = ^3J_{14-15} = 7,3$ Hz, H_{14}); 7,34 (dd, 2H, $^3J_{9-10} = 2,21$, $^3J_{9-10'} = 10,5$ Hz, H_{10}); 4,5-4,32 (m, 1H, H_4); 3,6-3,1 (m, 2H, H_9); 2,72 (m, 1H, H_5); 1,78 (m, 2H, H_3); 1,7-1,2 (m, 6H, H_2, H_7); 0,90 (t, 6H, $^3J_{1-2} = ^3J_{7-8} = 7$ Hz, H_1, H_8).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

163,45 (C_{11}); 134,09 (C_{15}); 130,02 (C_{13}); 128,39 (C_{14}); 128,34 (C_{12}); 49,19 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 17,15$ Hz, C_5); 45,89 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 20,12$ Hz, $\text{C}_{5'}$); 43,91 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 20,76$ Hz, C_9); 41,34 (C_6); 40,93 (C_{10}); 37,38 (C_6'); 32,26 et 31,70 (C_4, C_4'); 28,40 (C_3); 22,83 et 22,58 (C_2, C_7); 14,07 et 13,09 (C_1, C_8).

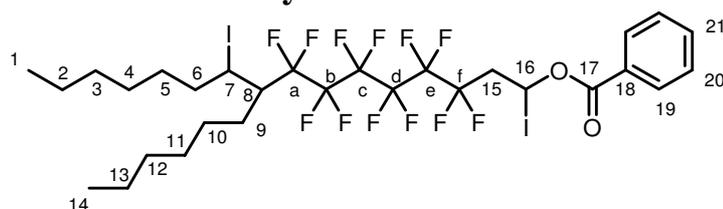
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-121,5 à -121,3 (m, 2F, F_b, F_e); -119,6 à -119,4 (m, 2F, F_c, F_d); -112,8 (2AB, $^2J_{\text{aa}'} = 280$ Hz, $^2J_{\text{ff}'} = 280$ Hz, 2F, F_a, F_f); -109,3 et -109,5 (2AB, $^2J_{\text{aa}'} = 280$ Hz, $^2J_{\text{ff}'} = 280$ Hz, 2F, F_a, F_f).

IR ν (cm^{-1}) :

2962, 2875, 1745, 1453, 1255, 1243, 1140, 1192, 1080, 1057, 1024, 708, 692, 526.

35b Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-hexyl-1,10-diiodohexadécyle



$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{F}_{12}\text{I}_2\text{O}_2$
MM : 898,38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **35b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **29a** à partir de 1,6-diiodoperfluorohexane (4,0 g, 7,2 mmol, 1 éq), de benzoate de vinyle (1 mL, 7,2 mmol, 1 éq) et de 7-tétradécène (1,84 mL, 7,2 mmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 1,2 g (1,33 mmol) de composé **35b**, soit un rendement de 19%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP } 10/90$)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

8,05 (d, ³J₁₉₋₂₀ = 7,5 Hz, 2H, H₁₉); 7,61 (t, ³J₂₀₋₂₁ = 7,5 Hz, 1H, H₂₁); 7,48 (t, ³J₂₀₋₂₁ = ³J₁₉₋₂₀ = 7,3 Hz, 2H, H₂₀); 7,34 (dd, ³J₁₅₋₁₆ = 2,21Hz, ³J₁₅₋₁₆ = 10,5 Hz, 2H, H₁₆); 4,5-4,32 (m, 1H, H₇); 3,6-3,1 (m, 2H, H₁₅); 2,72 (m, 1H, H₈); 2,2-1,1 (m, 20H, H₂₋₆, H₉₋₁₃); 0,90 (m, 6H, H₁, H₁₄).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,46 (C₁₇); 134,09 (C₂₁); 130,04 (C₁₉); 128,60 (C₁₈, C₂₀); 49,42 (t, ²J_{C-F} = 19Hz, C₈); 46,10 (t, ²J_{C-F} = 19Hz, C₈); 43,93 (t, ²J_{C-F} = 21Hz, C₁₅); 40,89 (C₁₆); 39,40 (C₇); 35,49 (C₇); 32,90-26,30 (C₃₋₆, C₉₋₁₂); 22,63 (C₂, C₁₃); 14,06 (C₁, C₁₄).

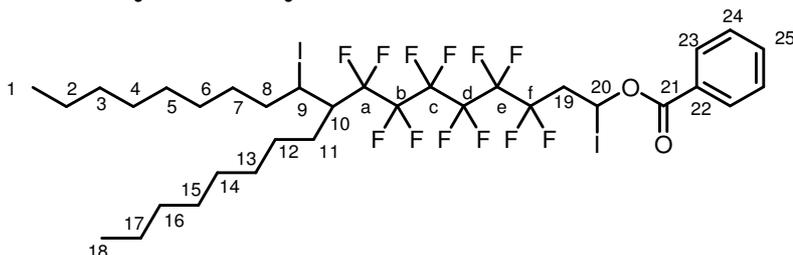
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-121,5 à -121,3 (m, 4F, F_b, F_e); -119,6 à -119,4 (m, 4F, F_d, F_c); -113,4 à -106,8 (m, 4F, F_a, F_f).

IR ν (cm⁻¹) :

2956, 2926, 2857, 1745, 1454, 1375, 1339, 1254, 1242, 1193, 1140, 1079, 1056, 1023, 983, 831, 799, 707, 692, 600, 560, 526, 444.

35c Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-1,10-diiodo-9-octyloctadécyle



C₃₃H₄₄F₁₂I₂O₂
MM : 954,49 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **35c** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **29a** à partir de 1,6-diiodoperfluorohexane (4,0 g, 7,2 mmol, 1 éq) de benzoate de vinyle (1 mL, 7,2 mmol, 1 éq) et de 9-octadécène (2,3 mL, 7,2 mmol, 1 éq). Après chromatographie sur colonne de silice, on obtient 1 g (1,04 mmol) de composé **35c**, soit un rendement de 14 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/EP 10/90).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

8,05 (d, ³J₂₃₋₂₄ = 7,5 Hz, 2H, H₂₃); 7,61 (t, ³J₂₄₋₂₅ = 7,5 Hz, 2H, H₂₅); 7,48 (t, ³J₂₄₋₂₅ = ³J₂₃₋₂₄ = 7,3 Hz, 2H, H₂₄); 7,34 (dd, ³J₁₉₋₂₀ = 2,21Hz, ³J₁₉₋₂₀ = 10,5 Hz, 1H, H₂₀); 4,5-4,32 (m, 1H, H₉); 3,60-3,10 (m, 2H, H₁₉); 2,72 (m, 1H, H₁₀); 2,22-1,10 (m, 28H, H₂₋₈, H₁₁₋₁₈); 0,90 (m, 6H, H₁, H₁₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,46 (C₂₁); 134,09 (C₂₅); 130,04 (C₂₃); 128,60 (C₂₄,C₂₂); 49,42 (t, ²J_{C-F} = 19 Hz, C₁₀); 46,1 (t, ²J_{C-F} = 19 Hz, C_{10'}); 43,93 (t, ²J_{C-F} = 21 Hz, C₁₉); 40,89 (C₂₀); 39,40 (C₉); 35,49 (C₉); 32,90-26,30 (C₃₋₈, C₁₂₋₁₆); 22,63 (C₂,C₁₇); 14,06 (C₁, C₁₈).

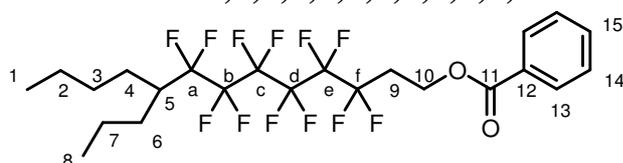
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-121,5 à -121,3 (m, 4F, F_b, F_e); -119,6 à -119,4 (m, 4F, F_d, F_c); -113,4 à -106,8 (m, 4F, F_a, F_f).

IR ν (cm⁻¹) :

2925, 2855, 1746, 1454, 1254, 1242, 1197, 1141, 1080, 1058, 1024, 708, 527.

36a Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyltridécyle



C₂₃H₂₆F₁₂O₂
MM : 562,17g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **36a** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30a** à partir de **29a** (1,69 g, 2,07 mmol). Après chromatographie sur colonne de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 10/0→2/8), on obtient 930 mg (1,65 mmol) de composé **36a** sous forme d'une huile incolore, soit un rendement de 80%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,2 (EP/CH₂Cl₂ 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

8,07 (d, 2H, ³J₁₃₋₁₄ = 7,5 Hz, H₁₃); 7,60 (t, 1H, ³J₁₄₋₁₅ = 7,5 Hz, H₁₅); 7,46 (t, 2H, ³J₁₃₋₁₄ = ³J₁₄₋₁₅ = 7,5 Hz, H₁₄); 4,64 (t, 2H, ³J₉₋₁₀ = 6,43 Hz, H₁₀); 2,62 (tt, 2H, ³J_{H-F} = 18,2 Hz, ³J₁₀₋₉ = 6,43 Hz, H₉); 2,36-1,91 (m, 1H, H₅); 1,72-1,21 (m, 10H, H₂₋₄, H₆₋₇); 0,92 (t, 6H, ³J₁₋₂ = ³J₇₋₈ = 7 Hz, H₁, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

166,10 (C₁₁); 138,37 (C₁₂); 133,24 (C₁₅); 129,65 (C₁₃); 128,41 (C₁₄); 100-125 (C_{a-f}); 56,91 (C₁₀); 40,99 (t, ²J_{C-F} = 19,9Hz, C₅); 30,75 (t, ²J_{C-F} = 22,2Hz, C₉); 29,58 (C₆, C₃); 26,55 (C₄); 22,8 (C₂); 20,10 (C₇); 13,75 (C₁₋₈).

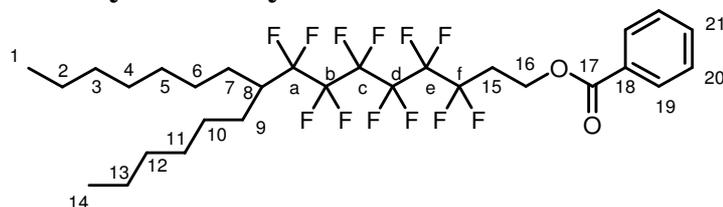
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,4 à -111,2 (m, 4F, F_a, F_f); -118,3 à -118,1 (m, 2F, F_b); -119,4 à -119,7 (m, 4F, F_{c,d}); -121,5 à -121,3 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

2962, 2876, 1727, 1454, 1380, 1273, 1191, 1140, 1113, 1071, 710, 689, 651.

36b Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-hexylhexadécyle



$C_{29}H_{38}F_{12}O_2$
MM : 646,59 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **36b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30a** à partir de **29a** (2,32 g, 2,56 mmol). Après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 10/0→5/5), on obtient (1,610 g, 2,49 mmol) de composé **36b** sous forme d'une huile incolore, avec un rendement de 96 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/EP 10/90).

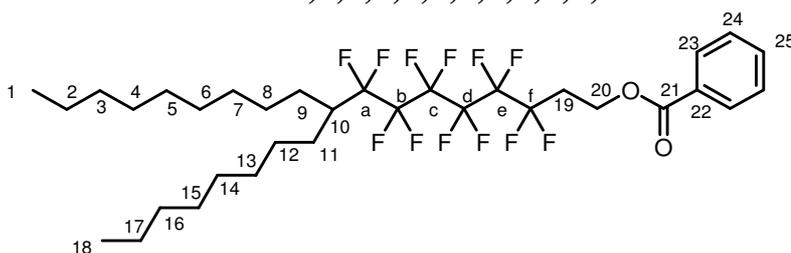
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :
8,05 (d, ³J₁₉₋₂₀ = 7,5 Hz, 2H, H₁₉); 7,61 (t, ³J₂₀₋₂₁ = 7,5 Hz, 1H, H₂₁); 7,48 (t, ³J₂₀₋₂₁ = ³J₁₉₋₂₀ = 7,3 Hz, 2H, H₂₀); 4,64 (t, ³J₁₅₋₁₆ = 6,4 Hz, H₁₆); 2,62 (tt, 2H, ³J_{C-F} = 18,3 Hz, ³J₁₅₋₁₆ = 6,4 Hz, H₁₅); 2,30-2,12 (m, 1H, H₈); 1,92-1,31 (m, 22H, H₂₋₇, H₉₋₁₃); 0,90 (m, 6H, H₁, H₁₄).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :
166,13 (C₁₇); 134,09 (C₂₁); 130,04 (C₁₉); 128,60 (C₁₈, C₂₀); 56,92 (C₁₆); 41,19 (t, ²J_{C-F} = 20 Hz, C₁₅); 31,79-31,60 (C₃, C₁₂); 30,77 (t, ²J_{C-F} = 22 Hz, C₈); 26,82-26,61 (C₇, C₉); 22,63 (C₂, C₁₃); 14,06 (C₁, C₁₄).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
-111,6 à -111,4 (m, 4F, F_a, F_f); -118,6 à -118,4 (m, 2F, F_b); -119,6 à -119,9 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :
2956, 2926, 2857, 1727, 1455, 1315, 1272, 1192, 1140, 1112, 1070, 1027, 1004, 709, 689, 651, 548.

36c Benzoate de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-octyloctadécyle



$C_{33}H_{44}F_{12}O_2$
MM : 702,69 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **36c** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30a** à partir de **29a** (770 mg, 0,8 mmol). Après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 10/0→5/5), on obtient 560 mg (0,8 mmol) de composé **36c** sous forme d'une huile incolore avec un rendement quantitatif.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/EP 10/90).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

8,05 (d, ³J₂₃₋₂₄ = 8 Hz, 2H, H₂₃); 7,61 (t, ³J₂₄₋₂₅ = 7,5 Hz, 1H, H₂₅); 7,48 (t, ³J₂₄₋₂₅ = ³J₂₃₋₂₄ = 7,3 Hz, 2H, H₂₄); 4,64 (t, ³J₁₉₋₂₀ = 6,6 Hz, 2H, H₂₀); 2,62 (tt, ³J₁₉₋₂₀ = 6,6 Hz, ³J_{C-F} = 18,3 Hz, 2H, H₁₉); 2,32-2,16 (m, 1H, H₁₀); 1,93-1,31 (m, 30H, H₂₋₉, H₁₁₋₁₇); 0,90 (t, ³J₁₋₂ = ³J₁₈₋₁₇ = 7Hz, 6H, H₁, H₁₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,46 (C₂₁); 134,09 (C₂₅); 130,04 (C₂₃); 128,6 (C₂₄, C₂₂); 56,9 (C₂₀); 41,23 (t, ²J_{C-F} = 20Hz, C₁₉); 31,90 (C₃, C₁₆); 30,77 (t, ²J_{C-F} = 21Hz, C₁₀); 29,8-28,2 (C₃₋₈, C₁₂₋₁₆); 26,90 (C₉, C₁₁); 22,67 (C₂, C₁₇); 14,02 (C₁, C₁₈).

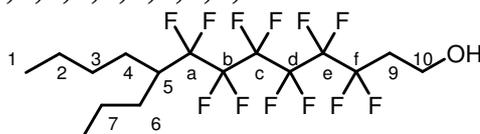
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,6 à -111,4 (m, 4F, F_a, F_f); -118,6 à -118,4 (m, 2F, F_b); -119,9 à -119,6 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR (cm⁻¹) :

2955, 2925, 2855, 1728, 1467, 1454, 1316, 1273, 1193, 1164, 1141, 1112, 1071, 1027, 710, 689, 651.

37a 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-propyltridécan-1-ol



C₁₆H₂₂F₁₂O
MM : 458,33g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **37a** a été obtenu à partir de **36a** (900 mg, 2,7 mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30'a** à partir de **30a**. Après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 6/4→9/1), on obtient 790 mg (1,72 mmol) de ce composé, soit un rendement de 64 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,2 (EP/CH₂Cl₂ 80/20).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,99 (t, 2H, $^3J_{9-10} = 6,18$ Hz, H₁₀); 2,56-2,31 (m, 2H, H₉); 2,23-1,91(m, 1H, H₅); 1,79-1,24 (m, 10H, H₂₋₄, H₆₋₇); 0,92 (t, 6H, $^3J_{1-2} = ^3J_{7-8} = 7$ Hz, H₁, H₈).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

125,42-100,61 (C_{a-f}); 55,33 (C₁₀); 41,22 (t, $^2J_{C-F} = 20,2$ Hz, C₅); 34,25 (t, $^2J_{C-F} = 21,2$ Hz, C₉); 29,22 (m, C₆, C₃); 26,72 (C₄); 22,80 (C₂); 20,21 (C₇); 14,04, 13,74 (C₁, C₈).

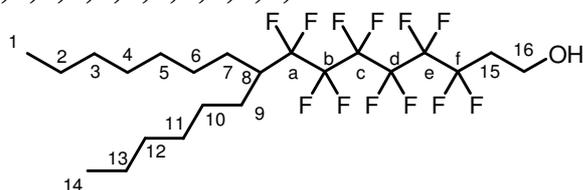
RMN ^{19}F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,3 à -111,9 (m, 4F, F_a, F_f); -118,4 à -118,6 (m, 2F, F_b); -119,6 à -119,9 (m, 4F, F_{c-d}); -121,7 à -121,9 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

3356, 2962, 2877, 1469, 1382, 1189, 1140, 1001, 735, 690, 651,545.

37b **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-hexylhexadécane-1-ol**



C₂₂H₃₄F₁₂O
MM : 646,59 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **37b** a été obtenu à partir de **36c** (1,6 g, 2,47 mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30'a** à partir de **30a**. Après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 6/4→9/1), on obtient 966 mg (1,78 mmol) de ce composé, soit un rendement de 71%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,2 (CH₂Cl₂/PE 30/70).

RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,97(m, 2H, H₁₆); 2,55-2,03(m, 4H, H₁₅, H₈, OH); 1,88-1,62 (m, 2H, H₇, H₉); 1,65-1,21 (m, 20H, H₂₋₇, H₉₋₁₃); 0,92 (t, $^3J_{1-2} = ^3J_{18-17} = 6$ Hz, 6H, H₁, H₈).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

55,27 (C₁₆); 41,20 (t, $^2J_{C-F} = 20$ Hz, C₈); 34,22 (t, $^2J_{C-F} = 21$ Hz, C₁₅); 31,80-31,60 (C₃, C₁₂); 29,84-28,61 (C₄₋₆, C₁₀₋₁₂); 26,87 (C₉, C₇); 22,63 (C₂, C₁₃); 14,01 (C₁, C₁₄).

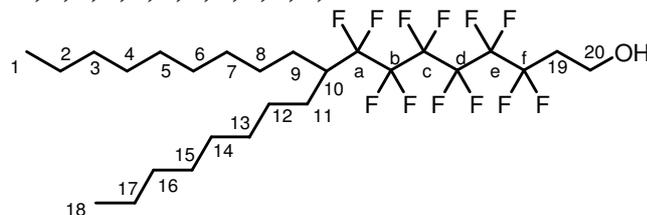
RMN ^{19}F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,6 à -111,4 (m, 4F, F_a, F_f); -118,6 à -118,4 (m, 2F, F_b); -119,6 à -119,9 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

3360, 2957, 2926,2858, 1467, 1378, 1189, 1139, 1050, 1000, 689, 650, 545, 448.

37c 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-octyloctadécan-1-ol



$C_{26}H_{42}F_{12}O$
MM : 598,59 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **37c** a été obtenu à partir de **36c** (560 mg, 796 μ mol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **30'a** à partir de **30a**. Après chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 6/4→9/1), on obtient 400 mg (668 μ mol) de ce composé, avec un rendement de 84%

ANALYSES

CCM : R_f = 0,2 (EP/CH₂Cl₂ 70/30).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,97(t, ³J₁₉₋₂₀ = 6,4 Hz, 2H, H₂₀); 2,55-2,10 (m, 4H, H₁₉, H₁₀, OH); 2,22-1,90(m, 1H, H₅); 1,74-1,23 (m, 30H, H₂₋₉, H₁₁₋₁₇); 0,92 (t, ³J₁₋₂ = ³J₁₈₋₁₇ = 6 Hz, 6H, H₁, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

125,00-100,10 (C_{a-f}); 55,15 (C₂₀); 41,25 (t, ²J_{C-F} = 20 Hz, C₁₀); 34,00 (t, ²J_{C-F} = 21 Hz, C₁₉); 31,92 (C₃, C₁₆); 29,8-29,3 (m, C₄₋₈, C₁₂₋₁₅); 26,92 (C₉, C₁₁); 22,7 (C₂, C₁₇); 14,37 (C₁, C₁₈).

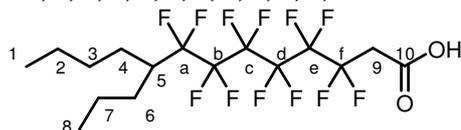
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,6 à -111,4 (m, 4F, F_a, F_f); -118,7 à -118,5 (m, 2F, F_b); -119,9 à -119,6 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

3359, 2955, 2924, 2855, 1467, 1378, 1190, 1164, 1139, 1149, 1000, 706, 690, 651, 545, 446.

38a Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyltridécanoïque



$C_{16}H_{20}F_{12}O_2$
MM : 472,13 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **38a** a été obtenu à partir de **37a** (630 mg, 1,37 mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**, c'est-à-dire une oxydation de l'alcool correspondant par le réactif de Jones. Après extraction et séchage, on obtient 650 mg (1,37 mmol) de produit, soit un rendement quantitatif.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (EP/CH₂Cl₂ 80/20).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,99 (t, ³J₉₋₁₀ = 6,18 Hz, 2H, H₁₀); 2,55-2,32 (m, 2H, H₉); 2,28-1,92 (m, 1H, H₅); 1,75-1,22 (m, 10H, H₂₋₄, H₆₋₇); 0,92 (t, ³J₁₋₂ = ³J₇₋₈ = 7Hz, 6H, H₁, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

125,00-100,10 (C_{a-f}); 55,33 (C₁₀); 41,22 (t, ²J_{C-F} = 20,2Hz, C₅); 34,25 (t, ²J_{C-F} = 21,2Hz, C₉); 29,2 (m, C₆, C₃); 26,72 (C₄); 22,8 (C₂); 20,21 (C₇); 14,04, 13,74(2s, C₁, C₈).

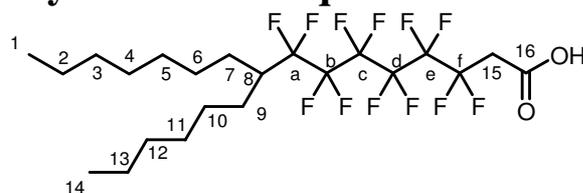
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,3 à -111,9 (m, 4F, F_a, F_f); -118,6 à -118,4 (m, 2F, F_b); -119,9 à -119,7 (m, 4F, F_{c-d}); -121,9 à -121,7(m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹) :

3356, 2962, 2877, 1469, 1382, 1189, 1140, 1001, 735, 690, 651, 545.

38b Acide 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-hexylhexadécanoïque



C₂₂H₃₂F₁₂O₂
MM : 556,47 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **38b** a été obtenu à partir de **37b** (960 mg, 1,72 mmol) en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **31a** à partir de **30'a**, c'est-à-dire une oxydation de l'alcool correspondant par le réactif de Jones. Après extraction et séchage, on obtient 861 mg (1,55 mmol) de produit avec un rendement de 80 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (CH₂Cl₂/EP 30/70)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

3,21 (t, ²J_{C-F} = 17,4 Hz, 2H, H₁₅); 2,33-2,12 (m, 1H, H₈); 1,86-1,21 (m, 22H, H₂₋₇, H₉₋₁₃); 0,90 (t, ³J₁₋₂ = ³J₁₈₋₁₇ = 6 Hz, 6H, H₁, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

168,61 (C₁₆); 41,20 (t, ²J_{C-F} = 20 Hz, C₈); 36,7 (t, ²J_{C-F} = 23 Hz, C₁₅); 31,80-31,60 (C₃, C₁₂); 29,8-28,6 (C₄₋₆, C₁₀₋₁₂); 26,87-26,62 (C₉, C₇); 22,63 (C₂, C₁₃); 14,01 (C₁, C₁₄).

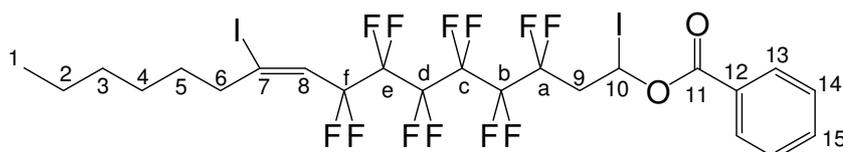
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-111,6 à -111,4 (m, 4F, F_a, F_f); -118,6 à -118,4 (m, 2F, F_b); -119,9 à -119,6 (m, 4F, F_c, F_d); -121,6 à -121,4 (m, 2F, F_e).

IR v (cm⁻¹) :

3853, 3733, 3688, 3675, 3648, 2958, 2926, 2859, 2359, 2340, 2186, 1731, 1468, 1409, 1196, 1141, 1077, 891, 694, 621.

39 Benzoate de (E)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-1,10-diiodohexadéc-9-enyle



C₂₃H₂₂F₁₂I₂O₂
MM : 812,21 g.mol⁻¹
Cire jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un tube scellé, on introduit 1,09 g (1,97 mmol, 1 équ) de 1,6-diiodoperfluorohexane, 440 µL (2,95 mmol, 1,5 équ) d'octyne, 410 µL (2,95 mmol, 1,5 équ) de benzoate de vinyl et 65 mg (394 µmol, 0,2 équ) d'AIBN. L'ensemble est refroidi dans de l'azote liquide et purgé plusieurs fois à l'argon (vide puis atmosphère inerte). La solution est chauffée pendant 12h à 80°C. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : EP/CH₂Cl₂ 9/1 → 7/3). On obtient ainsi 354 mg (435 µmol) d'une cire jaune, soit un rendement de 22 %. Le ratio Z/E est de 13/87 déterminé par RMN du Fluor.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (EP/CH₂Cl₂ 75/25).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

8,07 (d, 2H, ³J₁₃₋₁₄ = 7,5 Hz, H₁₃); 7,60 (t, 1H, ³J₁₄₋₁₅ = 7,5 Hz, H₁₅); 7,45 (t, 1H, ³J₁₄₋₁₅ = ³J₁₄₋₁₃ = 7,5 Hz, H₁₄); 7,33 (dd, 1H, ³J₁₀₋₉ = 10,5 Hz, ³J_{10-9'} = 2,5 Hz, H₁₀); 6,32 (t, 1H, ³J_{H-F} = 14,4 Hz, H₈); 3,69-3,10 (m, 2H, H₉); 2,63 (t, 2H, ³J₅₋₆ = 7,3 Hz, H₆); 1,64-1,51 (m, 2H, H₅); 1,45-1,21 (m, 6H, H₂₋₄); 0,90 (t, 3H, ³J₁₋₂ = 6,5 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,50 (C₁₁); 134,13 (C₁₅); 130,05 (C₁₃); 128,64 (C₁₄); 128,34 (C₁₂); 126,54 (t, ²J_{C-F} = 24,1 Hz, C₈); 122,99 (C₇); 120,0-105,0 (CF₂); 43,89 (t, ²J_{C-F} = 21,2 Hz, C₉); 41,09 (C₆); 40,92 (C₁₀); 31,42 (C₃); 29,97 (C₄); 28,06 (C₅); 22,44 (C₂); 13,97 (C₁).

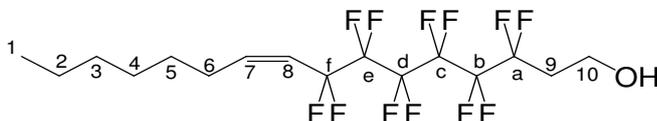
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-103,4 à -103,2 (m, 1,74F, F_{FE}); -106,5 à -106,3 (m, 0,26F, F_{FZ}); -112,8 à -112,6 (2AB, ²J_{aa'} = 273,5 Hz, ²J_{ff} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f); -109,4 à -109,2 (2AB, ²J_{aa'} = 273,5 Hz, ²J_{ff} = 273,5 Hz, 2F, F_a, F_f); -119,6 à -119,4 (m, 2F, F_b, F_e); -121,2 à -121,5 (m, 2F, F_c, F_d).

IR ν (cm^{-1}):

2958, 2931, 2860, 1745, 1633, 1602, 1453, 1375, 1341, 1317, 1255, 1243, 1196, 1141, 1102, 1081, 1058, 1024, 985, 708, 524.

40 (Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorohexadéc-9-en-1-ol



$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{F}_{12}\text{O}$
MM : 456,13 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Une solution de 3,47 g (4,27 μmol , 1 éq) de produit **39** dissous dans le THF anhydre (25 mL) est additionnée lentement sur 975 mg (25,6 mmol, 6 éq) de LAH dans du THF (60 mL) à reflux. La réaction est agitée pendant 30 min à reflux du THF, puis amenée à température ambiante. Du chlorure d'ammonium et de l'eau sont additionnés et la solution est extraite 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : EP/ CH_2Cl_2 :5/5 \rightarrow 1/9). On obtient ainsi 947 mg (2,07 mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 49 %, avec un rapport Z/E de 80/20.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ (EP/ CH_2Cl_2 2/8).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

6,53-6,30 (m, 0,2H, $\text{H}_{8\text{E}}$); 6,18-6,05 (m, 0,8H, $\text{H}_{8\text{Z}}$); 5,74-5,35 (m, 2H, H_7); 3,99 (t, $^2J_{9-10} = 3,4$ Hz, H_{10}); 2,52-2,07 (m, 4H, H_6 , H_9); 1,47-1,21 (m, 8H, H_{2-5}); 0,89 (t, $^2J_{1-2} = 6,7$ Hz, 3H, H_1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

145,35 ($\text{C}_{7\text{Z}}$); 143,11 ($\text{C}_{7\text{E}}$); 125,0-105,0 (CF_2); 116,17 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 23,3$ Hz, C_8); 55,31 (C_{10}); 33,99 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 21,3$ Hz, C_9); 31,98 (C_3); 29,01, 28,79, 28,54 (C_{4-6}); 22,51 (C_2); 13,97 (C_1).

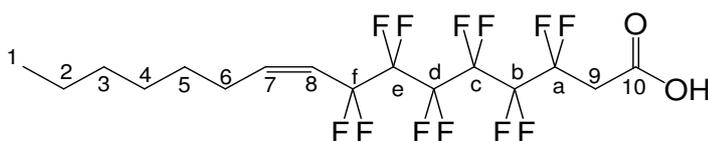
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-104,7 à -104,5 (m, 1,6F, $\text{F}_{7\text{Z}}$); -109,2 à -109,0 (m, 0,4F, $\text{F}_{7\text{E}}$); -109,2 à -109,0 (m, 2F, F_a); -119,8 à -119,5 (m, 4F, F_c , F_d); -121,9 à -121,6 (m, 4F, F_b , F_e).

IR ν (cm^{-1}):

3365, 2959, 2930, 2860, 1662, 1469, 1190, 1139, 1097, 1051, 1000, 831, 792, 737, 712, 690, 659.

41 acide (Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluorohexadéc-9-énoïque



$C_{16}H_{18}F_{12}O_2$
 MM : 470,29g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

On dissout 142,3 mg (302 μ mol, 1 \acute{e} q) d'alcool **40** dans de l'acétone (7 mL). On ajoute à cette solution le réactif de Jones (600 mg de CrO₃ dans 1,6 mL d'H₂O et 600 μ L d'H₂SO₄) au goutte à goutte à température ambiante, jusqu'à apparition d'une coloration rouge brun persistante. La solution est laissée sous agitation pendant 30 min à température ambiante, puis, la réaction est stoppée par ajout d'isopropanol. Une coloration verte apparaît. Une grande partie du solvant organique est évaporée avant l'ajout d'une solution aqueuse saturée de NaCl. La solution est extraite 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. On obtient ainsi 142 mg (293 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 99 %.

ANALYSES

RMN ¹H (CDCl₃ 300 MHz) δ (ppm) :

6,45-6,31 (m, 0,2H, H_{8E}); 6,16-6,01 (m, 0,8H, H_{8Z}); 5,74-5,35 (m, 1H, H₇); 3,21 (t, ²J_{9,10} = 17,3 Hz, 2H, H₉); 2,51-2,15 (m, 2H, H₆); 1,47-1,21 (m, 8H, H₂₋₅); 0,89 (m, 3H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

170,12 (C₁₀); 145,46 (C_{7Z}); 143,1 (C_{7E}); 125,0-105,0 (CF₂); 116,10 (t, ²J_{C-F} = 23,2 Hz, C₈); 36,71 (t, ²J_{C-F} = 22,4 Hz, C₉); 31,55 (C₃); 29,03-28,56 (C₄₋₆); 22,53 (C₂); 13,96 (C₁).

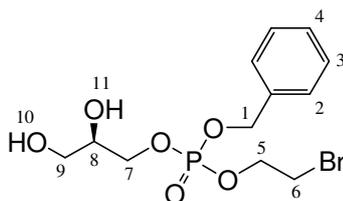
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-104,7 à -104,5 (m, 0,4F, F_Z); -109,7 à -109,8 (m, 1,6F, F_E); -109,8 à -110,0 (m, 2F, F_a); -119,7 à -119,5 (m, 4F, F_c, F_d); -121,2 à -121,0 (m, 2F, F_b); -121,9 à -121,6 (m, 2F, F_e).

IR ν (cm⁻¹):

2930, 2860, 2336, 1732, 1663, 1431, 1190, 1139, 1094, 1037, 927, 713, 621, 560.

42 Phosphate de benzyle, de 2-bromoéthyle et de (R)-2,3-dihydroxypropyle



$C_{12}H_{18}BrO_6P$
 MM : 369,15 g.mol⁻¹
 Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon, on introduit 50 mg (0,12 mmol) de produit **50** dans 3 mL d'EtOH en présence de résine échangeuse de cation (Dowex 50x8 (H⁺)). La solution est agitée la nuit à température ambiante. On filtre ensuite la résine sur fritté et on évapore le solvant. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 6/4→9/1). Ainsi on récupère 30 mg (81,3 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 67%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,3 (AcOEt/Hexane 8/2)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

7,39 (m, 5H, H₂₋₄); 5,11 (d, ³J_{H-P} = 10,5 Hz, 2H, H₁); 4,28 (m, 2H, H₅); 4,11 (m, 2H, H₇); 3,88 (m, 1H, H₈); 3,64 (m, 2H, H₉); 3,47 (t, J = 6,0 Hz, 2H, H₆); 2,98 (s, 2H, H₁₀, H₁₁);

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

135,73 (C_{Ar}); 129,3 (C₄); 129,16 (C₃); 128,6 (C₂); 70,9 (C₁); 70,5 (C₇); 69,4 (C₈); 67,5 (C₉); 63,12 (C₅); 29,8 (C₆).

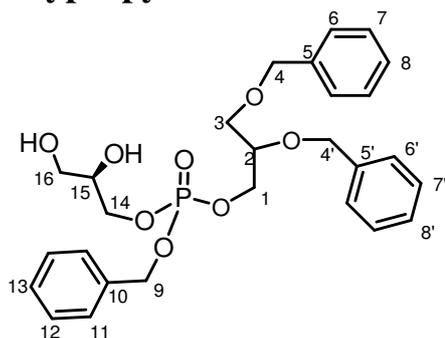
RMN ³¹P (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-0.903 (s).

IR (cm⁻¹) :

3452, 3031, 2924, 2356, 2177, 2156, 2039, 2017, 1716, 1558, 1540, 1506, 1457, 1157, 1027.

43 Phosphate de benzyle, de 2,3-bis(benzyloxy)propyle et de (R)-2,3-dihydroxypropyle



C₂₇H₃₃O₈P
MM : 516,52 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon, on introduit 50 mg (90 μmol) de produit **56** dans 3 mL d'EtOH en présence de résine échangeuse de cation (Dowex 50x8 (H⁺)). La solution est agitée la nuit à température ambiante. On filtre ensuite la résine sur fritté. Le solvant est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 6/4→9/1). Ainsi on récupère 35 mg (67,8 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 75%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (AcOEt /Hexane 8/2).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,36-7,28 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,09 (d, $^2J_{1-P} = 8,4$ Hz, 2H, H_9); 4,64 4,51 (2s, 4H, H_4 , H_4'); 4,25-3,99 (m, 5H, H_1 , H_{14} , H_{15} , H_{16}); 3,85-3,72 (m, 1H, H_2); 3,60-3,55 (m, 2H, H_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

137,75 (C_5 , C_5'); 135,53 (C_{10}); 128,58-127,51 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 76,27 (C_2); 73,39 72,18 (C_4 , C_4'); 70,46 (C_{15}); 69,59 (C_3); 68,72-68,67 (C_1 , C_{14}); 67,23 (C_9); 62,50 (C_{16}).

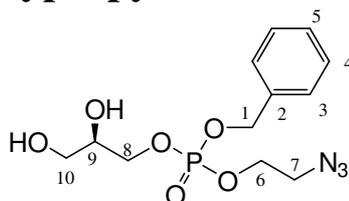
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

0,49 (s).

IR (cm^{-1}):

3395, 2868, 1496, 1454, 1251, 1100, 1108, 887, 736, 696, 597, 497, 459.

44 Phosphate de benzyle, de 2-amino-éthyle et de (R)-2,3-dihydroxypropyle



$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{P}$
MM : 331,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon, on introduit 118 mg (317 μmol) de produit **50'** dans 3 mL d'EtOH en présence de résine échangeuse de cation (Dowex 50x8 (H^+)). La solution est agitée la nuit à température ambiante. On filtre ensuite la résine sur fritté. Le solvant est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/EtOH 100/0 \rightarrow 85/15). Ainsi on récupère 68,3 mg (206 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 64%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (AcOEt /EP 6/4).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,38-7,28 (m, 5H, H_{3-5}); 5,11 (d, $^2J_{1-P} = 8,4$ Hz, 2H, H_1); 4,20 4,06 (m, 4H, H_6 , H_8); 3,90-3,55 (m, 3H, H_9 , H_{10}); 4,46-3,38 (m, 2H, H_7).

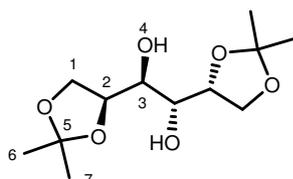
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

135,32 (C_2); 128,79 (C_5); 128,65 128,07 (C_3 , C_4); 70,51 (C_6); 69,96 (C_1); 68,85 (C_9); 66,40 (C_8); 62,65 (C_{10}); 50,73 (C_7).

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :
0,46 (s).

IR (cm^{-1}):
3385, 2957, 2926, 2857, 2360, 2108, 1727, 1456, 1380, 1267, 1121, 1036, 1019, 887,
740, 698, 596, 507.

45 **1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidène-D-mannitol**



$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6$
MM : 262,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cristaux blancs

MODE OPÉRATOIRE

Dans 200 mL d'acétone anhydre, on dissout 40,0 g (293 mmol, 2,1 éq) de ZnCl_2 à température ambiante sous forte agitation. Puis on laisse décanter cette solution afin d'en prélever le surnageant pour l'ajouter à 25 g (137 mmol, 1 éq) de D-mannitol (une coloration jaune apparaît). On laisse la réaction sous forte agitation pendant 2h 30 min à température ambiante. On filtre ensuite sur fritté afin de récupérer le mannitol (3,7 g, 20,4 mmol) n'ayant pas réagi. Le filtrat est ajouté à une solution de 100 g (137 mmol, 1 éq) de K_2CO_3 dans 100 mL d'eau et 400 mL d'éther, cette solution est agitée vigoureusement pendant une heure (le précipité redevient blanc), puis filtrée sur fritté et les laver avec 2 fois 300 mL d'éther/acétone 50/50 afin d'éliminer les sels. On effectua ensuite une recrystallisation dans 170 mL d'éther et 70 mL de dichlorométhane. On obtient ainsi 15,3 g (58,3 mmol) de produit soit un rendement de 50% par rapport au mannitol consommé.

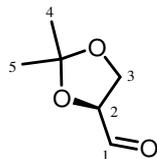
ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ (EtOH/AcOEt 1/9)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :
4,17 (m, 2H, H_3); 3,97 (m, 2H, H_2); 3,75 (t, 4H, $^3J_{1-2} = 6,0$ Hz, H_1); 2,59 (d, 2H, $^3J_{3-4} = 6,6$ Hz, H_4); 1,42 (s, 6H, H_6); 1,36 (s, 6H, H_7).

Les analyses sont conformes à celles décrites dans la littérature.¹⁵⁷

46 (R)-2,2-Diméthyl-1,3- dioxolane-4-carboxaldéhyde



C₆H₁₀O₃
MM : 130,14 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Sur 1,5 g (5,7 mmol, 1 éq) du produit 45 dissous dans 15 mL de CH₂Cl₂, ajouter 2,44 g (11,4 mmol, 2 éq) de NaIO₄ et 0,6 mL d'eau distillée. Laisser la réaction sous agitation pendant 2h à température ambiante, puis ajouter 3,0 g de MgSO₄. La solution est agitée 15 min puis filtrée sur fritté et évaporée. On obtient 1,2 g (9,2 mmol), soit 80% de rendement d'une huile incolore qui sera utilisée sans autre purification dans la réaction suivante.

ANALYSES

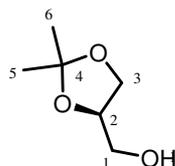
CCM : R_f = 0,3 (EtOH/AcOEt 1/9)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

4,19-4,14 (m, 2H, H₃); 4,10-3,90 (m, 1H, H₂); 3,75 (t, H, ³J₁₋₂ = 6,0 Hz, H₁); 2,59 (d, 2H, ³J₃₋₄ = 6,6 Hz, H₄); 1,42 (s, 6H, H₆); 1,36 (s, 6H, H₇).

Les analyses sont conformes à celles décrites dans la littérature.¹⁵⁷

47 ((R)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthanol



C₆H₁₂O₃
MM : 130,14 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 300 mL d'éthanol on dissout 30 g (230 mmol, 1 éq) du composé 46, on ajoute à cette solution 4,32 g (115 mmol, 0,5 éq) de NaBH₄. Après 3 heures d'agitation à température ambiante on arrête la réaction par addition de quelques gouttes d'une solution aqueuse de NH₄Cl diluée jusqu'à obtenir un pH ≈ 7. On évapore le solvant et le solide résiduel est repris dans du dichlorométhane, cette solution est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par distillation sous pression réduite (T_{eb} = 60°C, 10 mbar). On obtient 16 g (123 mmol) d'un liquide incolore, ce qui représente un rendement de 53 % pour les deux étapes à partir du composé 45.

CCM : R_f = 0,2 (Éther/hexane 75:25)
α_D = +13,5.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

4,14-4,08 (m, 1H, H₂); 3,90 (t, 1H, ²J_{3,3'} = ³J_{3,2} = 7,2 Hz, H₃); 3,63 (t, 1H, ²J_{3,3'} = ³J_{3,2} = 6,9 Hz, H_{3'}); 3,52-3,42 (m, 2H, H₁); 3,11 (s, 1H, OH); 1,30 (s, 1H, H₅); 1,23 (s, 1H, H₆).

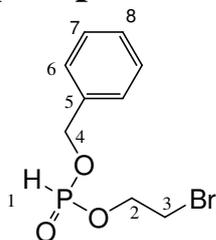
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

109,18 (C₄); 76,95 (C₂); 65,64 (C₃); 62,80 (C₁); 26,47 et 25,06 (C₅ et C₆).

IR (cm⁻¹) :

3420, 2986, 2936, 2881, 1456, 1371, 1210, 1155, 1045, 969, 839, 791, 514.

48 Hydrogénophosphite de benzyle et de 2-bromoéthyle



C₉H₁₂BrO₃P
MM : 277,97 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un bicol de 100 mL, on introduit 0,5 mL (5,73 mmol, 1 éq) de PCl₃, 1 mL (5,73 mmol, 1 éq) de diisopropyléthylamine et 10 mL de THF. On ajoute en 3h à -78°C une solution de 593 µL (5,73 mmol, 1 éq) d'alcool benzylique dans 20 mL de THF sous forte agitation. Puis on introduit un 2^{ème} équivalent de DIPEA à la seringue avant d'ajouter en 2h30 une solution de 406 µL de bromoéthanol (5,73 mmol, 1 éq) dans 20 mL de THF. La réaction est mise sous agitation pendant 1h30 à -78°C avant d'ajouter 7 mL d'eau. On laisse remonter la solution à température ambiante, puis on évapore la majorité du THF avant d'extraire 3 fois à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 50:50). On obtient ainsi 1,0 g (3,59 mmol) d'une huile jaune avec un rendement de 63%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,45 (AcOEt /hexane 60/40)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

7,36-7,28 (m, 5H, H₆₋₈); 6,95 (d, 1H, ¹J_{H-P} = 717,8 Hz, H₁); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 10,5 Hz, H₄); 4,23-4,20 (m, 2H, H₃); 3,46 (t, 2H, ³J₆₋₇ = 6,1 Hz, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

135,18 (C₄); 128,61 (C₇); 128,55 (C₆); 127,89 (C₅); 67,36 (C₃); 64,72 (C₂); 29,50 (C₁).

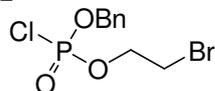
RMN ³¹P (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

8,37 (s).

IR (cm⁻¹) :

3033, 2961, 2437, 1497, 1455, 1422, 1380, 1252, 1079, 948, 853, 734, 696, 591, 571, 541, 471.

49 Chlorophosphate de benzyle et de 2-bromoéthyle

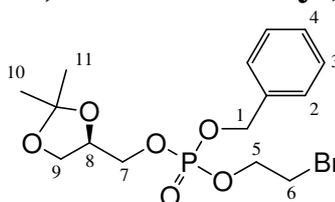


C₉H₁₁BrClO₃P
MM : 311,93 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 50 mL de CCl₄ on dissout 5 g (17,9 mmol, 1 éq) du composé **48**. À cette solution on ajoute, à 0°C, 4,31 mL (53,9 mmol, 3 éq) de chlorure de sulfuryle. On laisse la réaction sous agitation 30 min à 0°C, puis 10 min à température ambiante. Cette solution est évaporée et reprise 2 fois dans 20 mL de toluène afin d'éliminer l'excès de réactifs. On obtient ainsi une huile incolore que l'on utilisera directement sans aucune purification dans la réaction suivante.

50 Phosphate de 2-bromoéthyle, de benzyl et de ((R)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthyle



C₁₅H₂₂BrO₆P
MM : 408,03 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

La formation du phosphate tri substitué par le bromoéthanol, le (*R*)-(-)-isopropylidène glycérol et l'alcool benzylique, nécessite préalablement la formation de l'alcoolate sodé du composé **47**. Pour cela, on introduit dans un ballon 250 mL de THF et 863 mg de NaH (60 %, 21,5 mmol, 1,2 éq), on ajoute ensuite à 0°C, 2,37 g de composé **47** (17,9 mmol, 1 éq). Puis on ajoute rapidement à cette solution, le chlorophosphate **49** (17,98 mmol, 1 éq) sous forte agitation. On laisse la réaction sous agitation 3 h à température ambiante. Puis on évapore une grande partie du THF avant de reprendre le produit dans 200 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution de NH₄Cl saturée, de l'eau et une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : éther/hexane 50:50→75:25). Ainsi on récupère 4,6 g (11,3 mmol) d'une huile jaune avec un rendement de 63%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,3 (AcOEt/Hexane 40/60)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

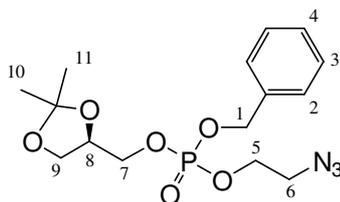
7,36 (m, 5H, H₂₋₄); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 10,5 Hz, H₁); 4,26 (m, 3H, H₅, H₈); 4,01 (m, 3H, H₇, H₉); 3,75 (m, 1H, H₉); 3,46 (t, 2H, ³J₆₋₅ = 6 Hz, H₆); 1,39 (s, 3H, H₁₁); 1,32 (s, 3H, H₁₀).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :
135,7 (C_{Ar}); 128,92 (C₃); 128,25 (C₄, C₂); 110,04 (C_{acétal}); 74,14 (C₈); 69,94 (C₁); 67,8 (m, C₅, C₇, C₉); 29,42 (C₆); 26,9 (C₁₀); 25,4 (C₁₁).

RMN ³¹P (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
-0,90 (s).

IR (cm⁻¹) :
2984, 2935, 2893, 2357, 2341, 1497, 1455, 1380, 1371, 1274, 1214, 1156, 997, 920, 884, 837, 790, 735, 696, 595, 572, 510, 493.

50' Phosphate de benzyle de 2azidoéthyle et de (R)-2,3-dihydroxypropyle



C₁₅H₂₂N₃O₆P
MM : 371,12 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un 6 ml de DMF anhydre on introduit le composé bromé **50** (500mg, 1,22mmol, 1éq) ainsi que de l'azoture de sodium, 100 mg (1,25éq, 1,54 mmol). La solution est chauffée 2h à 50°C (attention à ne pas trop chauffer la solution car on risque de cliver l'ester benzylique), puis on ajoute 15 ml d'eau distillée afin d'effectuer trois extractions à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées séchées sur MgSO₄ et concentrées. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt /hexane 50:50→75:25). Ainsi on récupère 340 mg (916 mmol) d'une huile jaune soit un rendement de 75%.

ANALYSES

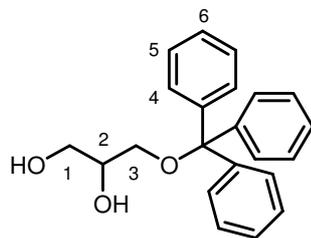
CCM : R_f = 0,30 (AcOEt /Hexane 40:60).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :
7,36 (m, 5H, H₂₋₄); 5,11 (d, 2H, ²J_{H-P} = 8,8 Hz, H₁); 4,25-3,98(m, 7H, H₆₋₉); 3,8-3,75 (m, 1H, H_{9'}); 3,43 (t, 2H, ³J₆₋₅ = 4,6 Hz, H₆); 1,39 (s, 3H, H₁₁); 1,32 (s, 3H, H₁₀)

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :
135,7 (C_{Ar}); 128,92 (C₃); 128,25 (C₄, C₂); 110,04 (C_{acétal}); 74,20 (C₈); 69,94 (C₁); 67-66 (m, C₅, C₇, C₉); 51,139 (C₆); 26,9 (C₁₀); 25,4 (C₁₁).

IR (cm⁻¹) :
3398, 2927, 2107, 1456, 1372, 1256, 1157, 1016, 839, 739, 698, 596, 512, 421.

51 3-(trityloxy)propane-1,2-diol



$C_{22}H_{22}O_3$
MM : 334,41 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 40 mL d'un mélange anhydre THF/CH₃CN 50/50, on introduit 1 g de glycérol (11,48 mmol, 1 éq), 3,20 g de chlorure de trityle (11,48 mmol, 1 éq), du DMAP (188 mg, 1,15 mmol, 0,1 éq) et 2 mL de triméthylamine (45,9 mmol, 3 éq). La réaction est agitée 2 jours à température ambiante, puis on ajoute 30 mL d'eau et on effectue une extraction à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : PE/AcOEt 95/5→5/5). On obtient 3,08 g (9,2 mmol) d'une huile incolore, soit un rendement de 80 %.

ANALYSES

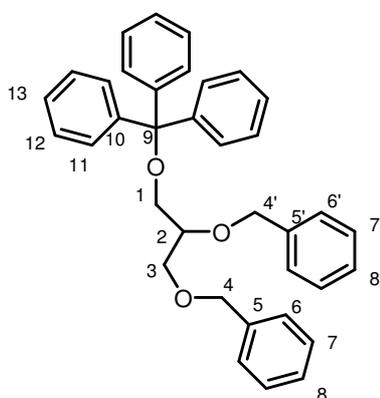
CCM : R_f = 0,2 (AcOEt/PE 5/5)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,53-7,28 (m, 25H, H₄₋₆); 3,90-3,85 (m, 1H, H₂); 3,75-3,57 (m, 2H, H₃); 3,30-3,19 (m, 2H, H₁).

Les analyses sont conformes à celles décrites dans la littérature.¹⁵⁸

52 (2,3-bis(benzyloxy)propoxy)triphenylméthane



$C_{36}H_{34}O_3$
MM : 514,25 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 15 mL de DMF on introduit le diol **51** 10 g (29,9 mmol, 1 éq), du bromure de benzyle (10,6 mL, 89,7 mmol, 3 éq) on amène le mélange à 0°C et on ajoute 3 g de NaH (74,8 mmol, 2,5 éq). On laisse la solution remonter à température ambiante pendant 4 h, puis on ajoute 30 mL d'eau et on effectue une extraction à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane/ Et₂O 90/10). On obtient 14,84 g (28,85 mmol) d'une huile incolore, soit un rendement de 96 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (Éther/hexane 1/9)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,53-7,28 (m, 25H, H₆₋₈; H_{6'-8'}; H₁₁₋₁₃); 4,72 et 4,56 (2s, 4H, H₄; H_{4'}); 3,87-3,80 (m, 1H, H₂); 3,75-3,67 (m, 2H, H₃); 3,34 (d, ²J₂₋₁ = 4,98 Hz, H₁).

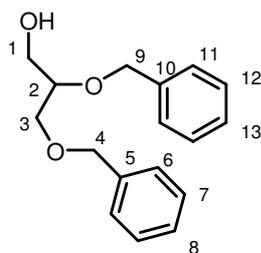
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

143,93 (C₁₀); 138,60 et 138,25 (C₅, C_{5'}); 128,62-126,80 (C₆₋₈, C_{6'-8'}, C₁₁₋₁₃); 86,53 (C₉); 77,51 (C₂); 73,14, 72,8 (C₄, C_{4'}); 70,49 (C₁); 63,51 (C₃).

IR (cm⁻¹) :

3055, 3031, 2916, 2868, 1596, 1489, 1449, 1364, 1339, 1308, 1215, 1197, 1142, 1104, 1060, 1043, 1027, 985, 924, 897, 878, 850, 775, 763, 735, 692, 548, 468, 456.

53 2,3-bis(benzyloxy)propan-1-ol



C₁₇H₂₀O₃
MM : 272,34 g.mol⁻¹
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans un mélange de MeOH (200 mL) et de THF (50 mL) on introduit 14,84 g (28,8 mmol) de composé **52** et une résine acide, (de l'Amberlyst 15Å). On laisse la réaction 2 jours à température ambiante, puis on filtre la résine sur fritté. On sèche la phase organique sur MgSO₄, on filtre et on évapore le solvant. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : hexane/ AcOEt 90/10→5/5). On obtient 6,8 g (24,9 mmol) d'une huile incolore, ce qui représente un rendement de 88 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (PE/AcOEt 5/5)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,53-7,28 (m, 10H, H₆₋₈; H₁₁₋₁₃); 4,72 (d, 1H, ²J_{9,9'} = 11,76 Hz, H_{9'}); 4,65 (d, ²J_{9,9'} = 11,76 Hz, H₉); 3,82-3,60 (m, 5H, H₂, H₃, H₄); 2,25 (OH).

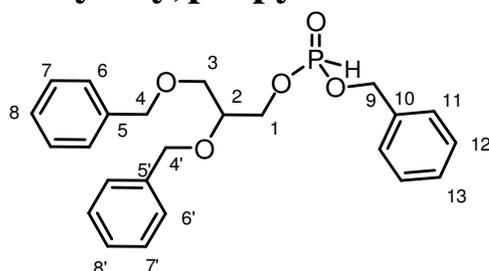
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

138,20, 137,90 (2s, C₅, C₁₀); 128,36, 127,64, 127,56 (C₆₋₈, C₁₁₋₁₃); 78,02 (C₂); 73,43, 72,7 (C₄, C₉); 70,12 (C₃); 62,75 (C₁).

IR (cm⁻¹) :

3320, 2920, 2357, 2324, 1454, 1146, 1107, 1064, 1046, 1029, 1018, 988, 766, 738, 710, 701, 689, 633, 612, 602, 551, 459.

54 hydrogenophosphite de benzyle et de 2,3-bis(benzyloxy)propyle



C₂₄H₂₇O₅P
MM : 426,44 g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans un bicol de 100 mL, on introduit 0,5 mL (5,73 mmol, 1 éq) de PCl₃, 1 mL (5,73 mmol, 1 éq) de diisopropylethylamine et 10 mL de THF. Sous forte agitation, on ajoute en 3h à -78°C 593 µL (5,73 mmol, 1 éq) d'alcool benzylique dans 20 mL de THF, puis on introduit un 2^{ème} équivalent de DIPEA avant d'ajouter en 2h30 le composé **53** 1,560 g (5,73 mmol, 1 éq) dans 20 mL de THF. La réaction est laissée sous agitation pendant 1h30 à -78°C avant d'y ajouter 7 mL d'eau. On laisse la solution remonter à température ambiante et on évapore la majorité du THF afin d'extraire 3 fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, Filtrées et concentrées. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 2:8). On obtient ainsi 1,5 g (3,51mmol) d'une huile jaune soit un rendement de 62%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (AcOEt /Hexane 3/7).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,36 (m, 15H, H₆₋₈, H_{6'-8'}, H₁₁₋₁₃); 6,96 et 6,94 (2d, 1H, ¹J_{H-P} = 708 Hz, H₁, H_{1'}); 5,04 (d, 2H, ²J_{1-P} = 9 Hz, H₉); 4,61 et 4,50 (2s, 4H, H₄, H_{4'}); 4,25-4,06 (m, 2H, H₁); 3,85-3,75 (m, 1H, H₂); 3,56 (d, ²J_{2,3} = 5 Hz, H₃).

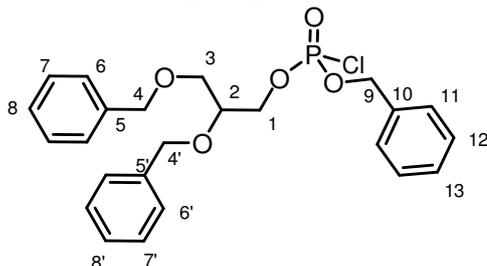
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

137,73 (C₅, C_{5'}); 135,53 (C₁₀); 128,43-127,4 (C₆₋₈, C_{6'-8'}, C₁₁₋₁₃); 76,32 (C₂); 73,26 71,98 (C₄, C_{4'}); 68,63 (C₃); 66,83 (C₉); 64,93 (C₁).

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :
9,23; 8,98 (2s, P,P').

IR (cm^{-1}):
3031, 2862, 1496, 1454, 1380, 1350, 1255, 1212, 1100, 1045, 1026, 958, 845, 733,
695, 592, 536, 461.

55 Chlorophosphate de benzyle et de 2,3-bis(benzyloxy)propyle

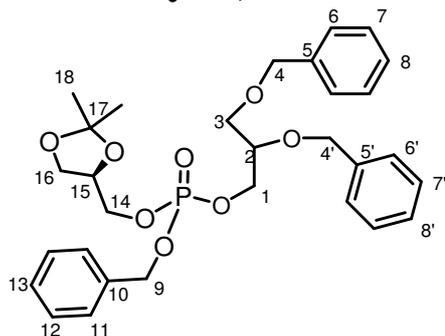


$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClO}_5\text{P}$
MM : 460,89 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 50 mL de CCl_4 , on dissout 5 g (10,8 mmol, 1 éq) du composé **54**, on ajoute à 0°C , 2,6 mL (32,5 mmol, 3 éq) de chlorure de sulfuryle. La réaction est laissée sous agitation 30 min à 0°C , puis 10 min à température ambiante. Cette solution est évaporée et reprise 2 fois dans 10 mL de toluène afin d'éliminer l'excès de réactifs. On obtient ainsi une huile incolore que l'on va utiliser directement sans aucune purification dans la réaction suivante.

56 Phosphate de benzyle, de 2,3-bis(benzyloxy)propyle et de (*R*)-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yle



$\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{P}$
MM : 556,58 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

La formation du composé **56** nécessite préalablement la formation de l'alcoolate sodé du composé **47**. Pour cela, on introduit dans un ballon 250 mL de THF et 863 mg de NaH (60 %, 21,5 mmol, 1,2 éq), on ajoute ensuite à 0°C , 2,37 g de composé **47** (17,9 mmol, 1 éq), puis on ajoute rapidement à cette solution, le chlorophosphate **55** (17,98 mmol, 1 éq) sous forte agitation. On laisse la réaction pendant 3h à température ambiante, puis on évapore une grande partie du THF afin de reprendre le produit dans 200 mL d'acétate d'éthyle. On lave la phase organique avec une solution de NH_4Cl saturée, de l'eau et une solution aqueuse de

NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/hexane 10/90→70/30). Ainsi on récupère 6,47 g (11,6 mmol) d'une huile jaune avec un rendement de 65%.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (AcOEt /Hexane 4/6).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,36 (m, 15H, H₅₋₇, H_{5'-7'}, H₁₁₋₁₃); 5,07 (d, 2H, ²J_{I-P} = 8 Hz, H₉); 4,65 et 4,53 (2s, 4H, H₄, H_{4'}); 4,25-3,90(m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆); 3,80-3,70 (m, 1H, H₂); 3,60-3,55 (m, 2H, H₃) 1,39 et 1,33(2s, 6H, H₁₈, H_{18'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) :

137,73 (C₅, C_{5'}); 135,53 (C₁₀); 128,43-127,4 (C₆₋₈, C_{6'-8'}, C₁₁₋₁₃); 109,57 (C₁₇); 76,32 (C₂); 73,81 (C₁₅); 73,21 71,98 (C₄, C_{4'}); 69,26 (C₉) 68,76 (C₃); 67,36 (C₁); 66,93(C₁₄); 65,79 (C₁₆); 26,51 (C₁₉); 25,06 (C₁₈).

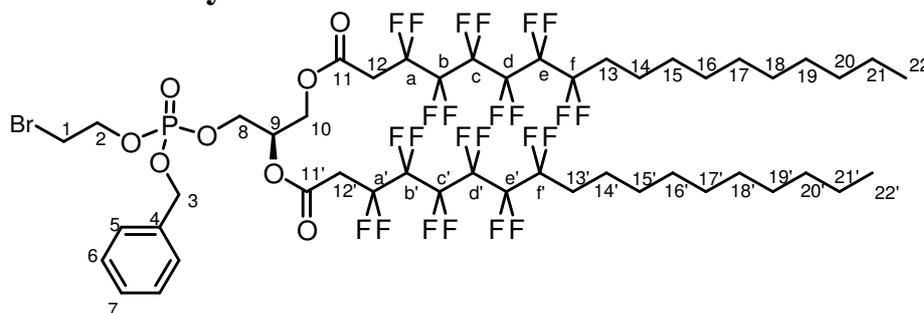
RMN ³¹P (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-0,63 (s).

IR (cm⁻¹):

3033, 2924, 2854, 2342, 1496, 1454, 1371, 1281, 1213, 1096, 1016, 886, 841, 738, 697, 596, 513, 404.

57a 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécanoate de 2-[benzyloxy-(2-bromo-éthoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécanoyloxyméthyl)-éthyle



C₄₈H₆₂BrF₂₄O₈P
MM : 1333,84g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

À 473 mg (941 μmol, 2,2 éq) d'acide **31a** dans 10 mL de CH₂Cl₂, on introduit 405 μL (4,7 mmol, 11 éq) de chlorure d'oxalyle et 1μL de DMF. La réaction est laissée 3h à température ambiante, puis le solvant est évaporé et le chlorure d'acide repris 3 fois dans du toluène anhydre. Le chlorure d'acide en solution dans 3 mL de CH₂Cl₂ est additionné à une solution de 5 mL de THF et 2 mL de CH₂Cl₂ contenant 158 mg (428 μL, 1 éq) de diol **50**, ainsi que 70 μL de Pyridine anhydre (855 μmol, 2 éq). La réaction est agitée 3h30 à température ambiante, puis on ajoute 10 mL d'une solution saturée de NH₄Cl. Cette solution est extraite 3 fois à l'éther, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le résidu est adsorbé sur silice et le produit purifié par chromatographie (éluant : AcOEt/CH₂Cl₂/EP

20/25/50→60/40/0). On obtient ainsi 302 mg (226 μmol) d'une huile jaune, soit un rendement de 53 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (AcOEt/CH₂Cl₂/EP 25/25/50).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,38 (m, 5H, H₅₋₇); 5,38-5,23 (m, 1H, H₉); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 9,2 Hz, H₃); 4,51-4,15 (m, 6H, H₂, H₈, H₁₀); 3,47 (t, 2H, ³J_{I-2} = 6,0 Hz, H₁); 3,14 (t, 4H, ³J_{H-F} = 17,3 Hz, H₁₂, H_{12'}); 2,15-1,90 (m, 4H, H₁₃, H_{13'}); 1,64-1,55 (m, 4H, H₁₄, H_{14'}); 1,35-1,20 (m, 28H, H₁₅₋₂₁, H_{15'-21'}); 0,89 (t, 6H, ³J₂₁₋₂₂ = ³J_{21'-22'} = 6,6 Hz, H₂₂, H_{22'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,45 et 163,14 (2s, C₁₁, C_{11'}); 135,27 (C₄); 128,91 (C₇); 128,72 (C₆); 128,14 (C₅); 125-100 (CF₂); 70,61 (d, ²J_{C-P} = 6,3 Hz, C₃); 70,06 (d, ²J_{C-P} = 5,6 Hz, C₈); 67,00 (C₉); 64,76 (C₁₀); 62,63 (C₂); 37,25-36,40 (m, C₁₂, C_{12'}); 31,85 (C₂₀, C_{20'}); 30,90 (t, ²J₃ = 21,7 Hz, C₁₃, C_{13'}); 29,50-28,95 (m, C₁, C₁₅₋₁₉, C_{15-19'}); 22,64 (C₂₁, C_{21'}); 20,07 (C₁₄, C_{14'}); 14,06 (C₂₂, C_{22'}).

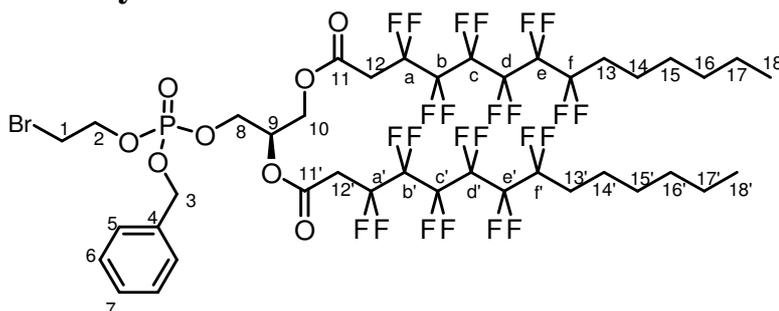
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-112,1 à -112,3 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -114,9 à -115,1 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -122,2 à -122,5 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -123,5 à -123,7 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -124,1 à -124,3 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz) δ (ppm) :

-1,9 (s).

57b (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-tétradécanoate de 2-[benzyloxy-(2-bromo-éthoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-tétradécanoyloxyméthyl)-éthyle



C₄₀H₄₆BrF₂₄O₈P
MM : 1221,63g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **57b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **57a** à partir de l'acide **31b** (418 mg, 941 μmol , 2,2 équ) et le diol de départ **42** (74 mg, 135 μmol , 1 équ). Après purification, on isole 63 mg (51 μmol) de notre produit sous forme d'une huile jaune, soit un rendement de 37 %, on isole également 25 mg (32 μmol , 24 %) d'un composé monoestérifié non identifié.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE } 50/50$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,38 (m, 5H, H_{5-7}); 5,38-5,23 (m, 1H, H_9); 5,11 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 9,2$ Hz, H_3); 4,51-4,15 (m, 6H, $\text{H}_2, \text{H}_8, \text{H}_{10}$); 3,47 (t, 2H, $^3J_{\text{I-2}} = 6,0$ Hz, H_1); 3,14 (t, 4H, $^3J_{\text{H-F}} = 17,3$ Hz, $\text{H}_{12}, \text{H}_{12'}$); 2,15-1,90 (m, 4H, $\text{H}_{13}, \text{H}_{13'}$); 1,64-1,52 (m, 4H, $\text{H}_{14}, \text{H}_{14'}$); 1,39-1,20 (m, 12H, $\text{H}_{15-17}, \text{H}_{15'-17'}$); 0,89 (t, 6H, $^3J_{21-22} = ^3J_{21'-22'} = 6,7$ Hz, $\text{H}_{18}, \text{H}_{18'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

163,43 et 163,15 (2s, $\text{C}_{11}, \text{C}_{11'}$); 135,30 (C_4); 128,89 (C_7); 128,69 (C_6); 128,12 (C_5); 125-100 (CF_2); 70,61 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6,3$ Hz, C_3); 70,04 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5,6$ Hz, C_8); 67,00 (C_9); 64,80 (C_{10}); 62,59 (C_2); 37,18-36,35 (m, $\text{C}_{12}, \text{C}_{12'}$); 31,34 ($\text{C}_{16}, \text{C}_{16'}$); 30,87 (t, $^2J_3 = 21,7$ Hz, $\text{C}_{13}, \text{C}_{13'}$); 29,25 (C_1); 28,72 (m, $\text{C}_{15}, \text{C}_{15'}$); 22,35 ($\text{C}_{17}, \text{C}_{17'}$); 20,01 ($\text{C}_{14}, \text{C}_{14'}$); 13,86 ($\text{C}_{18}, \text{C}_{18'}$).

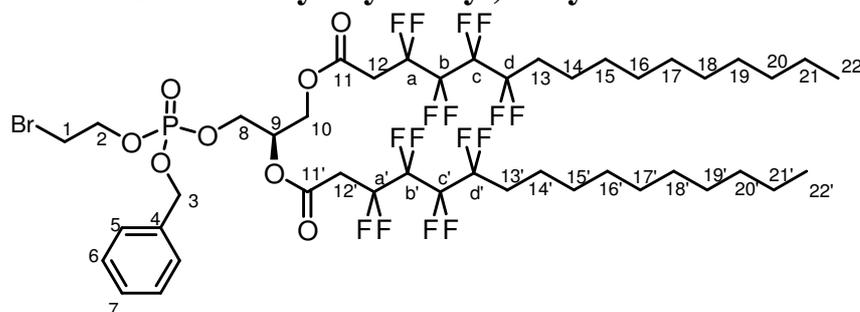
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-108,6 à -108,8 (m, 4F, F_a, F_a'); -111,3 à -111,6 (m, 4F, F_f, F_f'); -118,7 à -118,9 (m, 8F, $\text{F}_c, \text{F}_c', \text{F}_d, \text{F}_d'$); -120,0 à -120,1 (m, 4F, F_b, F_b'); -120,6 à -120,7 (m, 4F, F_e, F_e').

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,97 (s).

57c (3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluoro-hexadécanoïate de 2-[benzyloxy-(2-bromo-éthoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hexadécanyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{BrF}_{16}\text{O}_8\text{P}$
MM : 1133,81 g.mol $^{-1}$
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **57c** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **57a** à partir de l'acide **31c** (400 mg, 999 μmol , 3 éq) et le diol de départ **42** (123 mg, 336 μmol , 1 éq). Après purification, on isole 380 mg (333 μmol) de notre produit qui est une huile jaune, soit un rendement de 98 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EP } 50/50$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,38 (m, 5H, H₅₋₇); 5,38-5,23 (m, 1H, H₉); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 9,2 Hz, H₃); 4,51-4,15 (m, 6H, H₂, H₈, H₁₀); 3,47 (t, 2H, ³J_{I-2} = 6,1 Hz, H₁); 3,14 (t, 4H, ³J_{H-F} = 17,3 Hz, H₁₂, H_{12'}); 2,15-1,90 (m, 4H, H₁₃, H_{13'}); 1,64-1,52 (m, 4H, H₁₄, H_{14'}); 1,35-1,20 (m, 28H, H₁₅₋₂₁, H_{15'-21'}); 0,89 (t, 6H, ³J₂₁₋₂₂ = ³J_{21'-22'} = 6,6 Hz, H₂₂, H_{22'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,73 et 163,45 (2s, C₁₁, C_{11'}); 136,14 (C₄); 128,91 (C₇); 128,71 (C₆); 128,13 (C₅); 125-100 (CF₂); 70,61 (d, ²J_{C-P} = 7,8 Hz, C₃); 70,08 (d, ²J_{C-P} = 5,1 Hz, C₈); 67,00 (C₉); 64,76 (C₁₀); 62,49 (C₂); 36,86 (t, ²J_{C-F} = 23,54 Hz, C₁₂, C_{12'}); 31,86 (C₂₀, C_{20'}); 30,86 (t, ²J₃ = 22,4 Hz, C₁₃, C_{13'}); 29,50-28,95 (m, C₁, C₁₅₋₁₉, C_{15'-19'}); 22,64 (C₂₁, C_{21'}); 20,09 (C₁₄, C_{14'}); 14,08 (C₂₂, C_{22'}).

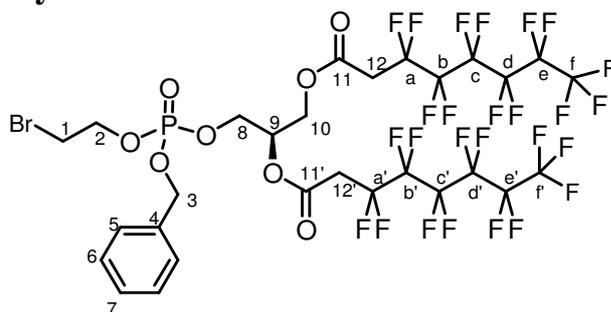
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-113,6 à -113,9 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -116,3 à -116,6 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -125,1 à -125,5 (m, 8F, F_b, F_{b'}, F_c, F_{c'}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 81 MHz) δ (ppm) :

-1,14 (s).

57d **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécanoate** **de** **2-**
[benzyloxy-(2-bromo-éthoxy)-phosphoryloxy]-1-
(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécanoyloxyméthyl)-
éthyle



C₂₈H₂₀BrF₂₆O₈P
MM : 1089,29g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **57d** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **57a** à partir de l'acide **31d** (500 mg, 1,32 mmol, 3 éq) et le diol de départ **42** (162 mg, 438 μmol, 1 éq). Après purification, on isole 390 mg (358 μmol) de notre produit qui est une huile jaune, soit un rendement de 81 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (AcOEt/EP 50/50).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,38 (m, 5H, H₅₋₇); 5,38-5,23 (m, 1H, H₉); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 9,2 Hz, H₃); 4,54-4,10 (m, 6H, H₂, H₈, H₁₀); 3,47 (t, 2H, ³J_{I-2} = 5,9 Hz, H₁); 3,15 (t, 4H, ³J_{H-F} = 17,4 Hz, H₁₂, H_{12'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,28 et 163,03 (2s, C₁₁, C_{11'}); 135,25 (C₄); 128,97 (C₇); 128,74 (C₆); 128,15 (C₅); 125-100 (CF₂); 70,65 (d, ²J_{C-P} = 7,5 Hz, C₃); 70,17 (d, ²J_{C-P} = 5,6 Hz, C₉); 67,00 (d, ²J_{C-P} = 5,1 Hz, C₈); 64,80 (C₁₀); 62,70 (C₂); 36,65 (t, ³J_{C-F} = 22,5 Hz, C₁₂) 29,67 (C₁) 36,65 (t, ²J_{C-F} = 23,54 Hz, C₁₂, C_{12'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :

-78,7 à -78,2 (m, 3F, F_f, F_{f'}); -109,6 à -110,1 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -119,7 à -119,8 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -120,8 à -120,9 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -124,0 à -124,2 (m, 4F, F_b, F_{b'}).

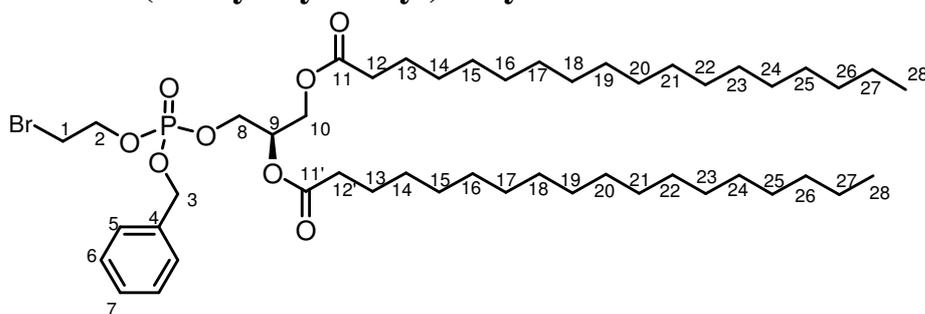
RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz) δ (ppm) :

-0,95 (s).

IR ν (cm⁻¹):

2958, 1750, 1352, 1231, 1190, 1142, 1121, 1020, 849, 810, 745, 736, 723, 708, 630, 561, 528.

58 stéarate de 2-[benzyloxy-(2-bromo-éthoxy)-phosphoryloxy]-1-(stéaryloxyméthyl)-éthyle



C₄₈H₈₆BrO₈P
MM : 902,07g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

Dans 1 mL de THF anhydre, on introduit 100 mg (351 μmol, 2 éq) d'acide stéarique, du diol **42** (65 mg, 176 μmol, 1 éq), 91 mg (440 μmol, 2,5 éq) de DCC et une quantité catalytique de DMAP. La réaction est agitée à température ambiante la nuit. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution saturée de NH₄Cl et on effectue 3 extractions au CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/PE 5/95→8/2). On obtient ainsi 50 mg (55 μmol) d'une huile jaune, soit un rendement de 31 %.

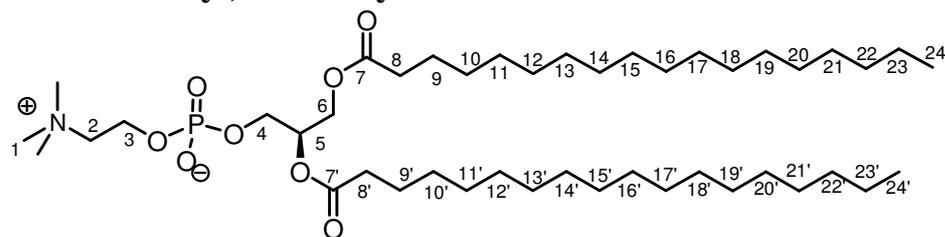
ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (AcOEt/EP 60/40).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,38 (m, 5H, H₅₋₇); 5,28-5,23 (m, 1H, H₉); 5,11 (d, 2H, ³J_{H-P} = 9,2 Hz, H₃); 4,35-4,10 (m, 6H, H₂, H₈, H₁₀); 3,47 (t, 2H, ³J_{I-2} = 6,0 Hz, H₁); 2,30 (t, 4H, ³J_{I2-13} = ³J_{I2'-13'} = 6,5 Hz, H₁₂, H_{12'}); 1,85-1,45 (m, 4H, H₁₃, H_{13'}); 1,35-1,20 (m, 56H, H₁₄₋₂₇, H_{14'-27'}); 0,89 (m, 6H, H₂₂, H_{22'}).

59 (2-{{2,3-Bis-(stéaryloxy)-propoxy}-hydroxy-phosphoryloxy}-éthyl)-triméthyl-ammonium



C₄₄H₆₂F₂₂NO₈P
MM : 1181,9 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

À partir de 15 mg (16,6 µmol, 1 éq) de composé **58** en solution dans 1 mL de CH₃CN anhydre, dans un tube scellé on introduit 60 µL (115 µmol, 7 éq) de triméthyle amine anhydre (2M, dans THF). La réaction est agitée 3 jours à température ambiante, puis le solvant est évaporé, le résidu obtenu est adsorbé sur silice et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CHCl₃/MeOH/H₂O 100/0/0→60/40/0→10/6/1). On récupère ainsi 9,8 mg (12,4 µmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 75%.

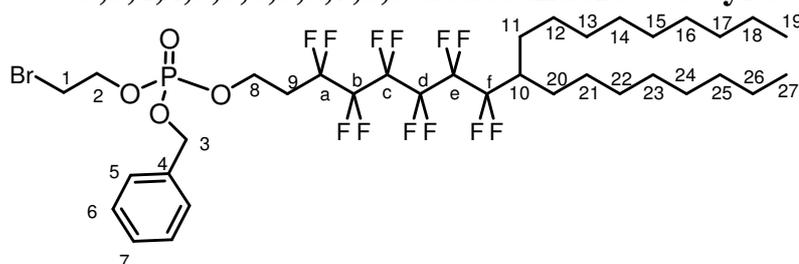
ANALYSES

CCM : R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 1/1, 300 MHz) δ (ppm) :

5,19-5,16(m, 1H, H₅); 4,45-3,90 (m, 6H, H₃, H₄, H₆); 3,60-3,45 (m, 2H, H₂); 3,18 (s, 9H, H₁); 2,34-2,20 (m, 4H, H₈, H₈); 1,65-1,45 (m, 4H, H₉, H₉); 1,35-1,10 (m, 56H, H₁₀₋₂₃, H_{10'-23'}); 0,83 (t, ³J₂₃₋₂₄ = ³J_{23'-24'} = 6,7 Hz, 6H, H₂₄, H_{24'}).

60 Phosphate de benzyle, de 2-bromo-éthyle et de 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-octyl-octadécyle



C₃₅H₅₂BrF₁₂O₄P
MM : 875,64g.mol⁻¹
Huile jaune

MODE OPÉRATOIRE

A une solution de 234 mg (390 µmol, 1 éq) d'alcool **37c** dilué dans 2 mL de THF anhydre, on ajoute à 0°C 17 mg (429µmol, 1,1 éq) de NaH. Cette réaction est placée sous agitation 1heure à température ambiante, puis canulée sur une solution de 2 mL de CH₂Cl₂ contenant 121 mg (390 µmol, 1 éq) de chlorophosphate **49**. La réaction est placée sous agitation 50 min à température ambiante, puis on ajoute 3 mL d'une solution de NH₄Cl saturée. Le produit est extrait 3 fois à l'éther, séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. Le résidu est adsorbé sur silice et le produit purifié par chromatographie (éluant : AcOEt/EP 10/90→30/70). On obtient ainsi 103 mg (117 µmol) d'une huile jaune, soit un rendement de 30 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ (EP/AcOEt 25/75).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,42-7,35 (m, 5H, H_{5-7}); 5,13 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 9,1$ Hz, H_3); 4,34-4,25 (m, 4H, H_1 et H_8); 3,48 (t, 2H, $^3J_{1-2} = 6,21$ Hz, H_2); 2,52-2,41 (m, 2H, H_9); 1,72-1,25 (m, 29H, H_{10-18} et H_{20-26}); 0,95-0,85 (m, 6H, H_{19} et H_{27}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

135,38 (C_4); 128,83 (C_7); 128,66 (C_5); 128,15 (C_6); 125,00-105,00 (CF_2); 69,96 (C_3); 66,80 (C_2); 59,88 (C_8); 41,14 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 20,35$ Hz, C_{10}); 32,34 (C_9); 32,05 (C_{16} , C_{25}); 29,72-29,25 (m, C_1 , C_{12-15} , C_{20-24}); 26,84 (C_{11} , C_{19}); 22,63 (C_{17} , C_{26}); 14,04 (C_{18} , C_{27}).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-111,3 à -111,8 (m, 4F, F_a , F_f); -118,4 à -118,5 (m, 2F, F_e); -119,6 à -119,9 (m, 4F, F_c , F_d); -121,6 à -121,8 (m, 2F, F_b).

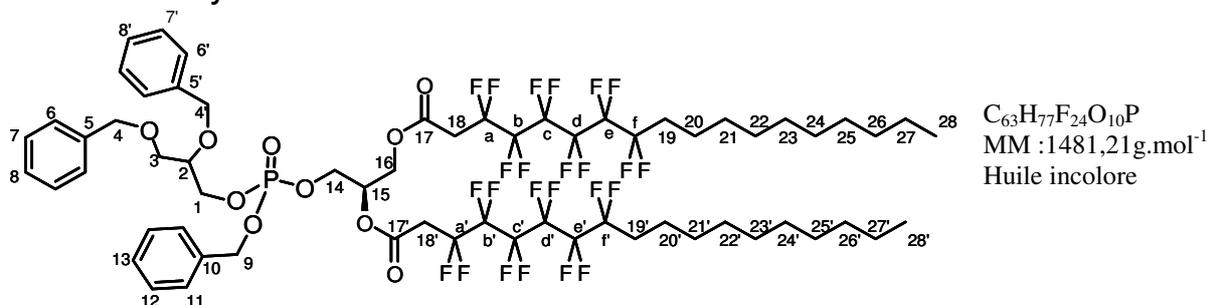
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,605 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2925, 2857, 2359, 1460, 1278, 1194, 1141, 1015, 735, 696, 513.

61a 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro octadécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro octadécanoyloxyméthyl)-éthyle



MODE OPÉRATOIRE

À 200 mg de composé **31a** (0,40 mmol, 3 éq) dans 5 mL de CH_2Cl_2 anhydre, on ajoute à température ambiante, 103 μL de chlorure d'oxalyle (1,20 mmol, 9 éq) et une quantité catalytique de DMF anhydre (1 μL). La réaction est laissée 4 h à température ambiante, puis on évapore 3 fois le chlorure d'acide dans du toluène avant de le reprendre dans 2 mL de CH_2Cl_2 anhydre. À cette solution, on ajoute la tête polaire **43** (68,8 mg, 0,13 mmol) (préalablement évaporée 3 fois dans du toluène pour éliminer toute trace d'eau) dans 2 mL de THF. On ajoute ensuite 32 μL de pyridine anhydre (1,20 mmol, 9 éq) et on laisse à température ambiante 3 h. On hydrolyse le milieu réactionnel par ajout de 10 μL d'une solution saturée de NH_4Cl et on extrait 3 fois avec CH_2Cl_2 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice

(éluant : AcOEt/PE 5/95→8/2). On obtient ainsi 170 mg (114,77 mmol) d'une huile incolore, soit un rendement de 85 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (AcOEt /PE : 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

7,34-7,30 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,32-5,18 (m, 1H, H_{15}); 5,06 (d, 2H, $^3J_{P-H} = 8,8$ Hz, H_9); 4,64 (s, 2H, H_4); 4,52 (s, 2H, H_4); 4,30-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,85-3,72 (m, 1H, H_2); 3,57 (d, 2H, $^3J_{2-3} = 4,8$ Hz, H_3); 3,11 (t, 4H, $^3J_{H-F} = 17,4$ Hz, H_{18} , $\text{H}_{18'}$); 2,20-1,90 (m, 4H, H_{19} , $\text{H}_{19'}$); 1,70-1,50 (m, H_{20} , $\text{H}_{20'}$); 1,30-1,20 (m, 28H, H_{21-27} , $\text{H}_{21'-27'}$); 0,89 (t, 6H, $^3J_{27-28} = ^3J_{27'-28'} = 6,6$ Hz, H_{28} , $\text{H}_{28'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

163,46; 163,19 (C_{17} , $\text{C}_{17'}$); 137,79 (C_5 , $\text{C}_{5'}$); 135,53 (C_{10}); 128,77-127,5 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 120-106 (CF_2); 76,28 (C_2); 73,41; 72,19 (C_4 , $\text{C}_{4'}$); 69,26 (C_9); 69,87 (C_{15}); 68,62 (C_3); 67,51 (C_1); 66,93 (C_{14}); 65,59 (C_{16}); 36,74-36,62 (m, 2C, C_{18} , $\text{C}_{18'}$); 31,86 (C_{26} , $\text{C}_{26'}$); 30,87 (t, $^2J_{C-F} = 22,5$ Hz, C_{19} , $\text{C}_{19'}$); 29,68-29,09 (C_{21-25} , $\text{C}_{21'-25'}$); 22,65 (C_{27} , $\text{C}_{27'}$); 20,07 (C_{20} , $\text{C}_{20'}$); 14,07 (C_{28} , $\text{C}_{28'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-109,6 à -109,8 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_f , $\text{F}_{f'}$); -119,8 à -120,0 (m, 8F, F_c , $\text{F}_{c'}$, F_d , $\text{F}_{d'}$); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b , $\text{F}_{b'}$); -121,6 à -121,8 (m, 4F, F_e , $\text{F}_{e'}$).

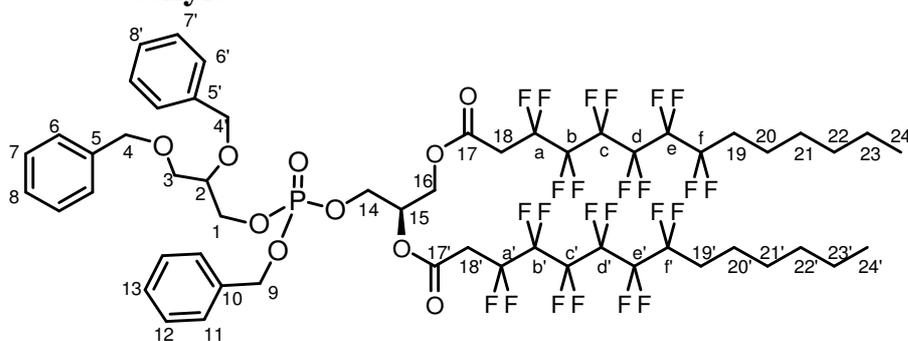
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,70 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2925, 2856, 2359, 2341, 1757, 1456, 1380, 1190, 1138, 1103, 1021, 888, 737, 696, 668, 626, 542, 518.

61b 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro tétradécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro tétradécanoyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{55}\text{H}_{61}\text{F}_{24}\text{O}_{10}\text{P}$
MM : 1369,0 g.mol $^{-1}$
Huile Jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **61b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **61a** à partir de l'acide **31b** (200 mg, 399 μmol , 2,5 éq) et le diol **43** (82,4 mg, 159 μmol , 1 éq). On obtient ainsi 174 mg (127 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 80 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ (AcOEt /PE 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,36-7,30 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,30-5,20 (m, 1H, H_{15}); 5,07 (d, 2H, $^3J_{P-H} = 8,8$ Hz, H_9); 4,65 et 4,53 (2s, 4H, H_4 , $\text{H}_{4'}$); 4,37-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,85-3,75 (m, 1H, H_2); 3,65-3,45 (m, 2H, H_3); 3,12 (t, 4H, $^3J_{H-F} = 16,7$ Hz, H_{18} , $\text{H}_{18'}$); 2,08-2,03 (m, 4H, H_{19} , $\text{H}_{19'}$); 1,61 (m, H_{20} , $\text{H}_{20'}$); 1,39-1,32 (m, 12H, H_{21-23} , $\text{H}_{21'-23'}$); 0,92 (t, 6H, $^3J_{27-28} = ^3J_{27'-28'} = 6,6$ Hz, H_{28} , $\text{H}_{28'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

163,41 et 163,13 (C_4 , $\text{C}_{4'}$); 137,84 (C_5 , $\text{C}_{5'}$); 135,40 (C_{10}); 128,7-127,6 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 118,44-107,16 (m, CF_2); 76,33 (C_2); 73,40 et 72,17 (C_{15} et $\text{C}_{15'}$); 70,64 (C_9); 69,79 (C_{15}); 68,66 (C_3); 67,42 (C_1); 64,65 (C_{14}); 62,59 (C_{16}); 36,73-36,61 (m, C_{18} , $\text{C}_{18'}$); 31,34 (C_{22} , $\text{C}_{22'}$); 30,86 (t, $^2J_{CF} = 22,3$ Hz, C_{19} , $\text{C}_{19'}$); 28,71 (C_{21} , $\text{C}_{21'}$); 22,35 (C_{23} , $\text{C}_{23'}$); 20,0 (C_{20} , $\text{C}_{20'}$); 13,86 (C_{24} , $\text{C}_{24'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-109,6 à -110,0 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_f , F_f); -119,7 à -119,9 (m, 8F, F_c , F_c' , F_d , F_d'); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b , F_b'); -121,6 à -121,8 (m, 4F, F_e , F_e').

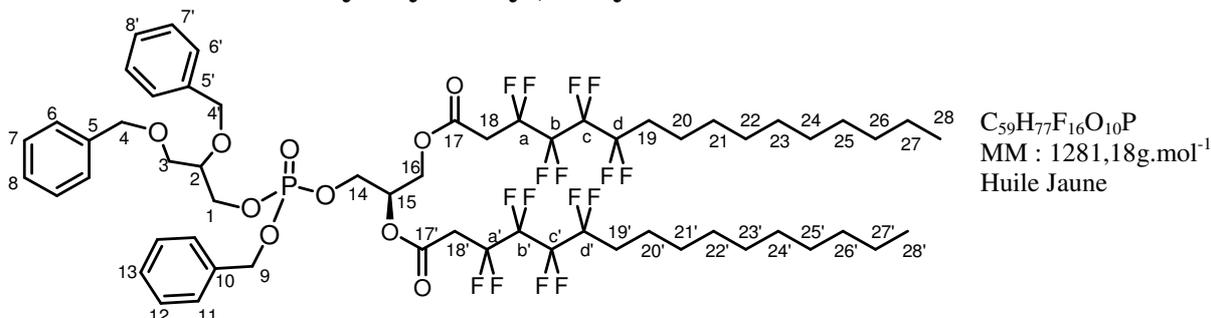
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,59 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2925, 2860, 1758, 1497, 1455, 1381, 1263, 1189, 1138, 1015, 883, 736, 696, 627, 542, 517.

61c 3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluoro hexadécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hexadécanyloxyméthyl)-éthyle



MODE OPÉRATOIRE

Le composé **61c** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **61a** à partir de l'acide **31c** (226 mg, 564 μmol , 2,5 éq) et le diol **43** (116 mg, 225 μmol , 1 éq). On obtient ainsi 240 mg (187 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 83 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ (AcOEt /PE 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

7,34-7,30 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,24 (m, 1H, H_{15}); 5,06 (d, 2H, $^3J_{P-H} = 8,8\text{Hz}$, H_9); 4,64 (s, 2H, H_4); 4,52 (s, 2H, H_4); 4,30-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,85 3,75(m, 1H, H_2); 3,57 (d, 2H, $^3J_{2-3} = 4,8\text{Hz}$, H_3); 3,11 (t, 4H, $^3J_{H-F} = 17,4\text{Hz}$, H_{18} , $\text{H}_{18'}$); 2,20-1,90 (m, 4H, H_{19} , $\text{H}_{19'}$); 1,70-1,50 (m, H_{20} , $\text{H}_{20'}$); 1,30-1,20 (m, 28H, H_{21-27} , $\text{H}_{21'-27'}$); 0,89 (t, 6H, $^3J_{27-28} = ^3J_{27'-28'} = 6,6\text{Hz}$, H_{28} , $\text{H}_{28'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

163,68 et 163,40 (C_{17} , $\text{C}_{17'}$); 137,92 (C_5 , $\text{C}_{5'}$); 135,44 (C_{10}); 128,77-127,5 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 120-106 (CF_2); 76,34 (C_2); 73,41 et 72,19 (C_4 , C_4'); 70,54 (C_9); 69,77 (C_{15}); 68,74 (C_3); 67,43 (C_1); 64,71 (C_{14}); 62,53 (C_{16}); 37,2-36,5 (m, 2C, C_{18} , $\text{C}_{18'}$); 31,86 (C_{26} , $\text{C}_{26'}$); 30,88 (t, $^2J_2 = 22,5\text{Hz}$, C_{19} , $\text{C}_{19'}$); 29,49-29,09 (C_{21-25} , $\text{C}_{21'-25'}$); 22,65 (C_{27} , $\text{C}_{27'}$); 20,09 (C_{20} , $\text{C}_{20'}$); 14,07 (C_{28} , $\text{C}_{28'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz) δ (ppm) :

-113,6 à -113,9 (m, 4F, F_a , F_a'); -116,3 à -116,6 (m, 4F, F_d , F_d'); -125,1 à -125,5 (m, 8F, F_b , F_b' , F_c , F_c').

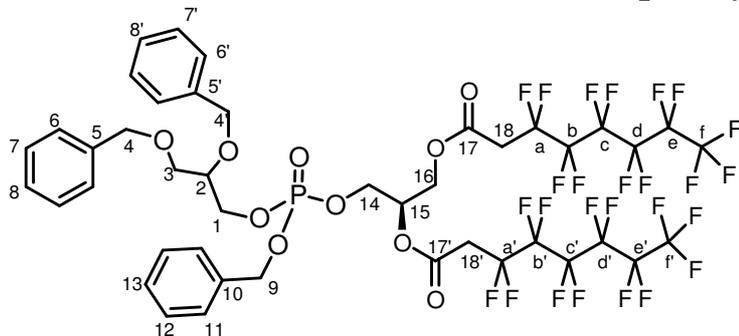
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,59 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2924, 2855, 1757, 1456, 1380, 1165, 1022, 866, 737, 697.

61d 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridécafluoro octanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,7-undécafluoro-heptanoyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{43}\text{H}_{35}\text{F}_{26}\text{O}_{10}$
PMM : 1236,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile Jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **61d** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **61a**, à partir de l'acide **31d** (220 mg, 582 μmol , 3,5 éq) et le diol de départ **43** (85 mg, 166 μmol , 1 éq). On obtient ainsi 149 mg (121 μmol) d'une huile jaune, avec un rendement de 72 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ (AcOEt /PE 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

7,34-7,30 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,31-5,19 (m, 1H, H_{15}); 5,06 (d, 2H, $^3J_{P-H} = 8,8\text{Hz}$, H_9); 4,64 (s, 2H, H_4'); 4,52 (s, 2H, H_4); 4,30-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,85-3,72 (m, 1H, H_2); 3,57 (d, $^3J_{2-3} = 4,8\text{Hz}$, 2H, H_3); 3,11 (t, $^3J_{H-F} = 17,4\text{ Hz}$, 4H, H_{18} , $\text{H}_{18'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

165,5; 165,7 (C_{17} , $\text{C}_{17'}$); 140,4; 140,3 (C_5 , $\text{C}_{5'}$); 130,6-129,6 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 78,6 (C_2); 75,23 (C_4); 74,01 (C_4'); 73,14 (C_9); 72,01 (C_{15}); 70,52 (C_3); 69,60 (C_1); 67,36 (C_{14}); 64,56 (C_{16}); 38,22-37,9 (m, C_{18} , $\text{C}_{18'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 188 MHz) δ (ppm) :

-78,9 à -78,7 (m, 6F, F_f , F_f'); -109,7 à -109,6 (m, 4F, F_a , F_a'); -119,8 à -119,6 (m, 4F, F_b , F_b'); -120,9 à -120,8 (m, 8F, F_c , F_d , F_c' , F_d'); -124,3 à 124,0 (4F, F_e).

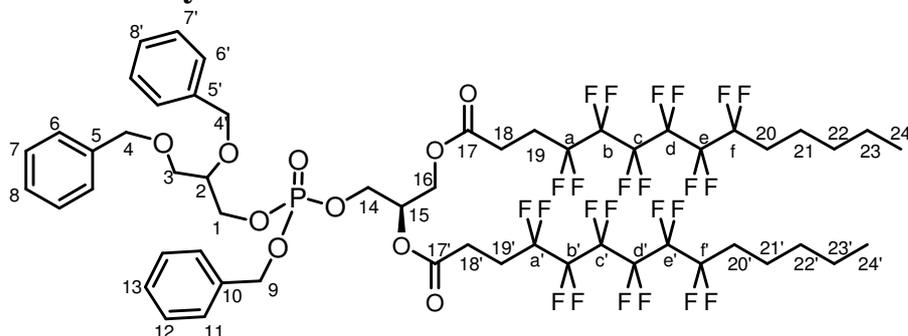
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

0,29 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2359, 2341, 1756, 1455, 1352, 1232, 1194, 1142, 1119, 1012, 888, 848, 810, 735, 708, 697, 669, 629, 601, 560, 526.

62 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-Dodécafluorotétradécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-dodécafluorotétradécanoyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{55}\text{H}_{61}\text{F}_{24}\text{O}_{10}\text{P}$
MM : 1369,0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile incolore

MODE OPÉRATOIRE

Dans 5 mL de CH_2Cl_2 , on introduit 160 mg (360 μmol , 2 éq) d'acide **34**, 93 mg de diol **43** (180 μmol , 1 éq), 111 mg (540 μmol , 3 éq) de DCC et une quantité catalytique de DMAP.

La réaction est agitée à température ambiante la nuit. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution saturée de NH_4Cl et on effectue 3 extractions au CH_2Cl_2 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/PE 5/95→8/2). On obtient ainsi 221 mg (162 μmol) d'une huile incolore, soit un rendement de 90 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ (AcOEt /PE 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) :

7,36-7,30 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,25-5,15 (m, 1H, H_{15}); 5,06 (d, 2H, $^3J_{P-H} = 8,8$ Hz, H_9); 4,64 (s, 2H, H_4); 4,52 (s, 2H, H_4); 4,30-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,85-3,75 (m, 1H, H_2); 3,57 (d, 2H, $^3J_{2-3} = 4,8$ Hz, H_3); 2,59 (t, 4H, $^3J_{18-19} = ^3J_{18'-19'} = 6,6$ Hz, H_{18}); 2,5-2,4 (m, 4H, H_{19} , $\text{H}_{19'}$); 2,10-2,01 (m, 4H, H_{20} , $\text{H}_{20'}$); 1,65-1,55 (m, 4H, H_{21} , $\text{H}_{21'}$); 1,40-1,27 (m, 8H, H_{22-23} , $\text{H}_{22'-23'}$); 0,90 (t, 6H, $^3J_{23-24} = ^3J_{23'-24'} = 6,0$ Hz, H_{24} , $\text{H}_{24'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) :

170,64 (C_{17}); 170,32 (C_{17}); 137,95 (C_5); 137,86 (C_5); 135,47 (C_{10}); 128,66-126,68 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$; C_{11-13}); 76,39 (C_2); 73,43 (C_4); 72,20 (C_4); 70,2 (C_9); 69,6 (C_{15}); 68,79 (C_3); 67,30 (C_1); 64,99 (C_{14}); 62,30 (C_{16}); 31,19 (C_{22} , $\text{C}_{22'}$); 30,57 (t, $^2J_{C-F} = 22,7$ Hz, C_{20} , $\text{C}_{20'}$); 26,40 (t, $^2J_{C-F} = 22,7$ Hz, C_{19} , $\text{C}_{19'}$); 25,39 (C_{18} , $\text{C}_{18'}$); 22,24 (C_{23} , $\text{C}_{23'}$); 19,75 (C_{21} , $\text{C}_{21'}$); 13,75 (C_{24} , $\text{C}_{24'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 188 MHz) δ (ppm) :

-112,3 à -112,5 (m, 4F, F_a , $\text{F}_{a'}$); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_b , F_b'); -119,5 à 119,7 (m, 8F, F_{c-d} , $\text{F}_{c'-d'}$); 121,5 à -121,7 (m, 4F, F_e , F_e' , F_f , F_f').

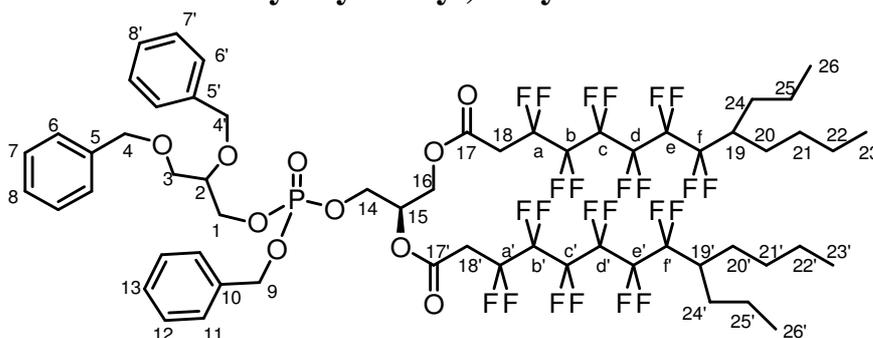
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,63 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2959, 1748, 1497, 1455, 1191, 1140, 1106, 1144, 890, 737, 698, 647, 558, 535.

63a 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-propyl-tridécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-propyl-tridécanoyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{F}_{24}\text{O}_{10}\text{P}$
MM : 1425,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Huile Jaune

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **63a** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **61a** à partir de l'acide **38a** (153 mg, 324 μmol , 3,5 éq) et du diol **43** (47 mg, 91 μmol , 1 éq). On obtient ainsi 120 mg (84 μmol) d'une huile jaune avec un rendement de 92 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ (AcOEt /PE 4/6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) :

7,40-7,27 (m, 15H, H_{6-8} , $\text{H}_{6'-8'}$, H_{11-13}); 5,35-5,15 (m, 1H, H_{15}); 5,06 (d, 2H, $^3J_{\text{H-P}} = 8,7$ Hz, H_9); 4,65 et 4,53 (2s, 4H, H_4 , H_4'); 4,30-4,05 (m, 6H, H_1 , H_{14} , H_{16}); 3,86-3,78 (m, 1H, H_2); 3,58 (d, 2H, $^3J_{2-3} = 4,9$ Hz, H_3); 3,11 (t, $^3J_{\text{H-F}} = 17,1$ Hz, 4H, H_{18} , $\text{H}_{18'}$); 2,32-1,96 (m, 2H, H_{19} , $\text{H}_{19'}$); 1,75-1,21 (m, 10H, H_{20-22} , $\text{H}_{20'-22'}$, H_{24} , H_{25} , $\text{H}_{24'}$, $\text{H}_{25'}$); 0,99-0,91 (m, 12H, H_{23} , H_{26} , $\text{H}_{23'}$, $\text{H}_{26'}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) :

163,41 et 163,17 (2s, C_{17} , $\text{C}_{17'}$); 137,94 et 137,89 (2s, C_5 , $\text{C}_{5'}$); 135,54 (C_{10}); 128,69-127,60 (C_{6-8} , $\text{C}_{6'-8'}$, C_{11-13}); 77,66 (C_2); 73,42 (C_4); 72,20 (C_4'); 70,63 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 7,5$ Hz, C_9); 69,73 (C_{15}); 68,76 (C_3); 67,32 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 4,4$ Hz, C_1); 64,55 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 5,3$ Hz, C_{14}); 62,64 (C_{16}); 40,96 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 19,6$ Hz, C_{19} , $\text{C}_{19'}$); 36,80 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 25,4$ Hz, C_{18} , $\text{C}_{18'}$); 29,03 (C_{24} , $\text{C}_{24'}$); 26,50 (C_{23} , $\text{C}_{23'}$); 22,97 (C_{25} , $\text{C}_{25'}$); 20,08 (C_{21} , $\text{C}_{21'}$); 14,10 et 13,8 (2s, C_{22} , $\text{C}_{22'}$, C_{26} , $\text{C}_{26'}$).

RMN ^{19}F (CDCl_3 188 MHz) δ (ppm) :

-109,5 à -109,7 (m, 4F, F_a , F_a'); -111,6 à -111,8 (m, 4F, F_f , F_f'); -118,4 à -118,6 (m, 4F, F_e , F_e'); -119,5 à -120,0 (m, 8F, F_c , F_c' , F_d , F_d'); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b , F_b')

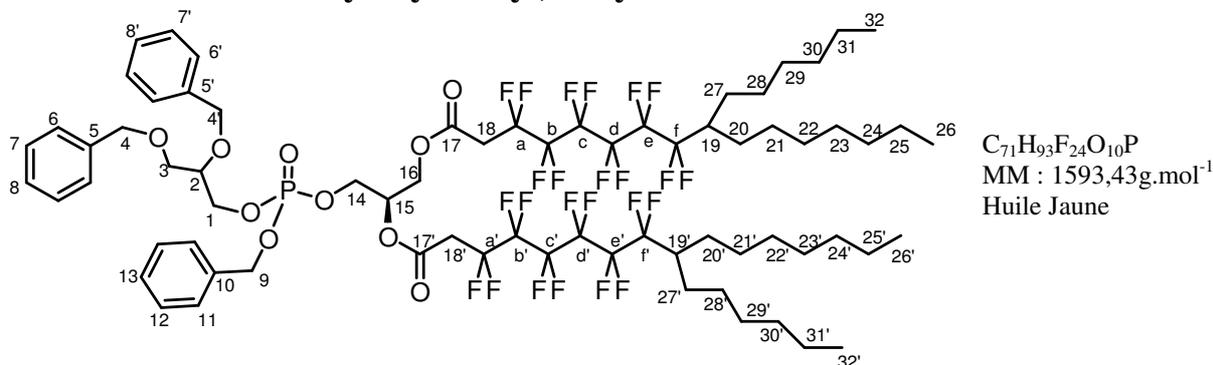
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz) δ (ppm) :

-0,34 (s).

IR ν (cm^{-1}):

2961, 2875, 1758, 1456, 1381, 1267, 1190, 1139, 1101, 1013, 884, 735, 696, 629, 516.

63b 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-9-hexyl-hexadécanoate de 2-[benzyloxy-(2,3-bis-benzyloxy-propoxy)-phosphoryloxy]-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-9-hexyl-hexadécanyloxyméthyl)-éthyle



MODE OPÉRATOIRE

Le composé **63b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **61a**, à partir de l'acide **38b** (226 mg, 406 μ mol, 3 éq) et du diol de départ **43** (70 mg, 135 μ mol, 1 éq). Lors de la purification, on isole 90 mg (56 μ mol) de notre produit qui est une d'une huile jaune avec un rendement de 41 %, mais également 48 mg (45 μ mol, 33 %) d'un composé monoestérifié non identifié.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,6$ (AcOEt /PE 5/5).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

7,40-7,27 (m, 15H, H₆₋₈, H_{6'-8'}, H₁₁₋₁₃); 5,32-5,17 (m, 1H, H₁₅); 5,05 (d, ³J_{H-P} = 8,7 Hz 2H, H₉); 4,63 et 4,52 (2s, 4H, H₄, H_{4'}); 4,35-4,05 (m, 6H, H₁, H₁₄, H₁₆); 3,82-3,73 (m, 1H, H₂); 3,62-3,51 (m, 2H, H₃); 3,22-3,00 (m, 4H, H₁₈, H_{18'}); 2,25-2,00 (m, 2H, H₁₉, H_{19'}); 1,75-1,21 (m, 10H, H₂₀₋₂₂, H_{20'-22'}, H₂₄, H₂₅, H_{24'}, H_{25'}); 0,99-0,82 (m, 12H, H₂₃, H₂₆, H_{23'}, H_{26'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

163,50 et 163,21 (2s, C₁₇, C_{17'}); 137,81 (C₅, C_{5'}); 135,34 (C₁₀); 128,80-127,60 (C₆₋₈, C_{6'-8'}, C₁₁₋₁₃); 77,66 (C₂); 73,43 et 72,21 (2s, C₄, C_{4'}); 70,66 (d, ²J_{P-C} = 8,25 Hz, C₉), 69,97 (C₁₅); 68,66 (C₃); 67,31-67,60 (m, C₁); 64,77 (d, ²J_{P-C} = 3,6 Hz, C₁₄); 62,59 (C₁₆); 41,17 (t, ²J_{C-F} = 19,9 Hz, C₁₉, C_{19'}); 36,95-36,60 (m, C₁₈, C_{18'}); 31,78 et 31,59 (2s, C₃₀, C_{30'}, C₂₄, C_{24'}); 29,05-28,35 (C₁₁₋₁₃, C₁₈, C₁₉, C_{11'-13'}, C_{18'}, C_{19'}); 26,17 (C₁₀, C_{10'}, C₁₇, C_{17'}); 21,90 (C₁₅, C_{15'}, C₂₁, C_{21'}); 13,03 (2s, C₂₂, C_{22'}, C₁₆, C_{16'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃ 188 MHz) δ (ppm) :

-109,6 à -110,4 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -111,6 à -111,8 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -118,4 à -118,6 (m, 4F, F_e, F_{e'}); -119,5 à -120,0 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b, F_{b'})

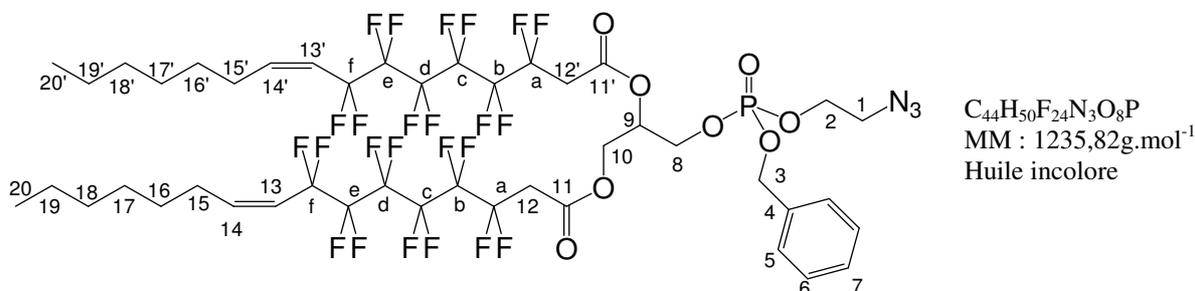
RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz) δ (ppm) :

-0,72 (s).

IR ν (cm⁻¹):

2956, 2926, 2857, 1757, 1456, 1379, 1192, 1139, 1103, 1019; 888, 736, 696, 628, 515.

64 (Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-heptadéc-9-énoate de 3-[benzyloxy-(2-azido-éthoxy)-phosphoryloxy]-2-((Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-heptadéc-9-enoyloxy)-propyle



MODE OPÉRATOIRE

À une solution de 250 mg de composé **41** (532 μ mol, 2,6 éq) dans du CH₂Cl₂ anhydre (2 mL), on ajoute à température ambiante 250 μ L de chlorure d'oxalyle (2,86 mmol, 14 éq) ainsi qu'une quantité catalytique de DMF anhydre (1 μ L). La réaction est laissée 4 h à température ambiante, puis le mélange est concentrée sous pression réduite. Le résidu est coévaporé avec du toluène puis est solubilisé dans 2 mL de CH₂Cl₂ anhydre. À cette solution, on ajoute la tête polaire **44** (68,3 mg, 206 μ mol, 1 éq) (préalablement coévaporée 3 fois avec du toluène pour éliminer toute trace d'eau) dissoute dans 3 mL de THF. On ajoute ensuite 45 μ L de pyridine anhydre (532 μ mol, 2,6 éq) et on laisse la solution sous agitation à température ambiante pendant 8h. On hydrolyse le milieu réactionnel par ajout de 10 μ L d'une solution saturée de NH₄Cl et on extrait 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. On purifie le produit par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/CH₂Cl₂/PE 20/25/65→25/25/50→40/60/0→100/0/0). On obtient ainsi 167,4 mg (114 μ mol) d'une huile incolore, soit un rendement de 65 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,4 (AE/CH₂Cl₂/EP 25/25/50).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :

7,45-7,32 (m, 5H, H₅₋₇); 6,15-6,01 (m, 2H, H₁₃, H_{13'}); 5,62-5,25 (m, 3H, H₉, H₁₄, H_{14'}); 5,13 (dd, ²J_{3-3'} = 1,4 Hz, ³J_{H-P} = 9,2 Hz, H₃); 4,50-4,03 (m, 6H, H₂, H₈, H₁₀); 3,43 (t, ²J₁₋₂ = 4,4 Hz, 2H, H₁); 3,14 (t, ²J_{H-F} = 17,4 Hz, 4H, H₁₂, H_{12'}); 2,32-2,25 (m, 4H, H₁₅, H_{15'}); 1,31-1,25 (m, 16H, H₁₆₋₁₉, H_{16-19'}); 0,88 (t, ³J₂₀₋₁₉ = ³J_{20'-19'} = 4,7 Hz, 6H, H₂₀, H_{20'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

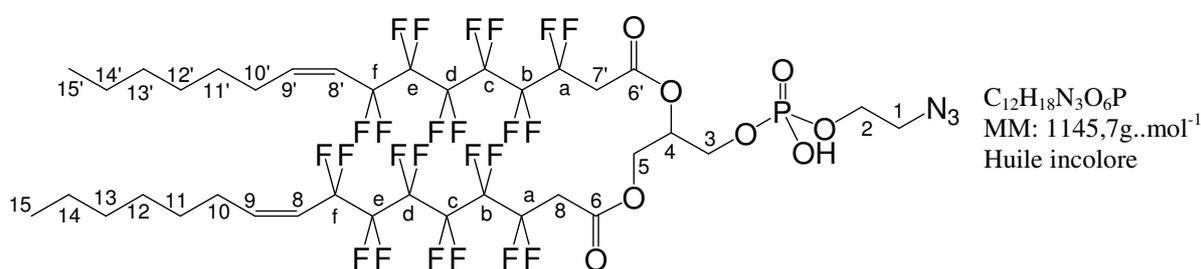
163,44 et 163,16 (2s, C₁₁, C_{11'}); 145,41 (C₁₄, C_{14'}); 135,32 (C₄); 128,87 (C₇); 128,68 et 128,10 (C₅, C₆); 125,0-102,0 (CF₂); 116,0 (t, ²J_{C-F} = 23,2 Hz, C₁₃, C_{13'}); 70,67 (C₉); 69,95 (C₃); 66,54, 64,75 et 62,54 (C₂, C₈, C₁₀); 50,65 (C₁); 36,70 (t, ²J_{C-F} = 19,7 Hz,

C₁₂, C_{12'}); 31,47 (C₁₈, C_{18'}); 28,94-27,86 (C₁₅₋₁₇, C_{15'-17'}); 22,45 (C₁₉, C_{19'}); 13,89 (C₂₀, C_{20'}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
0,64 (s, 1P).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
-104,7 à -104,5 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -110,4 à -110,2 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,8 à -119,6 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,0 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,8 à -121,6 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

65 (Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-heptadéc-9-enoate de 3-[(2-azido-éthoxy)-hydroxy-phosphoryloxy]-2-((Z)-3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-heptadéc-9-enoyloxy)-propyle



MODE OPÉRATOIRE

À une solution de 83,9 mg de composé **65** (67,9 μmol, 1 éq) dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL), on ajoute 35 μL (272 μmol, 4 éq) de bromure de triméthylsilane. La réaction est placée 3h30 sous agitation. A cette solution est ajouté du THF contenant de l'eau, puis le solvant organique est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CHCl₃/MeOH 10/0→60/40). On obtient ainsi 74,0 mg (64,5 μmol) d'une huile incolore, soit un rendement de 95 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,6 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10/6/1).

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm) :
6,12-6,01 (m, 2H, H₈, H_{8'}); 5,62-5,25 (m, 3H, H₄, H₉, H_{9'}); 4,65-3,93 (m, 6H, H₂, H₃, H₅); 3,54-3,36 (m, 2H, H₁); 3,24-3,10 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 2,35-2,25 (m, 4H, H₁₀, H_{10'}); 1,38-1,22 (m, 16H, H₁₁₋₁₄, H_{11'-14'}); 0,88 (m, 6H, H₁₅, H_{15'}).

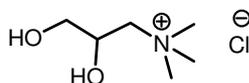
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :
163,57 (C₆, C_{6'}); 145,06 (C₉, C_{9'}); 125,0-102,0 (CF₂); 116,14 (t, ²J_{C-F} = 23,2 Hz, C₈, C_{8'}); 71,99 (C₄); 64,73 (C₂); 63,75-63,68 (C₅, C₃); 51,31 (C₁); 36,50-36,10 (m, C₇, C_{7'}); 31,53 (C₁₃, C_{13'}); 28,62, 28,39 et 27,90 (C₁₀₋₁₂, C_{10'-12'}); 22,46 (C₁₄, C_{14'}); 13,87 (C₁₅, C_{15'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ (ppm) :
-104,7 à -104,5 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -110,4 à -110,2 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,8 à -119,6 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,0 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,8 à -121,6 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

IR ν (cm^{-1}):

2958, 2929, 2859, 2113, 1751, 1663, 1463, 1380, 1191, 1139, 1095, 952, 840, 727, 628, 560, 450.

66 Chlorure de (2,3-Dihydroxypropyl)-triméthyl-ammonium



$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$
MM : 169,65 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Solide blanc

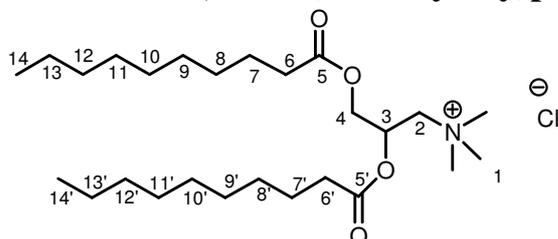
MODE OPÉRATOIRE

Dans 20 mL de méthanol, on introduit 2 mL de glycidol (30,15 mmol, 1 éq), 2,88 g de chlorure de triméthylammonium (30,15 mmol, 1 éq) et 5,25 mL de DIPEA (30,15 mmol, 1 éq). On laisse la réaction la nuit à température ambiante. Après évaporation du solvant, on effectue une recristallisation dans un mélange 50/50 acétone/EtOH. On récupère ainsi 3,65 g (21,5 mmol) de cristaux blancs, soit un rendement de 71%.

ANALYSES

Les analyses sont conformes à celles décrites dans la littérature.¹⁵⁹

67 Chlorure de [2,3-Bis-(décanoyloxy)propyl]-triméthyl-ammonium



$\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{ClNO}_4$
MM : 478,15 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Dans un ballon de 5 mL, on introduit 274 mg (1,6 mmol, 2,5 éq) d'acide décanoïque que l'on dissout dans 2 mL de CH_2Cl_2 anhydre plus 412 μL de chlorure d'oxalyle (4,8 mmol, 7,5 éq) et 1 μL de DMF anhydre. La réaction est laissée 4 heures à température ambiante. Puis on évapore la solution. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est repris et évaporé 3 fois dans du toluène anhydre afin d'éliminer toutes traces de chlorure d'oxalyle.

Le chlorure de 2,3-dihydroxy-1,1,1-triméthylaminopropane 110 mg (648 μmol , 1 éq) est broyé à l'aide d'un mortier puis repris et évaporé 3 fois dans un mélange 5/5 CH_3CN anhydre /toluène anhydre, la poudre obtenue est mise en suspension dans 3 mL de THF et 1 mL de CH_2Cl_2 . On additionne à cette solution 130 μL (1,6 mmol, 2,5 éq) de pyridine et le chlorure d'acide dans 2 mL de CH_2Cl_2 .

La solution est mise au bain à ultrasons pendant 1 h30 puis sous agitation à température ambiante une nuit. La réaction est ensuite chauffée 9h 60°C puis le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est adsorbé sur silice le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 100/0 \rightarrow 6/4). On obtient ainsi 260 mg (415 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 64%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,7$ (CH₃Cl/MeOH/H₂O : 10/6/1)

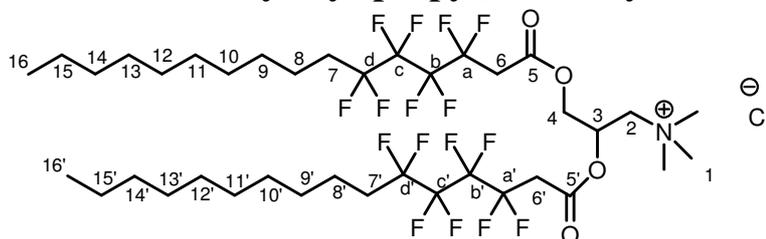
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) :

5,51-5,48 (m, 1H, H₃); 4,61-4,35 (m, 1H, H₄); 4,00-4,60 (m, 2H, H₂); 3,39 (s, 9H, H₁); 2,22-1,15 (m, 4H, H₆, H_{6'}); 1,18-1,07 (m, 24H, H₇₋₁₃, H_{7'-13'}); 0,85-0,70 (m, 6H, H₁₄, H_{14'}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) :

172,78 172,40 (2s, C₅, C_{5'}); 65,65 (C₂); 65,37 (C₄); 62,92 (C₃); 53,89 (C₁); 33,87 et 36,57 (2s, C₆, C_{6'}); 31,51 (C₁₂, C_{12'}); 30,1-28,5 (m, C₈₋₁₁, C_{8'-11'}); 24,42 et 24,30 (2s, C₇ et C_{7'}); 22,31 (C₁₃, C_{13'}); 13,76 (C₁₄, C_{14'}).

68 Chlorure de [2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluorohexadécanyloxy)-propyl]-triméthyl-ammonium



C₃₈H₆₀ClF₁₆NO₄
MM : 934,31 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **68** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **21**, à partir de l'acide **31c** (292 mg, 584 μ mol, 3,5 éq) et du diol de départ **66** (28,3 mg, 167 μ mol, 1 éq). On obtient ainsi 78,9 mg (40 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 24%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ (CHCl₃/MeOH/H₂O : 10/6/1)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 300 MHz) δ (ppm) :

5,74-5,61 (m, 1H, H₃); 4,79-4,65 (m, 1H, H₄); 4,30-4,10 (m, 2H, H₄, H₂); 3,80-3,68 (m, 1H, H₂); 3,58-3,20 (m, 13H, H₁, H₆, H_{6'}); 2,10-1,90 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 1,57-1,42 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,26-1,10 (m, 28H, H₉₋₁₅, H_{9'-15'}); 0,89-0,76 (m, 6H, H₁₆, H_{16'}).

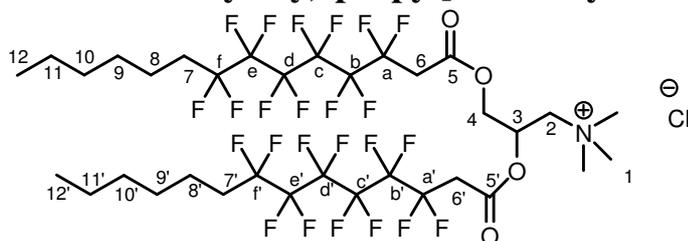
RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 75 MHz) δ (ppm) :

163,8 163,4 (2s, C₅, C_{5'}); 67,19 (C₂); 65,17 (C₄); 63,63 (C₃); 53,77 (C₁); 36,4-36,3 (m, C₆, C_{6'}); 31,51 (C₁₄, C_{14'}); 30,8-30,2 (m, C₇, C_{7'}); 29,1-28,7 (C₉₋₁₃, C_{9'-13'}); 22,27 (C₁₅, C_{15'}); 19,76 (C₈, C_{8'}); 13,56 (C₁₆, C_{16'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3377, 2957, 2931, 2873, 2860, 1750, 1469, 1439, 1381, 1266, 1186, 1136, 1050, 973, 908, 735, 707, 645, 628, 558, 541, 519, 419.

69 Chlorure de [2,3-Bis-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-tétradécanoyloxy)-propyl]-triméthyl-ammonium



$C_{34}H_{44}ClF_{24}NO_4$
 MM : 1022,13 g.mol⁻¹
 Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **69** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **21**, à partir de l'acide **31b** (209 mg, 470 μ mol, 2,5 éq) et du diol de départ **66** (31,9 mg, 188 μ mol, 1 éq). On obtient ainsi 51,3 mg (49 μ mol) d'une cire blanche, soit un rendement de 26%.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,5$ ($CHCl_3/MeOH/H_2O$: 10/6/1)

RMN ¹H ($CDCl_3/CD_3OD$ 5/5, 300 MHz) δ (ppm) :

5,74-5,61 (m, 1H, H₃); 4,79-4,65 (m, 1H, H₄); 4,30-4,10 (m, 2H, H_{4'}, H₂); 3,80-3,60 (m, 1H, H_{2'}) ; 3,42-3,20 (m, 13H, H₁, H₆, H_{6'}); 2,10-1,90 (m, 4H, H₇, H_{7'}); 1,57-1,42 (m, 4H, H₈, H_{8'}); 1,31-1,14 (m, 12H, H₉₋₁₅, H_{9'-15'}); 0,89-0,76 (m, 6H, H₁₆, H_{16'})

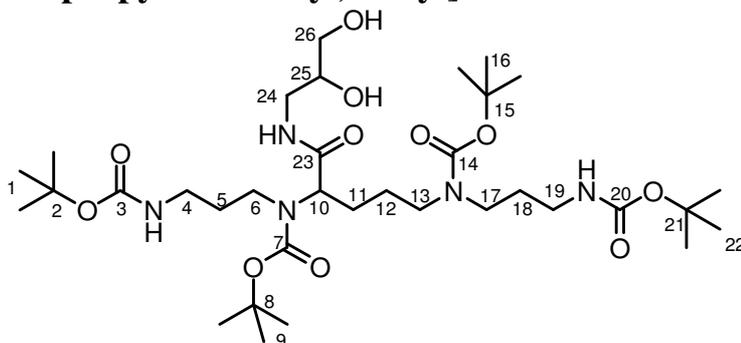
RMN ¹³C ($CDCl_3/CD_3OD$ 5/5, 75 MHz) δ (ppm) :

163,8 163,4 (2s, C₅, C_{5'}); 67,5 (C₂); 65,4 (C₄); 64,0 (C₃); 54,28 (C₁); 37,3-36,0 (m, C₆, C_{6'}); 31,2 (C₁₀, C_{10'}); 30,8-30,2 (m, C₇, C_{7'}); 28,6 (C₉, C_{9'}); 22,2(C₁₁, C_{11'}); 19,86 (C₈, C_{8'}); 13,56 (C₁₂, C_{12'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3377, 2957, 2931, 2873, 2860, 1750, 1469, 1439, 1381, 1266, 1186, 1136, 1050, 973, 908, 735, 707, 645, 628, 558, 541, 519, 419.

70 (3-tert-Butoxycarbonylamino-propyl)-[4-[tertbutoxycarbonyl-(3-tert-butoxycarbonylamino-propyl)-amino]-1-(2,3-dihydroxy-propylcarbamoyle)-butyl]-carbamate de tert-butyle



$C_{34}H_{65}N_5O_{11}$
 MM : 719,91 g.mol⁻¹
 Poudre blanche

MODE OPÉRATOIRE

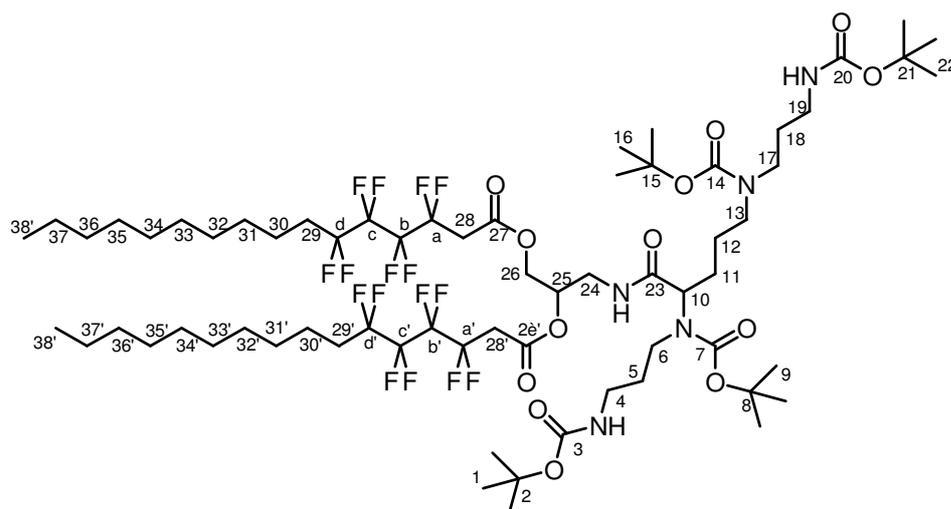
À partir de 53 mg (83,3 μmol , 1 éq) de *N*-Boc₄-carboxyspermine dans 1 mL de DMF anhydre, on additionne 7,6 mg (83,3 μmol , 1 éq) de 3-aminopropane-1,2-diol, 22,4 mg (108 μmol , 1,3 éq) de DCC et 25,6 mg (108 μmol , 2,3 éq) de HOBt. La réaction est placée sous agitation à température ambiante pendant 2h, puis on évapore le DMF à l'aide d'un Hickmann. Le produit est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant : AcOEt/MeOH 95/5). On récupère ainsi 59 mg (83,3 μmol) d'une poudre blanche soit un rendement quantitatif.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,4$ (AcOEt/MeOH 9/1 (plaque prétraitée à la triéthylamine avant élution.))

Les analyses sont conformes à celles décrites dans la littérature.

71a 3,3,4,4,5,5,6,6-Octafluoro-hexadécanoate de 2-{2,5-bis-[tert-butoxycarbonyl-(3-tert-butoxycarbonylamino-propyl)-amino]-pentanoylamino}-1-(3,3,4,4,5,5,6,6-octafluoro-hexadecanoyloxyméthyl)-éthyle



$\text{C}_{66}\text{H}_{109}\text{F}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}$
MM : 1484,57g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **71a** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **71c** à partir de l'acide **31c** (78 mg, 195 μmol , 4 éq) et du diol **70** (32 mg, 44 μmol , 1 éq). On obtient ainsi 32 mg (21 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 65 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (AcOEt/CH₂Cl₂ : 25/75)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 200 MHz) δ (ppm) :

5,43-5,15 (m, 1H, H₂₆); 4,63-4,05 (m, 1H, H₂₇); 3,65-3,00 (m, 17H, H₄, H₆, H₁₀, H₁₃, H₁₇, H₁₉, H₂₄, H₂₈, H_{28'}); 2,20-1,82 (m, 4H, H₂₉, H_{29'}); 1,71-1,15 (m, 82H, H₁, H₅, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₆, H₁₈, H₂₂, H₃₀₋₃₇, H_{30'-37'}); 0,95-0,80 (m, 6H, H₃₈, H_{38'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 75 MHz) δ (ppm) :

172,01 (C₂₃); 163,94-163,15 (C₃, C₂₀, C₂₇, C_{27'}); 156,25-156,10 (C₁₄, C₇); 125,00-105,00 (CF₂); 81,10 (C₈); 79,72 (C₁₅); 79,10-78,9 (C₂, C₂₁); 71,43 (C₂₅); 63,65 (C₂₆); 58,31 (C₁₀); 46,55-43,70 (C₆, C₁₃, C₁₇); 42,71-42,65 (C₄, C₁₉); 38,90-36,39 (C₂₄, C₂₈, C_{28'}); 31,78 (C₃₆, C_{36'}); 30,84 (t, ²J_{C-F} = 22,75 Hz, C₂₉, C_{29'}); 30,15-29,06 (C₅, C₁₁, C₁₂, C₃₁₋₃₅, C_{31'-35'}); 29,00-28,80 (C₁, C₉, C₁₆, C₂₂); 26,41-24,65 (C₆-C₁₈); 22,99 (C₃₇, C_{37'}); 20,04 (C₃₀, C_{30'}); 14,01 (C₃₈, C_{38'}).

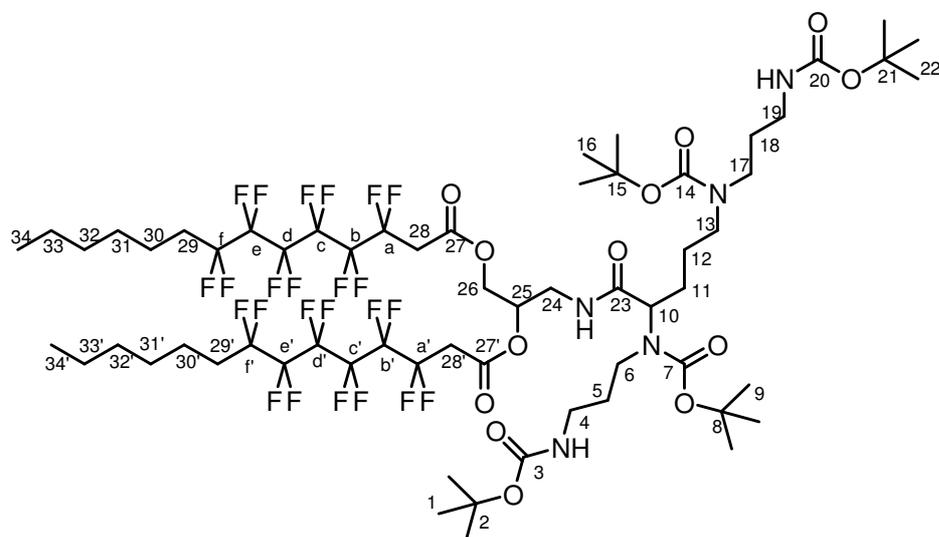
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,5 à -110,0 (m, 2F, F_a, F_a); -112,0 à -112,5 (m, 4F, F_d, F_{d'}); -121,3 à -121,5 (m, 4F, F_b, F_{b'}, F_c, F_{c'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3329, 2927, 2853, 1757, 1685, 1626, 1575, 1534, 1466, 1419, 1391, 1366, 1310, 1246, 1167.

71b **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-tétradécanoate de 2-{2,5-bis-[tert-butoxycarbonyl-(3-tert-butoxycarbonylamino-propyl)-amino]-pentanoylamino}-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-tétradécanoyloxyméthyl)-éthyle**



C₆₂H₉₃F₂₄N₅O₁₃
MM : 1572,39g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

Le composé **71b** a été obtenu en appliquant la même procédure que celle décrite pour l'obtention du produit **71c** à partir de l'acide **31b** (120 mg, 269 μmol, 3 éq) et 1 du diol **70** (64,6 mg, 89 μmol, 1 éq). On obtient ainsi 66,4 mg (52 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 83 %.

ANALYSES

CCM : $R_f = 0,2$ (AcOEt/CH₂Cl₂ : 25/75)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 300 MHz) δ (ppm) :

5,43-5,15 (m, 1H, H₂₆); 4,53-4,05 (m, 1H, H₂₇); 3,65-3,00 (m, 17H, H₄, H₆, H₁₀, H₁₃, H₁₇, H₁₉, H₂₄, H₂₈, H_{28'}); 2,20-1,82 (m, 4H, H₂₉, H_{29'}); 1,71-1,15 (m, 66H, H₁, H₅, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₆, H₁₈, H₂₂, H₃₀₋₃₃, H_{30'-33'}); 0,95-0,80 (m, 6H, H₃₄, H_{34'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 75 MHz) δ (ppm) :

172,09 (C₂₃); 163,70-163,35 (C₃, C₂₀, C₂₇, C_{27'}); 156,25-156,10 (C₁₄, C₇); 125,00-105,00 (CF₂); 81,14 (C₈); 79,82 (C₁₅); 79,10-78,9 (C₂, C₂₁); 71,51 (C₂₅); 63,71 (C₂₆); 58,62 (C₁₀); 46,55-43,70 (C₆, C₁₃, C₁₇); 42,71-42,65 (C₄, C₁₉); 38,90-36,39 (C₂₄, C₂₈, C_{28'}); 31,25 (C₃₂, C_{32'}); 31,06 (t, ²J_{C-F} = 22,35 Hz, C₂₉, C_{29'}); 29,76-29,65 (C₁₁, C₁₂, C₅); 28,62 (C₃₁, C_{31'}); 28,25-28,08 (C₁, C₉, C₁₆, C₂₂); 26,01-24,55 (C₆-C₁₈); 22,26 (C₃₃, C_{33'}); 19,92 (C₃₀, C_{30'}); 13,78 (C₃₄, C_{34'}).

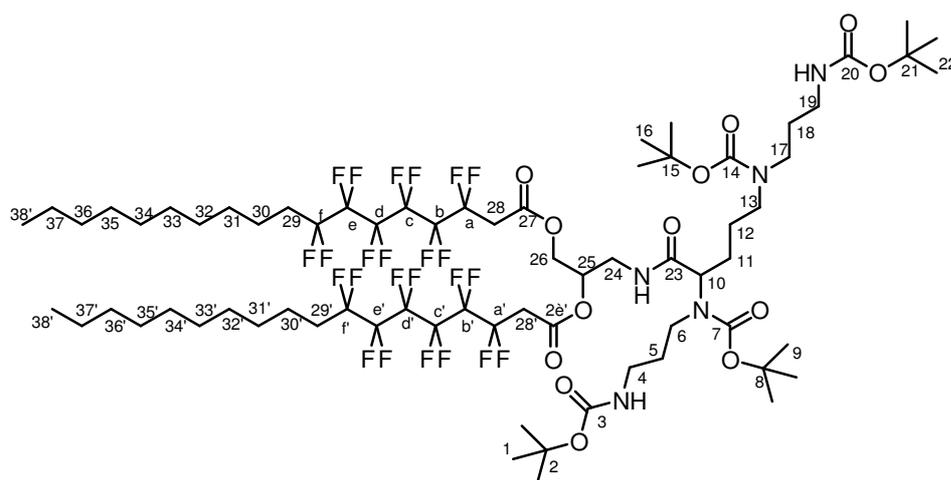
RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,7 à -109,9 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,8 à -120,0 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,6 à -121,7 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3367, 2970, 2932, 1756, 1678, 1508, 1456, 1392, 1366, 1249, 1163, 1138, 1051, 865, 775, 734, 694, 628, 557, 418.

71c **3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Dodécafluoro-octadécanoate de 2-{2,5-bis-[tert-butoxycarbonyl-(3-tert-butoxycarbonylamino-propyl)-amino]-pentanoylamino}-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-dodécafluoro-octadécanoyloxyméthyl)-éthyle**



C₇₀H₁₀₉F₂₄N₅O₁₃
MM : 1684,6 g.mol⁻¹
Cire blanche

MODE OPÉRATOIRE

À partir de 150 mg (297 μ mol, 3 éq) d'acide **31a** dans 2 mL de CH₂Cl₂, on additionne 130 μ L (1,49 mmol, 15 éq) de chlorure d'oxalyle et une quantité catalytique de DMF anhydre (1 μ L). La réaction est placée sous agitation pendant 3h à température ambiante. le solvant et

l'excès de réactif sont évaporés, et le résidu est repris 3 fois dans du toluène, puis solubilisé dans 1 mL de CH₂Cl₂. Cette solution est ajoutée à 71,3 mg (99,0 μmol, 1 éq) du composé **70** dans 2 mL de THF anhydre (le composé **70** aura préalablement été repris et évaporé 3 fois dans un mélange 1/1 toluène anhydre/CH₃CN anhydre). On additionne également 24,2 mg (198 μmol, 2 éq) de DMAP et 24 μL (297 μmol, 3 éq) de pyridine. Après quelques secondes on observe un précipité blanc. La réaction est placée sous agitation 20h à température ambiante. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution saturée de NH₄Cl, et on effectue une extraction 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant: AcOEt/CH₂Cl₂ 8/2→5/5). On obtient ainsi 65,7 mg (39,0 μmol) d'une cire blanche, soit un rendement de 39 %.

ANALYSES

CCM : R_f = 0,2 (AcOEt/CH₂Cl₂ : 25/75)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 300 MHz) δ (ppm) :

5,43-5,15 (m, 1H, H₂₆); 4,73-4,05 (m, 1H, H₂₇); 3,65-3,00 (m, 17H, H₄, H₆, H₁₀, H₁₃, H₁₇, H₁₉, H₂₄, H₂₈, H_{28'}); 2,20-1,82 (m, 4H, H₂₉, H_{29'}); 1,71-1,15 (m, 82H, H₁, H₅, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₆, H₁₈, H₂₂, H₃₀₋₃₇, H_{30'-37'}); 0,95-0,80 (m, 6H, H₃₈, H_{38'}).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 75 MHz) δ (ppm) :

172,09 (C₂₃); 163,94-163,15 (C₃, C₂₀, C₂₇, C_{27'}); 156,25-156,10 (C₁₄, C₇); 125,00-105,00 (CF₂); 81,18 (C₈); 79,82 (C₁₅); 79,10-78,9 (C₂, C₂₁); 71,42 (C₂₅); 63,65 (C₂₆); 58,31 (C₁₀); 46,55-43,70 (C₆, C₁₃, C₁₇); 42,71-42,65 (C₄, C₁₉); 38,90-36,39 (C₂₄, C₂₈, C_{28'}); 31,77 (C₃₆, C_{36'}); 30,84 (t, ²J_{C-F} = 22,75 Hz, C₂₉, C_{29'}); 30,15-29,06 (C₅, C₁₁, C₁₂, C₃₁₋₃₅, C_{31'-35'}); 29,00-28,80 (C₁, C₉, C₁₆, C₂₂); 26,41-24,65 (C₆-C₁₈); 22,99 (C₃₇, C_{37'}); 20,04 (C₃₀, C_{30'}); 14,01 (C₃₈, C_{38'}).

RMN ¹⁹F (CDCl₃/CD₃OD 5/5, 188 MHz) δ (ppm) :

-109,6 à -109,8 (m, 4F, F_a, F_{a'}); -112,4 à -112,6 (m, 4F, F_f, F_{f'}); -119,7 à -119,9 (m, 8F, F_c, F_{c'}, F_d, F_{d'}); -121,0 à -121,2 (m, 4F, F_b, F_{b'}); -121,7 à -121,9 (m, 4F, F_e, F_{e'}).

IR ν (cm⁻¹) :

3350, 2927, 2856, 1757, 1683, 1507, 1457, 1418, 1392, 1366, 1250, 1168, 1139, 775, 628, 559.

2 Tests physiques

2.1 Préparation des échantillons pour les études en monocouche

Nous avons utilisé un appareil de Langmuir Blodgett KSV 3000 possédant une cuve thermostatée. Les échantillons de phospholipides sont dissous dans un mélange éther de pétrole/éthanol 9/1 (phosphatidylcholines) ou éther de pétrole/chloroforme 5/5 (phosphatidylglycérol) à une concentration de 1,0 mg/mL. La solution de phospholipide est déposée au goutte à goutte à la surface de la cuve remplie d'eau ultra pure. La compression est effectuée à 20°C et démarre 10 minutes après le dépôt des échantillons (le temps que le

solvant organique s'évapore). La vitesse de compression correspond à une diminution de 5 % de l'aire disponible par minute.

2.2 Préparation des échantillons pour les études en DSC

Nous avons déposé les produits à étudier (environ 2 mg avec ou sans eau miliQ 20 μ L (10% lipides/eau)) dans une capsule d'aluminium scellée. Cette capsule a été introduite dans un four de DSC utilisant la méthode des flux de chaleur, avec comme référence une capsule vide. Nous avons utilisé un appareil NETZSCH DSC 200 PC refroidi par un groupe frigorifique Julabo Ft900. La gamme de température explorée s'étend de -20 à 85°C. Trois balayages en température ont été effectués, le premier chauffage a pour but d'homogénéiser l'échantillon et les deux balayages suivants sont exploités. Une vitesse de balayage de 5°K/min a été utilisée.

2.3 Préparation des échantillons pour observation en microscopie à lumière polarisée

Les échantillons sont placés entre deux lames de verre. L'ensemble est ensuite déposé sur une platine chauffante située entre les deux polariseurs. Les observations ont été réalisées sur un microscope Leica DLMB à lumière polarisée équipé d'une platine LTS350 thermorégulable de -190 °C à 350 °C et d'un régulateur Linkan TMS94.

2.4 Préparation des échantillons pour les études par diffraction de rayons X

Les expériences de diffraction de rayons X ont été effectuées en lumière monochromatique avec un faisceau incident de Cu-K $_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) généré par un tube équipé d'un monochromateur. Le produit sous forme de poudre a été introduit dans un capillaire en verre de Lindmann, de 1 mm de diamètre et de 10 μ m d'épaisseur, et introduit dans un porte échantillon chauffant. La température de l'échantillon peut être réglée avec une incertitude de $\pm 0,05^\circ\text{C}$. Le détecteur est un compteur à gaz courbe Inel CPS120.

2.5 Microscopie électronique

Les images ont été obtenues par dépôt de 5 à 10 μ l d'échantillon sur des grilles de cuivre recouvertes par un film de carbone pendant une minute, puis ajout de 30 μ l d'acétate d'uranyle pendant 20s pour effectuer la coloration négative de l'échantillon ; l'excès de

liquide est retiré avec du papier absorbant. L'observation des complexes est alors réalisée avec un microscope à transmission électronique (Philips EM 410).

3 Tests biologiques

3.1 Liposomes

3.1.1 Formulation de liposomes

Les lipides sont solubilisés dans un mélange chloroforme/méthanol 9/1

Solutions stock : PC (Phosphatidyl Choline Sigma P3556)

PG (Phosphatidyl Glycérol Sigma P8318)

Mode Opérateur :

- + Mélanger les constituants dans un tube en verre (PC/PG 80/20% molaire)
- + Évaporer 45 à 50 min à température ambiante
- + Ajouter 1 mL de PBS stérile ou une solution de carboxyfluorescéine 40 mM (Hepes 10 mM, NaCl 100 mM)
- + Vortexer quelques minutes afin de décoller le film lipidique et le remettre en suspension
- + Laver la sonde à l'éthanol puis soniquer dans de l'eau milliQ 5min
- + La solution tampon/lipides est soniquée 50 min à température ambiante pour former les liposomes.
- + Transférer la solution de liposomes dans un nouvel Eppendorf
- + Centrifuger 5 min à 10000 rpm afin d'éliminer les résidus de titane de la sonde dans solution.
- + Récupérer la solution liposomale dans un nouvel eppendorf stérile préalablement pesé (conserver à 4°C)
- + Repeser l'eppendorf avec la solution de liposome (afin de connaître le volume récupéré)
- + Passage après 12h sur colonne Séphadex® 75

3.1.2 Dosage de la carboxyfluorescéine

On introduit dans une plaque noire 96 puits :

- 100 µl de liposome dilué au 1/25ième
- 50 µl tampon borate 2x (0,05M) pH 8,67
- +/- 5 µl SDS 0,5 M

Cette plaque va ensuite être lue par un spectrophotomètre (SPECTRAMax GEMINI XPS de Molecular Devices)

$$\% \text{ fuite} = (F_T - F_0) / (F_{SDS} - F_0) \times 100$$

$$\% \text{ fuite} = 100 \times (F_{SDS \text{ Hepes}} - F_{0 \text{ Hepes}}) / (F_{SDS \text{ Chaps}} - F_{0 \text{ Chaps}})$$

$F_{MAX} = F_{SDS} = 100\mu\text{l liposomes} + 50\mu\text{l tampon borate} + 5\mu\text{l SDS}$

$F_0 = 100\mu\text{l liposomes} + 50\mu\text{l tampon borate}$

Témoin négatif = Hepes 10mM, NaCl 150mM pH7,4

3.2 Lipoplexes

3.2.1 Préparation des complexes

Lipoplexes avec DOPE : les solutions mères de lipides et de DOPE dilués dans du NaCl 150 mM sont mélangées puis vortexées. L'ADN, également dilué dans un tampon NaCl 150 mM, est ensuite mélangé au lipide. Le tout est alors vortexé et centrifugé. Les complexes sont utilisés après un temps de maturation de 15 min.

Lipoplexes sans DOPE : les solutions mères de lipides dilués dans une solution de NaCl 150 mM sont mélangées à l'ADN également dilué dans un tampon NaCl 150 mM, puis le tout est vortexé et centrifugé. Les complexes sont utilisés après un temps de maturation de 15min.

3.2.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les complexes sont préparés dans 20 μ L de solution adéquat (avec ou sans détergent), puis mélangés à 2 μ L de tampon de charge 6x (sans bleu de bromophénol ni de xylène cyanol : 3 mL d'eau, 1 mL de TAE 10x, 6 mL de glycérol). Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose à 1% et soumis à une électrophorèse à 100V pendant 30 min dans du tampon TAE (EDTA 1 mM et Tris acétate 40 mM – pH 8). Les gels sont alors incubés pendant 10 min dans une solution de BET (0,5 μ g/mL), puis les acides nucléiques sont visualisés et photographiés sur un banc ultraviolet.

3.2.3 Mesure de taille

La taille des particules est déterminée par diffusion quasi-élastique de la lumière, ou spectrométrie de corrélation de photons. Cette technique est basée sur la mesure du mouvement brownien des particules, mouvement aléatoire provoqué par l'impact des molécules de solvant sur la surface des particules. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement dépendent de la taille des particules et de la viscosité du solvant : pour une viscosité donnée, plus une particule est petite, plus son mouvement brownien a une fréquence et une amplitude importantes. La lumière diffusée lors du passage d'un faisceau laser (He-Ne à 632 nm) à travers les échantillons est récoltée. Les fluctuations de l'intensité du signal recueilli représentent le mouvement brownien des particules, à partir duquel on peut calculer la taille de ces dernières.

Les résultats de taille ont été obtenus avec un NanoZS (Malvern instruments, Paris, France). Cet appareil récolte la lumière rétrodiffusée aux petits angles, ce qui lui confère une grande sensibilité tout en limitant le bruit de fond ; cela permet de travailler à de faibles concentrations de matériel.

3.2.4 Détermination du potentiel zêta

Les charges présentes à la surface des particules, essentiellement liées à l'ionisation des groupes chimiques présents, vont affecter la distribution ionique dans la région située à l'interface entre la particule et le liquide dans lequel elle se trouve. C'est au niveau de cette couche entourant chaque particule qu'est mesuré le potentiel zêta, que l'on peut assimiler à la charge de surface. Les particules chargées sont soumises à un champ électrique et leur vitesse de déplacement va dépendre de plusieurs facteurs : la force du champ électrique, la constante diélectrique du solvant, la viscosité du milieu et le potentiel zêta. Les particules se déplacent à travers un réseau de franges lumineuses et diffusent la lumière à une fréquence variable selon leur vitesse. Le signal lumineux recueilli permet de déterminer la vitesse de déplacement des particules, qui est reliée à leur potentiel zêta.

Les lipoplexes d'ADN ont été formés comme décrit précédemment. 10 µL de lipoplexes sont prélevés et dilués dans 1 mL de tampon Hepes-NaCl 150 mM. Les tailles sont mesurées avec un Zêtasizer Nano ZS (Malvern instrument) à T1 (tout de suite après dilution) et à T2 (2 heures après dilution).

3.2.5 Culture cellulaire

Les milieux de culture sont supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (Perbio, Brebières, France), 100 unités/mL de pénicilline (Eurobio, Courtaboeuf, France) et 100 µg/mL de streptomycine (Eurobio, Courtaboeuf, France). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

Cellules HeLa.

Ces cellules épithéliales humaines, provenant de carcinome du col de l'utérus (ATCC ; CCL-2), sont cultivées dans du milieu MEM de Eagle avec des sels de Earle, contenant 2 mM de L-glutamine (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Cellules BHK-21

Ces cellules rénales de bébé hamster (Baby Hamster Kidney) (ATCC ; CRL 8544), sont cultivées dans du milieu MEM de Eagle avec des sels de Earle, contenant 2 mM de L-glutamine (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Cellules Hep-G2

Ces cellules provenant de carcinome de foie humain (hepatocellular carcinoma, human) (ATCC ; HB 8065), sont cultivées dans du milieu MEM de Eagle avec des sels de Earle, contenant 2 mM de L-glutamine (Eurobio, Courtaboeuf, France).

3.2.6 Transfection classique

Le protocole détaillé ci-dessous s'applique pour des transfections de cellules adhérentes en plaques 24 puits.

Les cellules sontensemencées 24 heures avant la transfection, à 50 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu de culture complet, afin qu'elles atteignent 40 à 50% de confluence. Les solutions de complexes (100 µL) sont alors ajoutées sur les cellules tout en homogénéisant doucement par agitation de la plaque. Après 24h d'incubation à 37°C, on ajoute 0,5 mL de milieu complet frais, de sorte que les cellules disposent d'assez de nutriments jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Pour une transfection en plaques 96 puits, le protocole de transfection est identique, mises à part les différentes quantités qui sont divisées par 5 (10 000 cellules/puits dans 200 µL de milieu ; 20 µL de complexes).

3.2.7 Analyse de la luciférase

Les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS (Eurobio, Courtaboeuf, France) puis lysées durant 30 minutes à température ambiante, dans 100 µl de tampon de lyse (Cell Culture Lysis Reagent 5x, Promega, Charbonnières, France). Les échantillons d'analyse sont obtenus par centrifugation du lysat cellulaire à 4°C pendant 5 minutes à 14 000 tours par minute.

L'expression de la luciférase est analysée par quantification des photons émis lors de la réaction enzymatique entre la protéine étudiée, présente dans les échantillons, et 50 µL de substrat luciférine (Luciferase Assay Substrate, Promega, Charbonnières, France).

Les analyses de luminescence ont été réalisées sur 2 µL d'échantillon durant 1s, avec un luminomètre Centro LB960 XS (Berthold, Thoiry, France).

En parallèle, la quantité de protéines est déterminée à l'aide d'un dosage par l'acide bicinchoninique, en diluant 15 µL d'échantillon dans 1 mL de BCA mix (kit BCA assay, Pierce, Brebières, France). Après 30 min dans un bain-marie à 56°C, la densité optique est lue à 562 nm.

L'activité de la luciférase est exprimée en Relative Light Units (RLU, unités relatives de lumière intégrées sur 10s), et normalisée par mg de protéine. Toutes les expérimentations sont réalisées en triplicat.

3.2.8 Tests MTT

Les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits (5 000 cellules/puits dans 100 µL de milieu complet), puis après 24h, 20 µL des différents échantillons (pour atteindre 80 µM de

lipide) ont été ajoutés. Après 24h, les puits sont complétés avec 100 μ L de milieu complet frais.

Quarante-huit heures après l'ajout des échantillons, le milieu de culture est remplacé par 200 μ L de milieu RPMI sans sérum, au quel on ajoute 20 μ L d'une solution de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), préparée à une concentration de 5 mg/mL dans du PBS. Après 4h d'incubation à 37°C, le surnageant est délicatement retiré et 100 μ L de DMSO sont ajoutés afin de dissoudre les cristaux de formazan qui se sont formés.

Les résultats de viabilité cellulaire sont obtenus en comparaison des cellules non traitées, après mesure de la DO à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Bio-Rad model 550, Marnes-la-Coquette, France).

Références Bibliographiques

-
- ¹Karlsson, K. A.: Sphingolipid long chain bases. *Lipids* **1970** ; 5 : 878-91.
- ²Liu, G.; Kleine, L.; Hebert, R.: Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. *Crit Rev. Clin Lab Sci* , **1999** ; 36 : 511-73.
- ³Oswald, P.; Pieranski, P.: "les cristaux liquides" *Gordon and Breach Science Publishers*, **2000**, Tome 1, 52-53.
- ⁴Wansungu, L.; Hoekstra, D.: Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release* **2006**, 116, 255-264.
- ⁵Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.-R.; Schuber, F.: Les liposomes aspect technologique, biologiques et pharmacologique. *Les éditions INSERM* **1993**.
- ⁶Bangham, A. D.; Horne, R. W.: Negative straining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **1964**, 8, 660-668.
- ⁷Machy, P.; Leserman, L. : les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie, *Edition inserm* **1987**.
- ⁸Viniegra, S.; Franco, J.; Cortes, E.: Incorporation of bovine thyroïde peroxydase in liposomes. *Int. J. Biochem.* **1984**, 16, 1167-1170.
- ⁹Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isac, T.: Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarisation and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, 311, 330-348.
- ¹⁰Jain, M. K.: Role of cholesterol in biomembranes and related systems. *Curr. Top. Membr. Transp.* **1975**, 6, 1-57.
- ¹¹Szoka, F.; Papahadjopoulos, D.: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, 9, 467-508.
- ¹²Gregoriadis, G., Senior, J.: The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from circulation. *FEBS Lett.* **1980**, 119, 43-46.
- ¹³Senior, J.; Gregoriadis, G.: Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol component. *Life Sci.* **1982**, 30, 2123-2136.
- ¹⁴Klibanov, L. A.; Maruyama, K.; Vladimir P.; Torchilin, V. P.; Huang, L.: Amphiphilic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **1990**, 268, 235-237.
- ¹⁵Woodle, M. C.; Lasic, D. D.: Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta.* **1992**, 1113, 2, 171-99.
- ¹⁶Torchilin, V. P.; Omelyanenko, V. G.; Papisov, M. I.; Bogdanov, A. A. Jr.; Trubetskoy, S. S.; Herron, J. N.; Gentry, C. A.: Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta.* **1994**, 1195, 11-20.
- ¹⁷Mohamed, H.; Gaber, M. M.; Ghannam, S. A.; Ali, W.; Khalil, A.: Interaction of Doxorubicin with phospholipid monolayer and liposomes. *Biophys Chem*, **1998**, (70), 223-2 .
- ¹⁸Touitou, E.; Godina, B.; Dayana, N.; Weissa, C.; Piliponskyb, A.; Levi-Schaffer, F.: Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier. *Biomaterials*, **2001**, 22, 3053-3059.
- ¹⁹Torchilin, V. P.; Levchenko, T. S.; Whiteman, K. R.; Yaroslavov, A. A.; Tsatsakis, A. M.; Rizos, A. K.; Michailova, E. V.; Shtilman, M. I.: Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials*, **2001**, 22, 3035-3044.

-
- ²⁰Moghimia, S. M.; Szebenib, J.: Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, **2003**, *42*, 463-478.
- ²¹Maeda, H.; Sawaa, T.; Konnob, T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J. Control. Release*, **2001**, *74*, 47-61.
- ²²Yingjuan, L.; Low, P. S.: Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug. Deliver. Rev*, **2002**, *54*, 675-693.
- ²³Pan, X. Q.; Wang, H.; Lee, R. L.: Antitumor Activity of Folate Receptor-Targeted Liposomal Doxorubicin in a KB Oral Carcinoma Murine Xenograft Model. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 417-422.
- ²⁴Ishida, O.; Maruyama, K.; Tanahashi, H.;Iwatsuru, M.; Sasaki, K.; Eriguchi, M.; Yanagie, H.: Liposomes Bearing Polyethyleneglycol-Coupled Transferrin with Intracellular Targeting Property to the Solid Tumors In Vivo. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1042-1048.
- ²⁵Dagar, S.; Krishnadas, A.; Rubinstein, I.; Blend, M. J.; Önyüksel, H.: VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies. *J. Control. Release*, **2003**, *91*, 123-133.
- ²⁶Patrick, D. G. L.; Depovere, P.: Chimie pharmaceutique, *De Boeck Université*, **2002**, 223-224.
- ²⁷Nair,S.; Buiting,A. M.; Rouse, R. J.; Van Roojijen, N.;Huang, L.; Rouse, B. T.: Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *Int Immunol* **1995**, *7*, 679-688.
- ²⁸Alving, C. R.; Koulchin, V.; Glenn, G. M.; Rao, M.: Liposomes as Carriers of Peptide Antigens: Induction of Antibodies and Cytotoxic T Lymphocytes to Conjugated and Unconjugated Peptides. *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 5-31.
- ²⁹Tartour, E.; Ciree, A.; Haicheur, N.; Benchetrit, F.; Fridmann, W. H.: Development of non-live vectors and procedures (liposomes, pseudo-viral particles, toxin, beads, adjuvantsellipsis) as tools for cancer vaccines. *Immunol. Lett.* **2000**, *74*, 45-50.
- ³⁰Garcia, M.; Alsina, M. A.; Reig, F.; Haro, I.: Liposomes as vesicles for presentation of a synthetic peptide containing an epitope of epatitis A virius. *Vaccine*, **1999**, *18*, 276-283.
- ³¹Gregoriadis, G.; Panagiotidi, C.: Immunoadjuvant action of liposomes : comparison with other adjuvants. *Immunol. lett.* **1989**, *20*, 237-240.
- ³²Alvin, C. R.; Koulchin, V.; Glenn,G. M.; Rao, M.: Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 5-31.
- ³³Watson, J. D.; Crick, F. H.: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid *Nature* **1953**,*171*, 4356, 737-8.
- ³⁴International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- ³⁵Schmidt-Wolf, G. D.; Schmidt-Wolf, I. G.: Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update *Trends. Mol. Med.* **2003**, *9*, 2, 67-72.
- ³⁶Ruitenberg, M. J.; Eggers, R.; Boer, G. J.; and Verhaagen, J.: Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods* **2002**, *28*, 182-194.
- ³⁷Lai, C. M.; Lai, Y. K.; and Rakoczy, P. E.: Adenovirus and adeno-associated virus vectors *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 895-913.
- ³⁸Lebon. B.; thèse : Nouveau vecteurs synthétiques fonctionnels pour le transfert de gènes **2003**, 17-19.

-
- ³⁹Lasic, D. D.; Templeton, N. S.: Liposomes in gene therapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1996**, *20*, 221-266.
- ⁴⁰Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 7413-7417.
- ⁴¹Pinnaduwege, P.; Schmitt, L.; Huang, L.: Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells *Biochim. Biophys. Acta.* **1989**, *985*, *1*, 33-37.
- ⁴²Tang, F.; Hughes, J. A.: Synthesis of a single-tailed cationic lipid and investigation of its transfection. *J Control Release.* **1999**, *62*, *3*, 345-358.
- ⁴³Noguchi, A.; Furuno, T.; Kawaura, C.; Nakanishi, M.: Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes *FEBS Lett.* **1998**, *433*, 169-173.
- ⁴⁴Nakanishi, M.; Noguchi, A. : Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 197-207.
- ⁴⁵J.P. Behr, J.P.; Demeneix, B.; Loeffler, J.P.; Mutul, J.P.: Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 6982-6986.
- ⁴⁶Yingyongnarongkul, B.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M.: Solid-phase synthesis of 89 polyamine-based cationic lipids for DNA delivery to mammalian cells *Chemistry.* **2004**, *10*, 463- 473.
- ⁴⁷Wyman, T. B.; Nicol, F.; Zelphati, O.; Scaria, P. V.; Plank, C.; Szoka Jr. F. C.: Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers *Biochemistry* **1997**, *36*, 3008-3017.
- ⁴⁸Hirsch-Lerner, D.; Zhanga, M.; Eliyahua, H.; Ferrarib, M. E. Wheelerb, C. J.; Yechezkel Barenholza, Y.: Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1714*, 71-84.
- ⁴⁹Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L.: he role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1235*, 289-295.
- ⁵⁰Boussif, O.; Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Kolbe, H.V.J.; Vierling, P.: Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid *J. Gene Med.* **2001**; *3*, 109-114.
- ⁵¹El-Aneed, A.: An overview of current delivery systems in cancer gene therapy *J. Control. Release* **2004**, *94*, 1 - 14.
- ⁵²Wu, G. Y.; Wu, C. H.: Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429- 4432.
- ⁵³Ward, C. M.; Read, M. L.; Seymour, L. W.: Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy *Blood* **2001**, *97*, 2221-2229.
- ⁵⁴Pouton, C.W.; Lucas, P.; Thomas, B.J.; Uduehi, A.N.; Milroy, D.A.; Moss, S.H.: Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids *J. Control Release* **1998**, *53*, 289-299.
- ⁵⁵Brown, M.D.; Schatzlein, A.; Brownlie, A.; Jack, V.; Wang, W.; Tetley, L.; Gray, A. I.; Uchegbu, I. F.: Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 880- 891.

-
- ⁵⁶Shibata, A.; Yamamoto, M. Y.; Yamashita, T. Y.; Chiou, J. S.; Kamaya, H.; Ueda, I.: Biphasic effects of alcohols on the phase transition of poly(L-lysine) between alpha-helix and beta-sheet conformations. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5728–5733.
- ⁵⁷Kunath, K.; von Harpe, A.; Fischer, D.; Petersen, H.; Bickel, U.; Voigt, K.; Kissel, T.: Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine *J. Control. Release* **2003**, *89*, 113–125.
- ⁵⁸Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsasser, H. P.; Kissel, T.: A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1273–1279.
- ⁵⁹Wightman, L.; Kircheis, R.; Rössler, V.; Carotta, S.; Ruzicka, R.; Kursa, M.; Wagner, E. L.: Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 362–372.
- ⁶⁰Chollet, P.; Favrot, MC.; Hurbin, A.; Coll, J.L.: Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J. Gene Med.* **2002**, *4*, 84–91.
- ⁶¹Romberg, B.; Hennink, W.E.; Storm, G.: Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 55-7.
- ⁶²Krafft, M. P.; Riess, J. P.: Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie*, **1998**, *80*, 489-514.
- ⁶³Riess, J. G.: Fluorinated vesicles. *J. Drug Target.* **1994**, *2*, 455-468.
- ⁶⁴Sadtler, V. M.; Giulieri, F.; Krafft, M.P.; Riess, J.G. : Micellization and Adsorption of Fluorinated Amphiphiles : questioning the $1CF_2 \approx 1,5CH_2$ rule. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 10, 1952-1956.
- ⁶⁵Riess, J. G.: Oxygen Carriers (“Blood Substitutes”)—Raison d’Etre, Chemistry, and Some Physiology. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2797-2919.
- ⁶⁶Riess, J. G.; Le Blanc, M.: Solubility and transport phenomena in perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2383.
- ⁶⁷Klein, E.; Kerth, P.; Lebeau, L.: Enhanced selective immobilization of biomolecules onto solid supports coated with semifluorinated self-assembled monolayers *Biomaterials* **2008**, *29*, 204-214.
- ⁶⁸Tsibouklis, J.; Stone, M.; Thorpe, A. A.; Graham, P.; Barbu, E.; Eaton, P. J.; Smith, J. R.; Nevell, T. G.; Ewen, R. J.: Fluoropolymer coatings with inherent resistance to biofouling. *Surf Coat. Int. B.* **2002**, *85*, 301-308.
- ⁶⁹Lebeau, L.; Lach, F.; Venien-Bryan, C.; Renault, A.; Dietrich, J.; Jahn, T.; Palmgren, M. G.; Kuhlbrand, W.; Mioskowski, C.: Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 639-647.
- ⁷⁰Gaines, Jr. G. L.: Surface activity of semifluorinated alkanes: $F(CF_2)_m(CH_2)_nH$ *Langmuir* **1991**, *7*, 3054-3056.
- ⁷¹Turberg; M. P.; Brady, J. E.: Semifluorinated hydrocarbons: primitive surfactant molecules *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7797-7801.
- ⁷²Ferro, Y.; Krafft, M. P.: Incorporation of semi-fluorinated alkanes in the bilayer of small unilamellar vesicles of phosphatidylserine: impact on fusion kinetics. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, *1581*, 11-20.
- ⁷³Chaudier, Y.; Zito, F.; Barthélémy, P.; Stroebel, D.; Améduri, B.; Popot, J. L.; Pucci, B.: Synthesis and Preliminary Biochemical Assessment of Ethyl-Terminated Perfluoroalkylamine Oxide Surfactants *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1587-1590.

-
- ⁷⁴Lebaupain, F.; Salvay, A. G.; Olivier, B.; Durand, G.; Fabiano, A. S.; Michel, N.; Popot, J. L.; Ebel, C.; Breyton, C.; Pucci, B.: Lactobionamide Surfactants with Hydrogenated, Perfluorinated or Hemifluorinated Tails : Physical-Chemical and Biochemical Characterization *Langmuir* **2006**, *22*, 8881-8890.
- ⁷⁵Chabaud, E.; Barthélémy, P.; Mora, N.; Popot, J. L.; Pucci, B.: Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants. *Biochimie*. **1998**, *80*, 515-30.
- ⁷⁶Olson, C. T.; Andersen, M.E.: the acute toxicity of perfluorooctanoic and perfluorodecanoic acids in male rats and effects on tissue fatty acids. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **1983**, *70*, 362-372.
- ⁷⁷Maurizis, J. C.; Azim, M.; Rapp, M.; Pucci, B.; Pavia, A.; Madelmont, J.C.; Veyre, A. Disposition in rat of a new fluorinated biocompatible, non-ionic telomeric carrier, *Xenobiotica*, **1994**, *24*, 535-541.
- ⁷⁸Ravily, V.; Santaella, C.; Vierling, P.: Membrane permeability and stability in buffer and in human serum of fluorinated di-O-alkylglycerophosphocholine-based liposomes *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1285*, 79-90.
- ⁷⁹Gadras, C.; Santaella, C.; Vierling, P.: Improved stability of highly fluorinated phospholipid-based vesicles in the presence of bile salts *J. Control. Release* **1999**, *57*, 29-34.
- ⁸⁰Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J.: Highly fluorinated amphiphiles as drug and gene carrier and delivery systems *J. Fluorine Chem.* **2001**, *107*, 337-354.
- ⁸¹McIntosh, T.J.; Simon, S.A.; Vierling, P.; Santaella, C.; Ravily, V.: Structure and interactive properties of highly fluorinated phospholipid bilayers *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1853.
- ⁸²Ravily, V.; Santaella, C.; Vierling, P.; Gulik, A.: Phase behavior of fluorocarbon di-O-alkyl-glycerophosphocholines and glycerophosphoethanolamines and long-term shelf stability of fluorinated liposomes *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1324*, 1-17.
- ⁸³Clary, L.; Verderone, G.; Santaella, C.; Vierling, P.; Chang, P.: Polymorphic phase behavior of fluorocarbon double-chain phosphocholines derived from diaminoopropanol, serine and ethanolamine and long-term shelf stability of their liposomes *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *86*, 21-35.
- ⁸⁴Clary, L.; Gadras, C.; Greiner, J.; Rolland, J.P.; Santaella, C.; Vierling, P.; Gulik, A.: Phase behavior of fluorocarbon and hydrocarbon double-chain hydroxylated and galactosylated amphiphiles and bolaamphiphiles. Long-term shelf-stability of their liposomes *Chem. Phys. Lipids* , **1999**, *99*, 125-137.
- ⁸⁵Clary, L.; Verderone, G.; Santaella, C.; Vierling, P.: Membrane permeability and stability of liposomes made from highly fluorinated double-chain phosphocholines derived from diaminoopropanol, serine or ethanolamine *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1328*, 55-64.
- ⁸⁶Rolland, J. P.; Santaella, C.; Monasse, B.; Vierling, P.: Miscibility of binary mixtures of highly fluorinated double-chain glycerophosphocholines and 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) *Chem. Phys. Lipids*, **1997**, *85*, 135-143.
- ⁸⁷Gaucheron, J.; Santaella, C.; Vierling, P.: Miscibility of binary mixtures of highly fluorinated double-chain glycerophosphocholines and 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 114 - 128.
- ⁸⁸Krafft, M. P.; Goldmann, M. Monolayers made from fluorinated amphiphiles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 243-250.
- ⁸⁹Ravily, V.; Clary, L.; Santealla, C.; Vierling, P.; Duportail, G. : Molecular order and mobility within membranes made from fluorocarbon/fluorocarbon and fluorocarbon/hydrocarbon double-chain ether and amide phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *90*, 75-86.
- ⁹⁰Sadtler, V. M.; Giulieri, F.; Krafft, M.P.; Riess, J.G. Micellization and Adsorption of Fluorinated Amphiphiles: Questioning the 1CF₂-1.5CH₂ Rule. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1952-1956.

-
- ⁹¹ Lebeau, L.; Lach, F.; Venien-Bryan, C.; Renault, A.; Dietrich, J.; Jahn, T.; Palmgren, M. G.; Kuhlbrand, W.; Mioskowski, C. Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 639-647.
- ⁹² Li, W. T.; Yanga, Y. M.; Chang, C. H.: Langmuir monolayer behavior of an ion pair amphiphile with a double-tailed cationic surfactant *Colloid Surface B* **2008**, *66*, 187-194.
- ⁹³ Hossaina, M. M.; Iimura, K. I.; Kato, T.: Interactions of l-arginine with Langmuir monolayers of di-n-dodecyl hydrogen phosphate at the air-water interface *J. Colloid. Interface Sci.* **2006**, *1*, 200-207.
- ⁹⁴ Schwickert, H.; Strobi, G.; Kimmig, M.: Molecular dynamics in perfluoro-*n*-eicosane. I. Solid phase behaviour and crystal structures *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 4, 2800-2806.
- ⁹⁵ Roper, M. H.; Stébé, M. J.: Effect of the molecular structure of non-ionic fluorinated surfactants on their phase behaviour in water *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4029-4036.
- ⁹⁶ Lehmler, H. J.; Oyewumi, M. O.; Jay, M.; Bummer, P. M.: Behavior of fluorinated carboxylic acids at the air-water interface *J. Fluorine. Chem.* **2001**, *107*, 141-146.
- ⁹⁷ Hirshfeld, C. L.; Seul, M.: Critical mixing in monomolecular films: pressure-composition phase diagram of a two-dimensional binary mixture. *J. Phys.* 1990, *51*, 1537-1552.
- ⁹⁸ Rolland, J.P.; Santaella, C.; Vierling, P.: Molecular packing of highly fluorinated phosphatidylcholines in monolayers *Chem. Phys. Lipids*, **1996**, *79*, 71-77.
- ⁹⁹ R. Elbert, T. Folda, H. Ringsdorf: Saturated and Polymerizable Amphiphiles with Fluorocarbon Chains. Investigation in Monolayers and Liposomes *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7687-7692.
- ¹⁰⁰ <http://materiaux.ecam.fr/savoirplus/dsc/dscla.html>
- ¹⁰¹ http://smx.epfl.ch/webdav/site/smx/shared/2007/TPII_DSC_LP.pdf
- ¹⁰² Huang, C.; Li, S.: Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behaviour of membrane phospholipids *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1422*, 273-307.
- ¹⁰³ Santaella, C.; Vierling, P.; Riess, J. G.; Gulik-Krzywicki, T.; Gulik, A.; Monasse, B.: Polymorphic phase behavior of perfluoroalkylated phosphatidylcholines *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1190*, 25-39.
- ¹⁰⁴ Ladbroke, B. D.; Chapman, D.: Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes a review and summary of some recent studies *Chem. Phys. Lipids*, **1969**, *3*, 304-356.
- ¹⁰⁵ Kevin, M. G.; Taylor, K. M. G.; Morris, R. M.: Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes *Thermochim. Acta.* **1995**, *248*, 289-301.
- ¹⁰⁶ Camerel, F.; Ulrich, G.; Barbera, J.; Ziessel, R.: Ionic self-assembly of Ammonium-based Amphiphiles and Negatively Charged Bodipy and Porphyrin Luminophores *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2189-2200.
- ¹⁰⁷ Koltover, I.; Salditt, T.; Rädler, J. O.; Safinya, C. R.: An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **1998**, *3*, 281, 5373, 78-81.
- ¹⁰⁸ Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L.: The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 289-295.
- ¹⁰⁹ Orgis, M.; Steinlein, P.; Kursa, M.; Mechtler, K.; Kircheis, R.; Wagner, E.: The size of DNA/transferring-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1425-1433.

-
- ¹¹⁰Kichler, A.; Zauner, W.; Ogris, M.; Wagner, E.: Influence of the DNA complexation medium on the transfection efficiency of lipospermine/DNA Particles. *Gene Ther.* **1998**, *5*, 855-860.
- ¹¹¹Farrell, L. L.; Pepin, J.; Kucharski, C.; Lin, X.; Xu, Z.; Uludag, H. A.: comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC). *Eur J Pharm Biopharm.* **2007**; *65*:388-397.
- ¹¹²Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Sbirrazzuoli, N.; Bouscif, O.; Vierling, P.: In Vitro Cationic Lipid-Mediated Gene Delivery with Fluorinated Glycerophosphoethanolamine Helper Lipids *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 949-963.
- ¹¹³Labat-Moleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E.; Behr, J. P.: An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines *Gene Ther.* **1996**; *3*, 11, 1010-1017.
- ¹¹⁴Green, T. W.; Wuts, P. G. M.: Protective Groups in organic synthesis third edition *Wiley-Interscience*, **1999**, 663.
- ¹¹⁵Cox, J. R. Jr.; Ramsay, J. O. B.: Mechanisms of Nucleophilic Substitutions in phosphates esters *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 317-352.
- ¹¹⁶Lestinger, R. L.; Finnan, J. L.; Heavner, G. A.; Lunsford, W. B.: Nucleotide chemistry. XX. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278-3279.
- ¹¹⁷Tomohisa, N.; Takehisa, K.: New phosphorylating agents for general synthesis of mixed phosphate esters. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, *21*, 2375-2378.
- ¹¹⁸Amarnath, V.; Broom, A.D.: Chemical Synthesis of Oligonucleotides *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 183-217.
- ¹¹⁹Engels, J. W.; Uhlmann, E.: Gene Synthesis [New Synthetic Methods] *Angew. Chem.* **1989**, *28*, 716-734.
- ¹²⁰Halsall, T. G.; Hands, A. R.: Synthesis of terpenes. VI. Some reactions of 3-methylbutane-1,3-diol. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 3251-3254.
- ¹²¹Scheit, K. H.: Die benzylester von desoxydinucleosidphosphaten und 5'-O- β,β,β) trichloräthylphosphorylthymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5') thymidin *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3243-3247.
- ¹²²Elizabeth, K.; Hendrickson, H.; Hendrickson, S.: Efficient synthesis of cholinephosphate phospholipid headgroup *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *109*, 203-207.
- ¹²³Francisco Caturla, F.; Enjo, J.; Bernabeu, C.; Le Serre, S.: New fluorescent probes for testing combinatorial catalysts with phosphodiesterase and esterase activities *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1903-1911.
- ¹²⁴Gajewiak, J.; Xu, Y.; Lee, S. A.; Kutateladze, T. G.; Prestwich, G. D.: Synthesis and Molecular Recognition of Phosphatidylinositol-3-methylenephosphate *Org. Lett.* **2006**, *8*, *13*, 2811-2813.
- ¹²⁵Kirby, A. J.; Lima, M. F.; da Silva, D.; Roussev, C. D.; Nome, F.: Efficient Intramolecular General Acid Catalysis of Nucleophilic Attack on a Phosphodiester *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, *51*, 16944 -16952.
- ¹²⁶Cocks, S.; Koch, K. R.; Modro, T. A.: Alkylating properties of phosphate esters. 1. Oxygen nitrogen methyl transfer in dimethyl (2-pyridylmethyl) phosphate *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 265-7.
- ¹²⁷Van Boom, J. H.; Burgers, P. M. J.; Crea, R.; Van der Marel, G.; Wille, G.: Synthesis of oligonucleotides with sequences identical with a analogous to the 3'-end of 16S ribosomal RNA of Escherichia coli: preparation of m⁶₂A-C-C-U-C-C and A-C-C-U-C-m⁴₂C via phosphotriester intermediates *Nucl. Acids Res.* **1977**, *4*, 747-759.
- ¹²⁸Sim, M. M.; Kondo, H.; Wong, C.H.: Synthesis of dibenzyl glycosyl phosphites using dibenzyl N,N-diethylphosphoramidite as phosphitylating reagent: an effective route to glycosyl phosphates, nucleotides, and glycosides *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2513-2514.

-
- ¹²⁹Kluba, M.; Zwierzak, A.: Tetra-*n*-butylammonium Di-*t*-butyl Phosphate. A New, effective Phosphorylating Agent for Alkyl Bromides *Synthesis*, **1978**, 770-771.
- ¹³⁰Menger, F. M.; Wood, M. G. Jr.; Richardson, S.; Zhou, Q.; Elrington, A. R.; Sherrod, M. J.: Chain-substituted Lipids in Monolayer Films. A Study of Molecular Packing. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6797-6803.
- ¹³¹Santaella, C.; Vierling, P.; Riess, J. G.: Highly stable Liposomes from Perfluoroalkylated Glycerophosphocholine *Angew. Chem.* **1991**, *30*, 5, 567-568.
- ¹³²Ravily, V.; Gaentzler, S.; Santaella, C.; Vierling, P.: Synthesis of Highly Fluorinated Di-*O*-alk(en)yl-glycerophospholipids and Evaluation of Their Biological Tolerance *Helv. Chim. Acta.* **1996**, *79*, 405-425.
- ¹³³Guivisdalsky, P. N.; Bittman, R.: An Efficient Stereocontrolled Route to Both Enantiomers of Platelet Activating Factor and Analogues with Long-chain Esters at C2: Saturated and Unsaturated Ether Glycerolipids by Opening of Glycidyl Arenesulfonates *J. Org. Chem.* , **1989**, *54*, 19, 4643-4648.
- ¹³⁴Karantonis, H. C.; Pitsinos, E. N.; Antonopoulou, S.; Couladouros, E. A.; Demopoulos, C. A.: Synthesis and biological evaluation of novel steroid-modified ether phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *138*, 12-19.
- ¹³⁵Chen, Q.-Y.; Huang, X.-T.: Nickel(0)-Catalyzed Fluoroalkylation of Alkenes, Alkynes, and Aromatics with Perfluoroalkyl Chlorides *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4651-4656.
- ¹³⁶Chen, Q.-Y.; Yang, Z.-Y.; He, Y.-B.: Solvent effects on the reaction of 4-chlorooctafluorobutyl iodide with copper *J. Fluorine Chem.* **1987**, *37*, 171-176.
- ¹³⁷Hu, C.-M.; Qing, F.-L.: A redox-initiated per(poly)fluoroalkylation of olefins by per(poly)fluoroalkyl chlorides *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6348-6351.
- ¹³⁸Chen, Q.-Y.; Long, Z.-Y.: The Activation of Carbon-Chlorine Bonds in Per- and Polyfluoroalkyl Chlorides: DMSO-Induced Hydroperfluoroalkylation of Alkenes and Alkynes with Sodium Dithionite *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4775-4782.
- ¹³⁹Yang, X.; Yuan, W.; Gu, S.; Yang, X.; a, Xiao, F.; Shen, Q.; Wu, F.: Na₂S₂O₄ initiated free radical additions of polyfluoroalkyl halides to 4-pentenamides *J. Fluorine Chem.* **2007**, *128*, 540-544.
- ¹⁴⁰Liu, J.-Y.; Jang, Y.-J.; Lin, W.-W.; Liu, J.-T.; Yao, C.-F.: Triethylaluminum- or Triethylborane-Induced Free Radical Reaction of Alkyl Iodides and ,-Unsaturated *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4030-4038.
- ¹⁴¹N. O. Brace : Long Chain Alkanoic and Alkenoic Acids with Perfluoroalkyl Terminal segment *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 12, 4491-4498.
- ¹⁴²N. O. Brace : Facile elimination of fluoride ion in the dehydrohalogenation of 3-iodo-4-(perfluoroalkyl)butanoic acids. Preparation of fluorinated sorbic acid analogs *J. Org. Chem.* 1970, *36*, 14, 1904-1909.
- ¹⁴³Martin, F. J.; Papahadjopoulos, D.: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 286-288.
- ¹⁴⁴Frisch, B.; Boeckler, C.; Schuber, F.: Synthesis of Short Polyoxyethylene-Based Heterobifunctional Cross-Linking Reagents. Application to the Coupling of Peptides to Liposomes *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 180-186.
- ¹⁴⁵Pan, Y.; Holmes, C. P.: A Traceless Perfluoroalkylsulfonyl (PFS) Linker for the Deoxygenation of Phenols *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2769-2771.
- ¹⁴⁶Wang, J.-S.; Zhang, H.-Z.; Huang, W.-Y.; Jiang, X.-K.: Stereochemistry of hydrogen peroxide - acetic acid oxidation of ursolic acid and related compounds. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10459-10466.

-
- ¹⁴⁷ Achilefu, S.; Mansuy, L.; Selve, C.; Thiebaut, S.: Synthesis of 2H,2H-perfluoroalkyl and 2H-perfluoroalkenyl carboxylic acids and amides *J. Fluorine. Chem.* **1995**, *70*, 19-26.
- ¹⁴⁸ Jennings, M. P.; Cork, E. A.; Ramachandran, P. V.: A Facile Synthesis of Perfluoroalkyl Vinyl Iodides and Their Palladium-Mediated Cross-Coupling Reactions *J. Org. Chem.* **2000**, 8763-8766.
- ¹⁴⁹ Chung, S. K.: Stereochemistry in the Reduction of Vinyl Bromides with Lithium Aluminum Hydride *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3513-3514.
- ¹⁵⁰ Baer, E.: L- α -Glycérophosphoric Acid *Biochem. Prep.* **1952**, *2*, 31-38.
- ¹⁵¹ Jackson, D. Y.: An Improved Preparation of (+)-2,3-O-Isopropylidene-D-Glyceraldehyde *Synthetic Commun.* **1988**, *18*, 337-341.
- ¹⁵² Kurtz, M.; Scriba, G. K. E.: Drug-phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization, and degradation by pancreatic phospholipase A2 *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *107*, 143-157.
- ¹⁵³ Chevallerier, J.; Sakai, N.; Robert, F.; Kobayashi, T.; Gruengerg, J.; Mathile, S.: Rapid Access to Synthetic Lysobisphosphatidic Acids Using P^{III} Chemistry *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1859-1861.
- ¹⁵⁴ Bierer, D. E.; Dubenko, L. G.; Litvak, J.; Gerber, R. E.; Chu, J.; Thai, D.L.; Tempesta, M. S.; Truong, T. V.: Synthesis of (2R)- and (2S)-.beta.-D-Glucopyranos-1-yl-2-O-palmitoyl-3-O-phosphatidylcholinylglycerol: A New Antifungal Phosphocholine *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 7646-7653.
- ¹⁵⁵ Ulrich Massing, U.; Kley, J.T.; Laura Gürtesch, L.; Fankhaenel, S.: A simple approach to DOTAP and its analogs bearing different fatty acids *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *105*, 189-191.
- ¹⁵⁶ Sou, K.; Endo, T.; Takeoka, S.; Tsuchida, E.: Poly(ethylene glycol)-Modification of the Phospholipid Vesicles by Using the Spontaneous Incorporation of Poly(ethylene glycol)-Lipid into the Vesicles *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 372-379.
- ¹⁵⁷ Jackson, D. Y.: An Improved Preparation of (+)-2,3-O-Isopropylidene-D-Glyceraldehyde *Synthetic. Commun.* **1988**, *18* (4), 337-341.
- ¹⁵⁸ Pack, W.D.; Chen, G.; Maloney, K. M.; Chen, C. T.; Arnold, H. F.: A Metal-Chelating Lipid for 2D Protein Crystallization Via Coordination of Surface Histidines *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2479-2487.
- ¹⁵⁹ Jaeger, D. A.; Jamrozik, J.; Golich, T.G.; Clennan, W. M.; Mohebalian, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3001-3006.

Développement d'une nouvelle famille d'amphiphiles fluorés pour la délivrance d'agents thérapeutiques.

La vectorisation est une opération visant à maîtriser la distribution d'un principe actif dans l'organisme en l'associant à un vecteur spécifique. Ces vecteurs doivent être conçus de façon à (1)-protéger la molécule active, et protéger l'hôte, entre le site d'administration et les cellules cibles, (2)-améliorer le franchissement de barrières physiologiques et (3)-accroître leur spécificité pour la cible visée. Des efforts importants sont encore nécessaires afin d'améliorer la stabilité et les performances des formes galéniques à base de lipides et d'augmenter l'efficacité et l'innocuité de la forme médicamenteuse administrée.

Dans cette thèse, nous avons développé une nouvelle classe de composés lipidiques qui présentent des propriétés d'auto-assemblage originales, conférant aux associations en question une stabilité accrue dans les fluides biologiques.

Ce travail repose sur une utilisation originale des propriétés physico-chimiques des composés fluorés. Nous avons mis au point la synthèse d'une nouvelle génération d'outils lipidiques localement fluorés possédant des caractéristiques structurales inédites. Les caractéristiques physicochimiques de ces composés ont été étudiées, puis leurs propriétés d'auto-assemblage ont été évaluées. Enfin, nous avons testé des formulations de liposomiales pour leurs propriétés d'encapsulation et des lipoplexes pour leur potentiel en transfection.

Mots-clefs : phospholipides fluorés, liposomes, lipides cationiques fluorés, lipoplexes, transfection.

Development of a new amphiphilic fluorinated family for drug delivery.

Vectorization is an operation aiming at controlling the distribution of drugs in organism by associating it with specific vector. These vectors must be in order to (1) - protect the active molecule, and protect the host, between the administration site and the target cells, (2) - improve crossing of physiological barriers and (3) - increase their specificity for the target concerned. Significant efforts are still necessary in order to improve the stability and the performances of the galenic forms containing lipids and to increase the effectiveness and the harmlessness of the drugs.

In this project, we propose to develop a new class of lipidic compounds which present original properties of self-assembly, and confer to this self-assembly an increased stability in the biological fluids.

This original project uses the physicochemical properties of the fluorinated compounds. With this intention, we developed the synthesis of a new lipidic generation tools locally fluorinated having new structural characteristics.

Initially, the physico-chemical characteristics of these compounds were studied, then their properties of self-assembly were evaluated. Lastly, we tested the properties of encapsulation in liposomes formulations and the transfection properties in lipoplexes formulations.

Keywords : fluorophospholipide, liposomes, cationic fluoro lipids, lipoplexes, transfection, gene delivery.