

Thèse

"Conception et utilisation de constructions lipidiques polymérisées pour la solubilisation de molécules hydrophobes en milieu aqueux"

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Organique

par

Cédric THAUVIN

Soutenue le 6 juillet 2009 devant la commission d'examen :

Prof. Marcel HIBERT (Université de Strasbourg)
Prof. Elias FATTAL (Université Paris XI)
Dr. Eric DORIS (CEA Saclay)
Sabine DELAIRE (CHANEL PARFUMS BEAUTE)
Dr. Stéphane MEUNIER (Université de Strasbourg)
Dr. Charles MIOSKOWSKI (Université de Strasbourg)
Dr. Alain WAGNER (Université de Strasbourg)

Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

A mes grands-pères

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Chimie des Systèmes Fonctionnels de l'Université de Strasbourg sous la direction du Dr Charles Mioskowski puis du Dr Alain Wagner. Je tiens donc tout d'abord à remercier Miko pour m'avoir accueilli dans son groupe à un moment où mon avenir dans la chimie n'était pas certain. J'espère que ces résultats sont à la hauteur de ce que tu avais envisagé. Merci également à Alain pour avoir repris le projet en cours et pour ces corrections rapides.

Notre collaboration avec le service de Recherche et Technologie de la société Chanel Parfums Beauté, lequel m'a également permis de vivre plus que correctement pendant plus de trois ans, m'amène tout naturellement à remercier Sabine Delaire pour son enthousiasme et Adrien Adao. Une pensée également pour Jean-Roger Desmurs ainsi que pour toutes les autres personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant mes visites à Paris et surtout à Sofia Antipolis.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude au Dr Stéphane Meunier, pour m'avoir encadré pendant ces quelques années.

Merci aux différents membres du jury, les Profs. Marcel Hibbert et Elias Fattal ainsi que le Dr. Eric Doris pour avoir accepté de juger ce travail.

Un très grand merci à Liliane, Marianne et Nathalie sans qui la route vers la soutenance aurait été parsemée d'obstacles encore plus nombreux et dont on est loin d'imaginer l'existence.

Merci également à tout le service de microscopie du Dr. Patrick Schultz et plus particulièrement à Christine grâce à qui la TEM n'a plus de secrets pour moi, ou presque.

Merci enfin à Cyril, Pascale et Patrick pour les analyses RMN et masses, surtout celles de la fin.

Il est maintenant temps de remercier tous mes collègues du labo Miko, passés et présents, dont je ne ferai pas la liste au risque d'en oublier. Je citerai quand même Renaud, Olivier,

Jérémy, Anand, Kasinath, Michel, Martin, Manu, Sylvie, Christelle, Corinne, Laure, Samira, Aurélia, Cédric...

Un merci plus particulier à Mathieu qui a rendu la rédaction au labo plus facile, à Cynthia pour son sourire, à Ghyslain pour ses corrections de dernière minute et à Damien pour m'avoir mis un coup de pied au cul quand il le fallait. Nos longues discussions m'ont été d'une grande aide.

Grazie mille Pasquale pour avoir partagé avec moi cette longue rédaction, dans les bons et les mauvais moments, et pour m'avoir fait découvrir la multitude de sauces pouvant accompagner de simples pâtes et le café tellement fort que la cuiller tient toute seule dedans.

Merci Géraldine, qui toi seule résume la chimie : des moments de joies intenses mais aussi de longues prises de tête.

Je ne peux pas oublier tous mes partenaires d'entraînement, qu'ils soient du PCA ou du S2A ainsi que tous mes autres potes qui ont toujours eu de bonnes idées pour me faire oublier une manip qui n'avait pas marché.

Merci à toi Sarah pour m'avoir suivi et supporté (ce qui n'a pas toujours été facile) pendant la *quasi* totalité de mon cursus universitaire.

Merci Nathalie pour avoir été présente lors de l'étape post-soutenance.

Enfin j'aimerais remercier très profondément mes parents qui ont toujours été là tout au long de cette thèse mais aussi et surtout les 23 années qui l'ont précédée.

Notes préliminaires

Une partie de ces travaux a fait l'objet de deux publications, d'un brevet et de deux présentations orales.

Publications

C. Thauvin, S. Rickling, S. Meunier, H. Célia, P. Schultz, C. Mioskowski "Carbon nanotubes as templates for polymerized lipid assemblies" *Nature Nanotechnology* **3**, 743-748 (2008)

Cette lettre a été citée dans la rubrique Editor's choice du journal *Science* **322**, 1164-1165 (2008)

C. Thauvin, A. Perino, E. Contal, E. Morin, S. Meunier, A. Wagner "Programmed dispersion of MWCNTs by coating with photopolymerizable synthetic lipids" en préparation

Brevet

A. Morère, C. Thauvin, S. Meunier, A. Wagner "Procédé de préparation de constructions lipidiques polymérisées" Brevet #63004 déposé en juin 2009

Présentations orales

C. Thauvin, S. Rickling, S. Meunier, P. Schultz, C. Mioskowski : "Formation and use of amphiphilic macromolecules obtained from adsorption of polymerizable lipids on carbon nanotubes surface", Meeting international Nan'Obernai, Obernai, France

C. Thauvin, P. Schultz, H. Célia, S. Meunier, C. Mioskowski : "Conception et utilisation de nano-objets pour la solubilisation de composés hydrophobes", Journée des Doctorants, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France

Sommaire

| | |
|--|----|
| Sommaire..... | 1 |
| Liste des abréviations | 5 |
| Introduction générale..... | 7 |
| Chapitre 1 : Introduction | 9 |
| I. Les auto-arrangements lipidiques | 9 |
| <i>I.1. Les lipides : généralités</i> | 9 |
| <i>I.2. Les auto-arrangements lipidiques</i> | 11 |
| <i>I.3. Gros plan sur les micelles</i> | 13 |
| a – Généralités | 13 |
| b – Formation de micelles | 13 |
| c – Applications offertes par les micelles | 14 |
| d – Les micelles de polymères..... | 14 |
| <i>I.4. Gros plan sur les liposomes</i> | 16 |
| a – Généralités | 16 |
| b – Formation de liposomes | 17 |
| c – Applications offertes par les liposomes | 18 |
| d – Les liposomes polymérisés..... | 19 |
| II. Les auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone | 20 |
| <i>II.1. Les nanotubes de carbone</i> | 20 |
| a – Rappel sur le carbone..... | 20 |
| b – Du fullerène C ₆₀ aux nanotubes de carbone | 22 |
| c – Fiche d'identité des nanotubes de carbone..... | 22 |
| d – Synthèse des nanotubes de carbone..... | 24 |
| e – Propriétés des nanotubes de carbone | 25 |
| Propriétés mécaniques | 25 |
| Propriétés électroniques..... | 27 |
| Propriétés chimiques | 28 |
| <i>II.2. Les auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone</i> | 30 |
| III. Entre micelle et liposome : vers des arrangements polymérisés particuliers | 33 |
| <i>III.1. Synthèses d'arrangements polymérisés particuliers</i> | 33 |
| <i>III.2. Propriétés d'encapsulation</i> | 34 |
| IV. Conclusion | 35 |
| Chapitre 2 : Vers la synthèse des CLP | 37 |
| I. Introduction | 37 |
| <i>I.1. Synthèse du lipide 11,8-NTA</i> | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2. Choix des nanotubes de carbone | 39 |
| a – Etude qualitative sur les différents fournisseurs de nanotubes de carbone | 39 |
| b – Caractéristiques des nanotubes choisis | 41 |
| II. Premier procédé d'obtention des CLP | 42 |
| II.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone..... | 42 |
| II.2. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques | 43 |
| II.3. Polymérisation des arrangements lipidiques | 45 |
| II.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés..... | 46 |
| a – Principes généraux de l'électrophorèse sur gel d'agarose et de l'électroélution | 47 |
| b – Résultats : électrophorèse sur gel d'agarose suivie de l'électroélution..... | 48 |
| c – Résultats : électrophorèse sur gel d'agarose et électroélution combinées | 54 |
| II.5. Isolement des CLP..... | 55 |
| II.6. Récapitulatif expérimental du procédé 1..... | 56 |
| III. Second procédé d'obtention des CLP | 57 |
| III.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone | 57 |
| III.2. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques | 58 |
| III.3. Polymérisation des arrangements lipidiques..... | 59 |
| III.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés | 59 |
| III.5. Isolement des CLP | 61 |
| III.6. Récapitulatif expérimental du procédé 2 | 62 |
| IV. Troisième procédé d'obtention des CLP | 62 |
| IV.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone | 62 |
| IV.2. Polymérisation des arrangements lipidiques | 64 |
| IV.3. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques polymérisés | 65 |
| IV.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés..... | 66 |
| a – Temps et puissance d'ultra-sonication..... | 66 |
| b – Température de l'échantillon..... | 67 |
| c – Ultra-sonication en milieu uniquement organique | 69 |
| IV.5. Isolement des CLP..... | 71 |
| IV.6. Récapitulatif expérimental du procédé 3 | 72 |
| V. Conclusion et perspectives..... | 73 |
| Chapitre 3 : Etude des applications envisagées pour les CLP | 75 |
| I. Introduction | 75 |
| II. Solubilisation de fullerènes C₆₀..... | 76 |
| III. Solubilisation de deux protéines membranaires..... | 78 |
| IV. Solubilisation de composés d'intérêt cosmétique..... | 84 |
| IV.1. Solubilisation d'un pigment..... | 85 |
| IV.2. Solubilisation d'un filtre UV..... | 90 |
| V. Marquage des CLP au diiode..... | 95 |
| VI. Conclusion | 97 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 4 : Vers la synthèse de CLP à base de nouveaux lipides | 101 |
| I. Introduction | 101 |
| II. Vers des lipides contenant des fonctions de type acide carboxylique | 102 |
| <i>II.1. Lipides de type monoacide</i> | 102 |
| a – Lipides saturés | 102 |
| b – Lipides photo-polymérisables | 103 |
| <i>II.2. Lipides de type diacide</i> | 104 |
| a – Lipides saturés | 104 |
| b – Lipides photo-polymérisables | 105 |
| III. Vers d'autres types de lipides | 109 |
| <i>III.1. Synthèse des nouveaux lipides</i> | 109 |
| a – Lipides anioniques | 109 |
| b – Lipides cationiques | 110 |
| c – Lipides neutres..... | 111 |
| <i>III.2. Tests d'adsorption de ces lipides à la surface de nanotubes de carbone</i> | 112 |
| IV. Conclusion | 114 |
| Conclusion générale | 117 |
| Partie expérimentale..... | 121 |

Liste des abréviations

| | |
|---|--|
| AE : acétate d'éthyle | EDC : Hydrochlorure de <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthyl-carbodiimide |
| APCD : acide 10,12-pentacosadiynoïque | ESI : ionisation electrospray |
| BSA : albumine sérique bovine | Et₃N : triéthylamine |
| CH₂Cl₂ : dichlorométhane | Et₂O : éther diéthylique |
| CLHP : chromatographie liquide à haute performance | FRET : transfert d'énergie par résonance |
| CLP : constructions lipidiques polymérisées | g : gramme |
| cm : centimètre | GUV : vésicules unilamellaires géantes |
| CMC : concentration micellaire critique | h : heure |
| CMT : température micellaire critique | H₂O : eau |
| CTAB : hexadécyltriméthyl ammonium | Hz : Herz |
| CVD : décomposition chimique en phase vapeur | IC : ionisation chimique |
| d : doublet | IR : infrarouge |
| DCIP : 2,6-dichlorophénolindo-phénolate de sodium | J : constante de couplage |
| DIPEA : diisopropyléthylamine | kV : kiloVolt |
| DLS : diffraction dynamique de la lumière | l : litre |
| DMEM : milieu minimum essentiel de Dulbecco | LAH : hydrure de lithium et d'aluminium |
| DMF : diméthylformamide | LUV : vésicules unilamellaires de grande taille |
| DMSO : diméthylsulfoxyde | m : multiplet |
| DWNTs : nanotubes de carbone double-parois | mA : milliAmpère |
| | MeCN : acétonitrile |
| | MET : microscopie électronique à transmission |
| | mg : milligramme |
| | MHz : mégaHerz |
| | min : minute |

| | |
|--|--|
| ml : millilitre | RMN : résonnance magnétique nucléaire |
| μl : microlitre | s : singulet |
| MLV : vésicules multilamellaires | SDS : dodécylsulfate de sodium |
| mM : millimolaire | sec : seconde |
| MWNTs : nanotubes de carbone multi- parois | SM : spectre de masse |
| NBS : <i>N</i> -Bromosuccinimide | SUV : vésicules unilamellaires de petite taille |
| NHS : <i>N</i> -Hydroxysuccinimide | SWNTs : nanotubes de carbone simple-paroi |
| nm : nanomètre | T.A. : température ambiante |
| NTA : acide nitrilotriacétique | td : triplet dédoublé |
| Octyl-POE : n-octylpolyoxyéthylène | TFA : acide trifluoroacétique |
| OMC : octyl méthoxycinnamate | THF : tétrahydrofurane |
| OTAB : octyltriméthyl ammonium | TPa : téraPascal |
| PEG : poly-éthylène glycol | TRIS : solution aqueuse de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (100 mM), NaCl (150 mM) tamponnée à pH 8 |
| ppm : partie pour million | UV : ultra-violet |
| q : quadruplet | V : Volt |
| quant. : quantitatif | W : Watt |
| Rdt : rendement | |
| Rf : rapport frontal | |

Introduction générale

La solubilisation en milieux aqueux de molécules hydrophobes, dont font partie un grand nombre de composés biologiquement actifs, est un sujet très en vue du fait des multiples applications qui en découlent. En effet, dans les domaines cosmétiques et pharmaceutiques différents systèmes sont très utilisés pour encapsuler ce type de molécules et ainsi les protéger du milieu extérieur ou les vectoriser vers une cible biologique. L'objectif de cette thèse consiste à proposer un nouveau système en utilisant une technologie développée depuis une dizaine d'années au sein du laboratoire. Celle-ci permet de fournir des nano-objets uniques, appelés constructions lipidiques polymérisées (CLP), résultant d'auto-arrangements de lipides polymérisables à la surface de nanotubes de carbone (Figure 1). Leur structure se rapproche de celle d'un anneau et offre une surface hydrophile et une cavité hydrophobe ouverte sur l'extérieur, ce qui laisse présager des propriétés de solubilisation intéressantes.

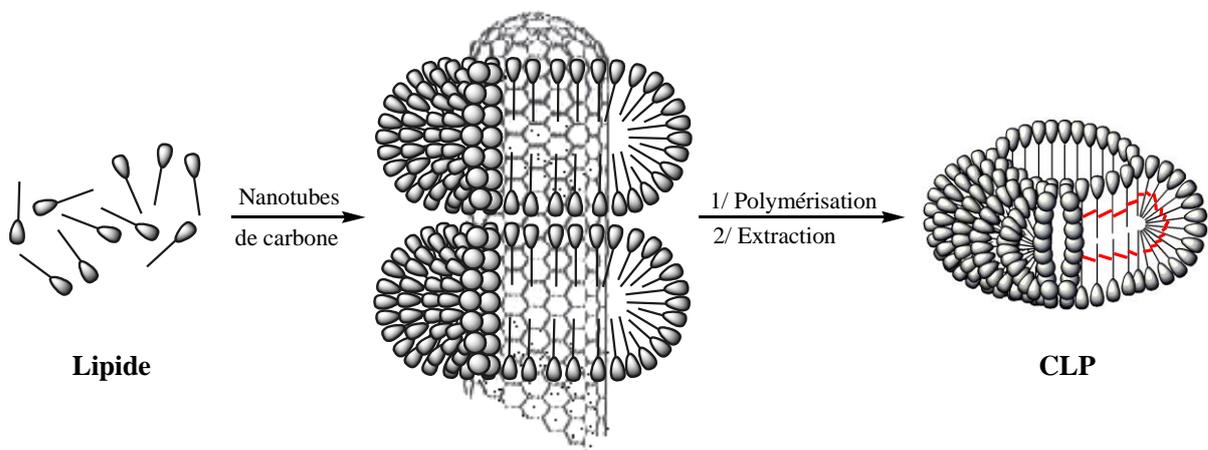


Figure 1 : Procédé général d'obtention des CLP

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres. Dans le premier seront tout d'abord introduits les auto-arrangements lipidiques les plus courants, à savoir les micelles et les liposomes, puis, après une présentation générale des nanotubes de carbone, un état de l'art sur l'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de ces nanomatériaux sera effectué afin de marquer le point de départ de ce sujet. Le second chapitre sera consacré aux différents procédés mis au

point au cours de ce projet en vue de l'obtention de CLP, en utilisant comme lipide de départ le lipide 11,8-NTA (Figure 2).

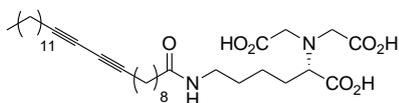


Figure 2 : Structure du lipide 11,8-NTA

Les études relatives au comportement de ces dernières en présence de molécules hydrophobes, en milieux aqueux, seront ensuite discutées dans le troisième chapitre. Enfin, le quatrième chapitre rapportera les résultats obtenus quant au développement de nouveaux lipides élaborés dans le but d'élargir les domaines d'application des CLP.

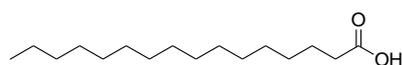
Chapitre 1

Introduction

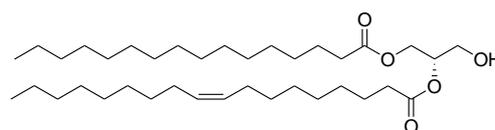
I. Les auto-arrangements lipidiques

I.1. Les lipides : généralités

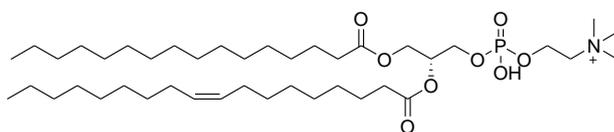
Du fait de leur grande diversité structurale, il n'existe pas encore de définition unique pour les lipides. Cependant, plusieurs études ont été effectuées dans le but d'en fournir une classification, la plus complète possible. Ainsi, en considérant les lipides comme des molécules hydrophobes ou amphiphiles, issues en totalité ou en partie de condensation de thioesters *via* un carbanion et/ou d'isopropènes *via* un carbocation, Fahy *et coll.*¹ en ont recensé huit catégories (Figure 1.1) : les acides gras **A**, les acylglycérols **B**, les phosphoacylglycérols **C**, les sphingolipides **D**, les stérols **E**, les prényls **F**, les saccharolipides **G** et les polykétides **H**. Chaque catégorie peut elle-même se diviser en plusieurs sous-catégories regroupant ainsi tous les dérivés de lipides, parmi lesquels nous pouvons citer les sels d'acides gras (savons) ou autres détergents.



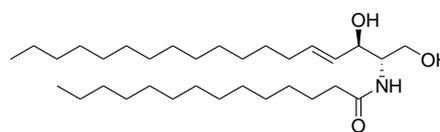
A : acide hexadécanoïque



B : 1-héxadécanoyl-2-(9Z-octadécanoyl)-*sn*-glycérol



C : 1-héxadécanoyl-2-(9Z-octadécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine



D : N-(tétradécanoyl)-sphing-4-énine

¹ Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill Jr. A.H., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S.H., Witztum J.L., Dennis E.A. *J. Lipid Res.* **46** 839-861 (2005)

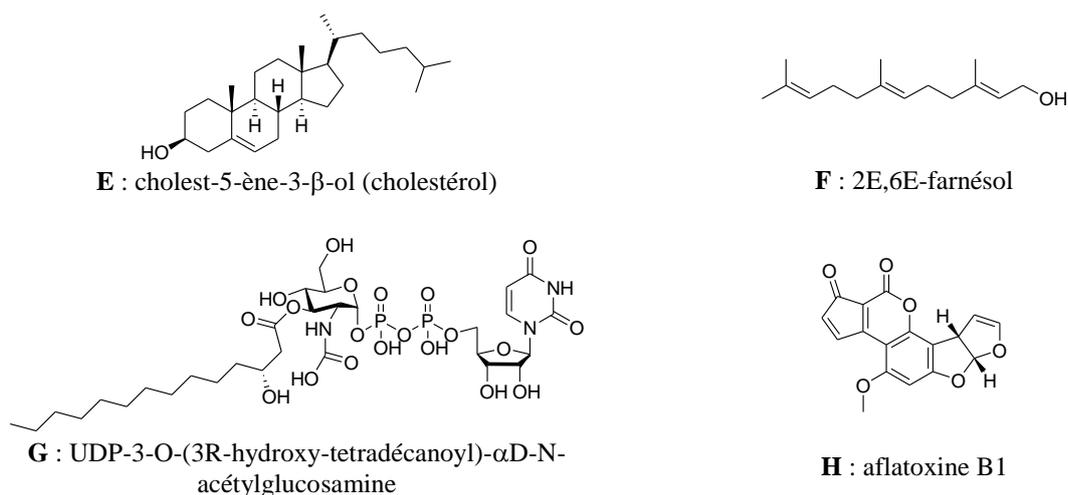


Figure 1.1 : Structures représentatives des huit catégories de lipides

Tous ces lipides détiennent la particularité de disposer de propriétés d'association particulières dans l'eau. C'est justement en se basant sur ces propriétés qu'une autre méthode de classification a été proposée par Small en 1970.² Elle exclut les lipides hydrophobes non polaires, et se consacre uniquement aux lipides amphiphiles polaires. Alors que les premiers sont insolubles dans l'eau et ne forment que des agrégats, les seconds, plus abondants, ont la spécificité de posséder deux caractères antagonistes au sein de leur structure (l'un hydrophile, l'autre hydrophobe). Ces derniers sont considérés comme étant des agents de surface et s'organisent différemment dans l'eau en fonction de leur solubilité et de leur caractère lyotrope. Notons qu'un lipide est dit lyotrope lorsqu'il se présente, en solution, sous différentes phases plus ou moins fluides en fonction de sa concentration et de la température de l'échantillon.³ La combinaison entre solubilité et lyotropisme donne lieu à quatre classes de lipides amphiphiles (Tableau 1.1).

| Classe | Solubilité | Lyotropisme | Observations | Exemples |
|--------|------------|-------------|---|---|
| I | non | non | monocouche stable | acides gras, stérols, prénols |
| II | non | oui | monocouche stable puis structures liquides-cristallines | acylglycérols, phosphoacylglycérols, sphingolipides |
| IIIA | oui | oui | monocouche instable puis micelles puis structures liquides-cristallines | sels d'acides gras, détergents |

² Small D.M. *Fed. Proc.* **29** 1320-1326 (1970)

³ Luzzati V., Mustacchi H., Skolios A.E., Husson F. *Acta Crystallogr.* **13** 660-667 (1960)

| | | | | |
|------|-----|-----|-----------------------------------|-------------------------------------|
| IIIB | oui | non | monocouche instable puis micelles | sels biliaries (dérivés de stérols) |
|------|-----|-----|-----------------------------------|-------------------------------------|

Tableau 1.1 : Classification des lipides amphiphiles selon Small

Nous constatons dans ce tableau que la stabilité de la monocouche initialement formée dépend de la solubilité du lipide. En effet, lorsque celui-ci est soluble dans l'eau la monocouche se désorganise en surface pour former des micelles dans le milieu aqueux. De plus, pour les amphiphiles lyotropes, lorsque leur concentration augmente, cette même monocouche passe à un état liquide cristallin correspondant à un empilement de plusieurs couches d'amphiphiles (classe II) ou à un arrangement de micelles cylindriques organisées selon un réseau hexagonal *via* la formation de micelles sphériques (classe IIIA).

1.2. Les auto-arrangements lipidiques

Comme nous venons de le voir, les lipides amphiphiles présentent la particularité de s'auto-assembler, en milieu aqueux, sous différentes formes et ce dépendamment de nombreux paramètres tels que leur concentration, la température de l'échantillon, la concentration de l'électrolyte, le pH et leur géométrie.⁴ Le rôle joué par ce dernier paramètre est particulièrement important en ce qui concerne la nature des structures obtenues puisqu'il est à l'origine des variations de formes observées. Pour mieux comprendre ce phénomène, Israelachvili a proposé^{5,6} un arrangement optimal par amphiphile lié à un paramètre d'assemblage $P = v/(a_0.l_c)$ où v est le volume de la chaîne hydrophobe, a_0 la surface de la tête polaire et l_c la longueur de la chaîne (Figure 1.2). De la valeur de ce paramètre P et donc de la géométrie de l'amphiphile, dépend un type d'auto-assemblage :

- ∞ $P < 1/3$: micelles sphériques
- ∞ $1/3 < P < 1/2$: micelles cylindriques
- ∞ $1/2 < P < 1$: bicouches sphériques (= vésicules, liposomes)
- ∞ $P = 1$: bicouches planes
- ∞ $P > 1$: micelles inverses sphériques ou cylindriques

⁴ Kunitake T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **31** 709-726 (1992)

⁵ Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **72** 1525-1568 (1976)

⁶ Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R.G. *Q. Rev. Biophys.* **13** 121-148 (1980)

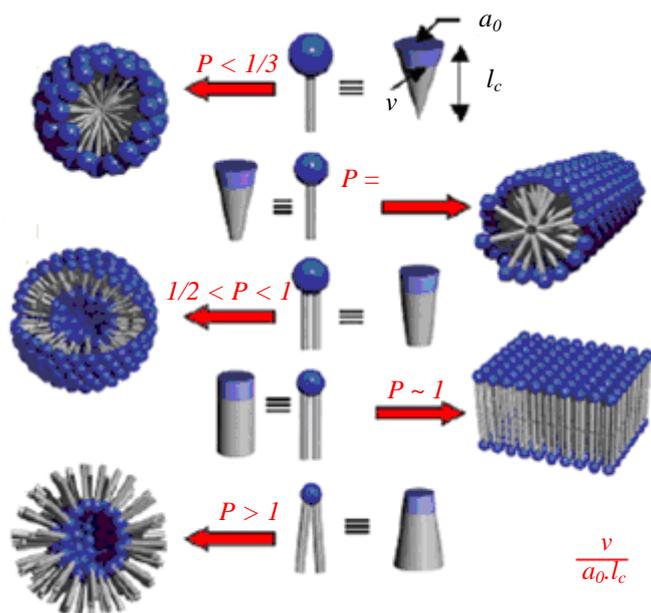


Figure 1.2 : Différents types d'auto-assemblages en fonction du paramètre P du lipide (la partie grise représente le motif hydrophobe du lipide alors que la partie bleue représente le motif hydrophile)⁷

La membrane cellulaire, principalement constituée de phosphoacylglycérols (ou phospholipides) et correspondant à une bicouche lipidique plane, constitue l'un des exemples les plus concrets de ces auto-assemblages observés dans la nature.⁸ D'autres formes telles que les micelles, les liposomes (vésicules), ou les nanotubes de lipides,^{7,9} qui correspondent à des enroulements hélicoïdaux de bicouches lipidiques générés par la chiralité des lipides les constituant,¹⁰ sont quant à eux connus du fait de leurs exploitations en tant que vecteurs de médicaments,^{11,12} de stabilisateurs de protéines¹³ ou de nano-réacteurs.^{14,15} Dans la suite de cette partie introductive, nous nous limiterons cependant à la présentation des micelles et des liposomes (vésicules).

⁷ Shimizu T., Masuda M., Minamikawa H. *Chem. Rev.* **105** 1401-1443 (2005)

⁸ Alberts B., Bray D., Lewis J., Roberts K., Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*; Garland : New York (1983)

⁹ Zhou Y., Shimizu T. *Chem. Mater.* **20** 625-633 (2008)

¹⁰ Spector M.S., Selinger J.V., Singh A., Rodriguez J.M., Price R.R., Schnur J.M. *Langmuir* **14** 3493-3500 (1998), Spector M.S., Price R.R., Schnur J.M. *Adv. Mater.* **11** 337-340 (1999)

¹¹ Ferrari M. *Nature Rev. Cancer* **5** 161-171 (2005)

¹² Duncan, R. *Nature Rev. Drug Discov.* **2** 347-360 (2003)

¹³ Sanders C.R., Hoffmann A.K., Gray D.N., Keyes M.H., Ellis C.D. *ChemBioChem* **5** 423-426 (2004)

¹⁴ Vriezema D.M., Comellas Aragonès M., Elemans J.A.A.W., Cornelissen J.J.L.M., Rowan A.E., Nolte R.J.M. *Chem. Rev.* **105** 1445-1489 (2005)

¹⁵ Dwars T., Paetzold E., Oehme G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** 7174-7199 (2005)

I.3. Gros plan sur les micelles¹⁶

a – Généralités

Bien que reconnus depuis l'époque Gauloise pour leurs propriétés détergentes, ce n'est qu'au début des années 1900 que les savons ont été scientifiquement étudiés par James William McBain.¹⁷ En mettant en évidence l'existence d'agrégats auto-arrangés pour expliquer la bonne conductivité électrolytique d'une solution de palmitate de sodium (dérivé de l'acide palmitique), il a découvert les micelles. Comme nous l'avons vu précédemment, ces structures résultent de l'auto-assemblage de lipides amphiphiles de classe III et peuvent être sphériques, cylindriques ou inverses en fonction de leur géométrie. La différence principale entre les micelles directes et inverses réside dans le fait que les têtes polaires du lipide sont respectivement orientées vers l'extérieur ou vers le centre (Figure 1.3). Il résulte de ces deux types d'orientation que les micelles directes sont solubles dans des milieux aqueux alors que les micelles inverses le sont dans des solvants organiques.

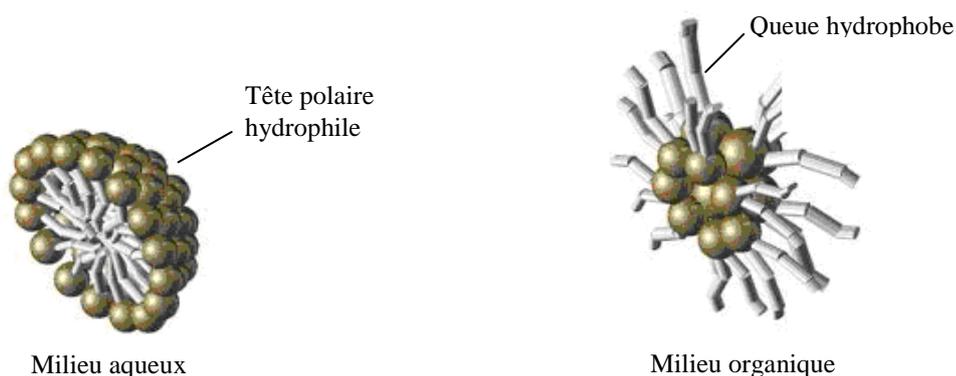


Figure 1.3 : Représentation schématique d'une micelle directe (gauche) et inverse (droite)

Dans la suite du manuscrit, nous ne parlerons que des micelles sphériques directes dont la taille moyenne est comprise entre 5 et 100 nm et que nous nommerons par le terme général de micelle.

b – Formation de micelles

Quel que soit le lipide amphiphile de type III utilisé, les micelles ne peuvent se former que lorsque celui-ci est placé dans des conditions favorables à savoir : (1) une concentration en

¹⁶ Torchilin V.P. *Pharm. Res.* **24** 1-16 (2007)

¹⁷ McBain J.W. *Trans. Faraday Soc.* **9** 99 (1913)

amphiphile supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC), (2) une température de l'échantillon supérieure à la température micellaire critique (CMT), aussi appelée température de Krafft. En dessous de ces conditions, l'amphiphile reste sous sa forme isolée. De plus, la formation d'une micelle est favorisée par une diminution de l'énergie libre du système due au camouflage des parties hydrophobes vis-à-vis du milieu aqueux et à la création d'un réseau de liaisons hydrogènes qui contrebalance largement le gain d'énergie libre dû à la formation de liaisons de Van der Waals toujours au sein des parties hydrophobes de l'amphiphile.¹⁸

c – Applications offertes par les micelles

Du fait de leur structure originale présentant un cœur et une enveloppe aux propriétés opposées (respectivement hydrophobe contre hydrophile), les micelles ont la capacité de solubiliser différents types de molécules. De manière générale, les micelles piègent en leur cœur des molécules hydrophobes. Il est également possible, mais de façon beaucoup plus rare, de trouver des molécules hydrophiles en surface, ou des molécules au caractère intermédiaire le long des amphiphiles.¹⁹ La formation du complexe encapsulé/encapsulant constitue l'un des avantages principaux des micelles. En effet, en plaçant les différentes entités dans le même "pot", le lipide amphiphile s'auto-organise en incorporant la molécule d'intérêt soit en son cœur, soit à l'interface micelle-eau.²⁰ Les taux d'encapsulation observés sont alors compris entre 5 et 25% massique. Un autre avantage est leur taille, particulièrement propice à la vectorisation.

d – Les micelles de polymères

Les micelles de polymères représentent une sous-classe de micelles et sont formées à partir de blocs de copolymères amphiphiles (Figure 1.4).²¹ De manière générale, ces derniers comportent une partie hydrophile à base de poly(éthylène) glycol (PEG) et une partie hydrophobe à base, par exemple, d'oxyde de propylène,²² d'acide aspartique²³ ou encore de

¹⁸ Chandler D. *Nature* **437** 640-647 (2005)

¹⁹ Attwood D., Florence A.T. *Surfactant Systems*, Chapman & Hall : London, UK (1983)

²⁰ Nagarajan R., Chaiko M.A., Ruckenstein E. *J. Phys. Chem.* **88** 2916-2922 (1984)

²¹ Torchilin V.P., *J. Cont. Release* **73** 137-172 (2001)

²² Miller D.W., Batrakova E.V., Waltner T.O., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. *Bioconj. Chem.* **8** 649-657 (1997)

²³ Harada A., Kataoka K. *Macromolecules* **31** 288-294 (1998)

caprolactone.²⁴ Le motif hydrophobe est le plus souvent choisi en fonction du principe actif à encapsuler dans le but de favoriser les interactions encapsulé/encapsulant.

Comme précédemment, le point clé de la formation de ce type de micelles reste la concentration.²⁵ Or, ces copolymères amphiphiles présentent des valeurs de CMC plus faibles que celles observées pour des amphiphiles "classiques", augmentant de ce fait la stabilité des micelles de polymères. Ainsi, leur utilisation en tant que vecteur de principes actifs, devient intéressante puisqu'à faible concentration elles continuent d'être présentes alors que les micelles "classiques" se désorganisent.

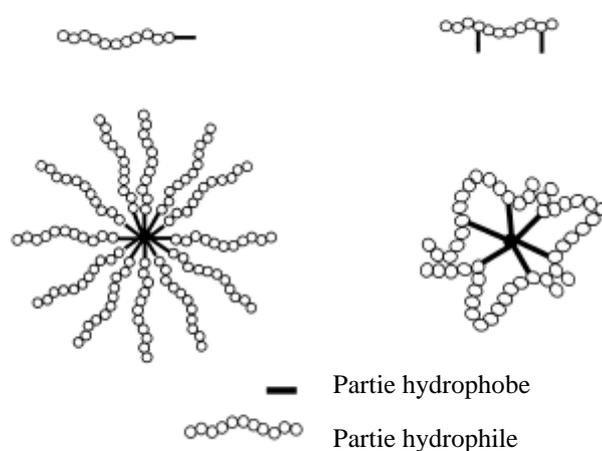


Figure 1.4 : Structures générales des micelles de polymères

Les micelles de polymères sont utilisées dans le même type d'applications que les micelles "classiques".^{26,27} D'un point de vue pratique, le complexe encapsulé/encapsulant peut se présenter sous deux formes. Soit le composé hydrophobe fait partie intégrante du cœur hydrophobe de la micelle, soit il constitue un cœur hydrophobe à part entière, lequel est enveloppé par la micelle.²⁸

²⁴ Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.G., Sung Y.K. *J. Control. Release* **51** 13-22 (1998)

²⁵ Jones M., Leroux J.-L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **48** 101-111 (1999)

²⁶ Lukyanov A.N., Torchilin V.P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56** 1273-1289 (2004)

²⁷ Osada K., Christie R.J., Kataoka K. *J. R. Soc. Interface* **6** 325-339 (2009)

²⁸ Nagarajan R., Ganesh K. *Macromolecules* **22** 4312-4325 (1989)

I.4. Gros plan sur les liposomes²⁹

a – Généralités

Découverts en 1965 par Sir Alec D. Bangham,³⁰ les liposomes sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches de lipides amphiphiles de classe II, le plus souvent des phospholipides naturels. Le même type de structure a ensuite été observé par Kunitake et Okahata, en 1977,³¹ mais cette fois-ci à partir d'un lipide amphiphile synthétique de classe II. Dès lors, de nombreux auteurs ont choisi de réserver le terme de liposomes pour les vésicules à base de phospholipides naturels et celui de vésicule en général pour les autres. Dans ce manuscrit nous utiliserons le terme plus répandu de liposome. Plusieurs noms leur ont été donnés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches dont ils sont composés :

- ∞ vésicules multilamellaires (MLV pour multilamellar large vesicles)
- ∞ vésicules unilamellaires de petite taille (SUV pour small unilamellar vesicles)
- ∞ vésicules unilamellaires de grande taille (LUV pour large unilamellar vesicles)
- ∞ vésicules unilamellaires géantes (GUV pour giant unilamellar vesicles).

La taille moyenne de ces objets est comprise entre quelques dizaines et quelques milliers de nanomètres (Figure 1.5).

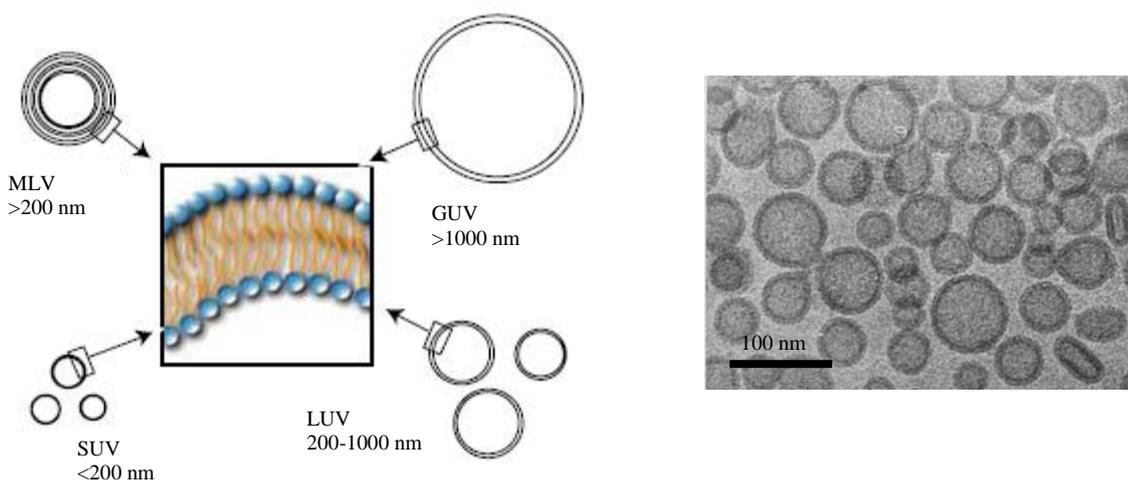


Figure 1.5 : Différentes sortes de liposomes (gauche) ; Image MET de SUV (droite)

²⁹ Jesorka A., Orwar O. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1** 801-832 (2008)

³⁰ Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. *J. Mol. Biol.* **13** 238–252 (1965)

³¹ Kunitake T., Okahata Y. *J. Am. Chem. Soc.* **99** 3860-3861 (1977)

Dans la famille des liposomes, peuvent également être cités les niosomes, d'aspect, de taille et d'utilisation similaires mais formés à partir de lipides amphiphiles non ioniques.^{32,33,34}

b – Formation de liposomes

Des protocoles détaillés décrivant la préparation de chaque type de liposomes ont été publiés dans la littérature.^{35,36,37} Le point de départ reste la formation de MLV³⁸ qui consiste dans un premier temps à former un empilement de bicouches lipidiques en évaporant le solvant organique dans lequel les composés amphiphiles étaient solubilisés (Figure 1.6).

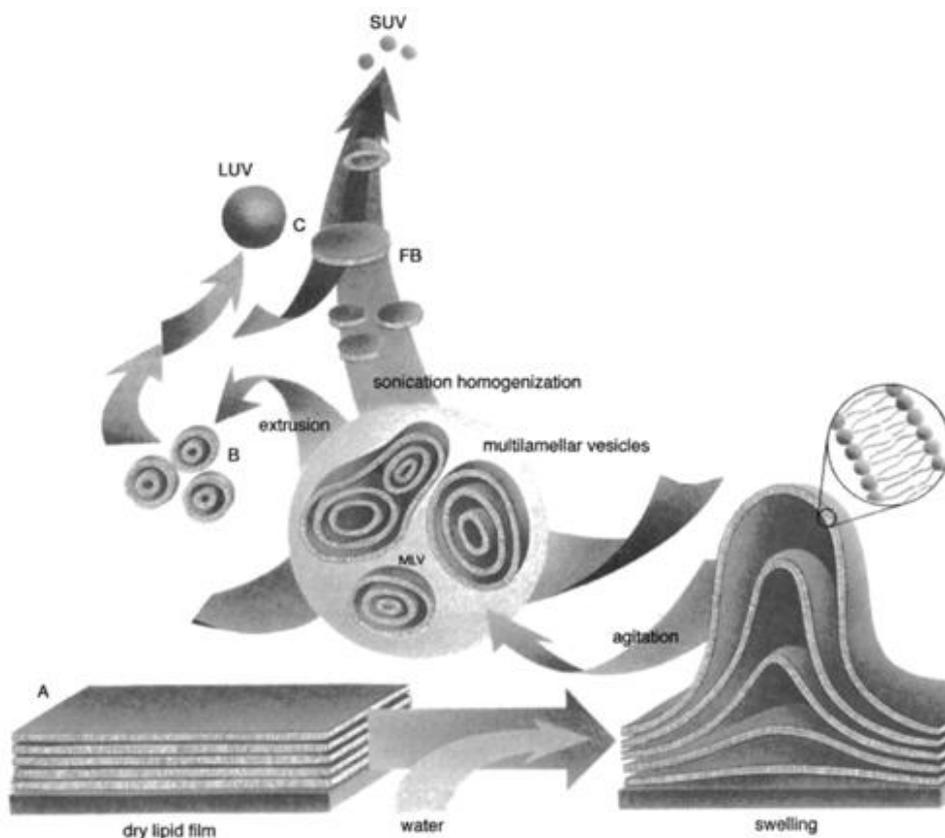


Figure 1.6 : Schéma général de formation de liposomes

³² Uchegbu I.F., Vyas S.P. *Int. J. Pharm.* **172** 33-70 (1998)

³³ Choi M.J., Haibach H.I. *Skin Pharmacol. Physiol.* **18** 209-219 (2005)

³⁴ Hong M., Zhu S., Jiang Y., Tang G., Pei Y. *J. Cont. Release* **133** 96-102 (2009)

³⁵ Luisi P.L., Walde P. *Giant Vesicles*, Wiley : New York (1999)

³⁶ Torchilin V., Weissig V. *Liposomes : A Practical Approach*, Oxford Univ. Press : Oxford/New York (2003)

³⁷ Gregoriadis G. *Liposome Technology*, Taylor & Francis/Informa : New York (2006)

³⁸ Kirby C., Gregoriadis G. *BIO-Technol.* **2** 979-984 (1984)

Ces bicouches sont ensuite hydratées, dans des conditions de température dépendantes de l'amphiphile et souvent sous agitation. Cette étape permet de faire gonfler les bicouches qui vont ainsi se refermer sur elles-mêmes en emprisonnant du solvant, donnant naissance à des MLV. La force motrice de cette étape est, comme pour les micelles, la non-exposition de leurs chaînes carbonées au milieu aqueux. Des traitements par des méthodes mécaniques telles que la sonication,³⁹ l'extrusion,⁴⁰ l'hydratation/déshydratation,⁴¹ ou l'électroformation⁴² permettent enfin d'obtenir des SUV, des LUV et des SUV.

c – Applications offertes par les liposomes

Contrairement aux micelles, l'enveloppe en bicouche(s) des liposomes leur confère la particularité d'avoir une cavité interne dont le milieu est de même nature que le milieu externe (le plus souvent aqueux). Ainsi, pour un liposome LUV classique avec une cavité interne aqueuse, il est possible de trouver des composés : (1) hydrophiles au sein de sa cavité aqueuse, (2) amphiphiles à l'interface entre la bicouche lipidique et la phase aqueuse, (3) hydrophobes au sein de la bicouche lipidique (Figure 1.7).

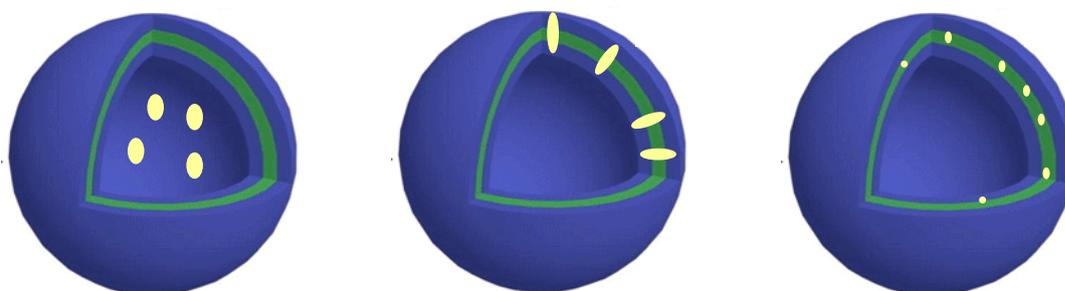


Figure 1.7 : Exemple d'encapsulation de composés hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) par un LUV (les composés encapsulés sont représentés en jaune)

Les liposomes suscitent un intérêt majeur dans les domaines pharmaceutiques⁴³ et cosmétiques.^{44,45} Cet intérêt s'explique entre autre par leurs propriétés de relargage. En effet, une fois encapsulé, l'actif peut être libéré soit dans le milieu extérieur par diffusion plus ou

³⁹ Woodburry D.J., Richardson E.S., Grigg A.W., Welling R.D., Knudson B.H. *J. Liposome Res.* **16** 57-80 (2006)

⁴⁰ Berger N., Sachse A., Bender J., Schubert R., Brandl M. *Int. J. Pharm.* **223** 55-68 (2001)

⁴¹ Karlsson M., Nolkranz K., Davidson M.J., Stromberg A., Ryttsen F. *Anal. Chem.* **72** 5857-5862 (2000)

⁴² Kuribayashi K., Tresset G., Coquet P., Fujita H., Takeuchi S. *Meas. Sci. Technol.* **17** 152-160 (2006)

⁴³ Gregoriadis G. *Liposomes as Drug Carriers*, Wiley : Weinheim (1988)

⁴⁴ Lasic D.D. *Trends in Biotechnology* **16** 307-321 (1998)

⁴⁵ Redziniak G. *Pathologie Biologie* **51** 279-281 (2003)

moins rapide à travers la(es) bicouche(s),⁴⁶ soit au cœur des cellules.⁴⁷ Cependant, ce type d'objet possède certaines limites. En effet, la formation des liposomes elle-même mais aussi l'étape d'encapsulation sont plus complexes que dans le cas des micelles et doivent être adaptées selon le principe actif et selon l'application. Toutefois, les taux d'encapsulation observés avec ce genre de structure sont meilleurs qu'avec les micelles puisqu'ils peuvent atteindre 50% massique.

d – Les liposomes polymérisés

Dans le but d'augmenter la stabilité des liposomes, leur structure peut être renforcée grâce à l'utilisation de fonctions polymérisables. Celles-ci peuvent se situer dans la chaîne grasse ou être liées de façon covalente ou électrostatique à la tête polaire.⁴⁸ Parmi les fonctions utilisées avec succès, se trouvent les fonctions styréniques, diacétyléniques, diéniques, acryliques, méthacryliques et lipiques (Figure 1.8).

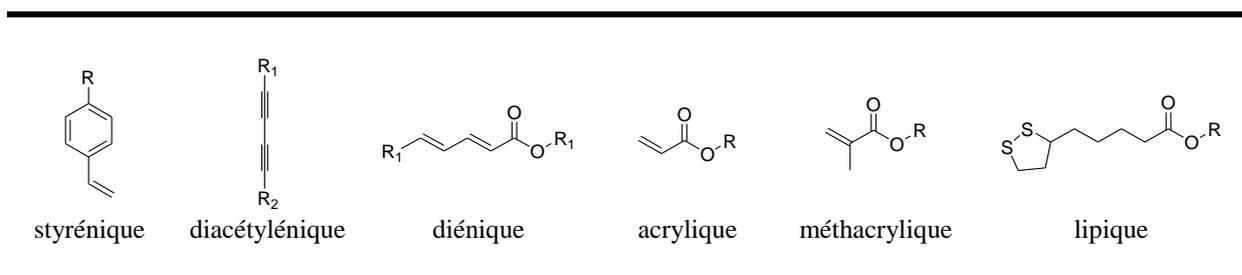


Figure 1.8 : Structure des différentes fonctions polymérisables

Du fait de leur stabilité améliorée, les liposomes polymérisés sont d'un grand intérêt dans le domaine pharmaceutique pour la vectorisation de médicaments.⁴⁹

D'autres applications ont été proposées avec le cas particulier des liposomes polymérisés par le biais d'une fonction diacétylénique, et ce grâce à leurs propriétés colorimétriques. En effet, ces liposomes initialement incolores deviennent bleus après polymérisation puis rouges lorsque l'organisation du polymère est perturbée. Ces perturbations peuvent être provoquées par des modifications du milieu telles que le pH⁵⁰ ou la température⁵¹ ou par des interactions

⁴⁶ Bouffieux O. Travail de fin d'études. Bruxelles : Inst. Sup. Indus. De Bruxelles (1995)

⁴⁷ Pagano R.E., Weinstein J.N. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7** 435-468 (1978)

⁴⁸ Mueller A., O'Brien D.F. *Chem. Rev.* **102** 727-757 (2002)

⁴⁹ Chen H., Langer R. *Pharm. Res.* **14** 537-540 (1997)

⁵⁰ Cheng Q., Stevens R.C. *Langmuir* **14** 1974-1976 (1998)

⁵¹ Dautel O.J., Robitzer M., Lère-Porte J.-P., Serein-Spirau F., Moreau J.J.E. *J. Am. Chem. Soc.* **128** 16213-16223 (2006)

ligand-récepteur.⁵² De ce fait, ils sont utilisés en temps que détecteurs de composés biologiques variés tels que des virus,^{53,54} des anticorps,^{55,56} ou des protéines.⁵⁷

II. Les auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone

II.1. Les nanotubes de carbone

a – Rappel sur le carbone

Le carbone, élément chimique non-métallique de la famille des cristallogènes, possède la particularité de se présenter sous plusieurs formes allotropiques cristallines telles que le graphite ou le diamant (Figure 1.9) ou non cristallines telles que le carbone amorphe.

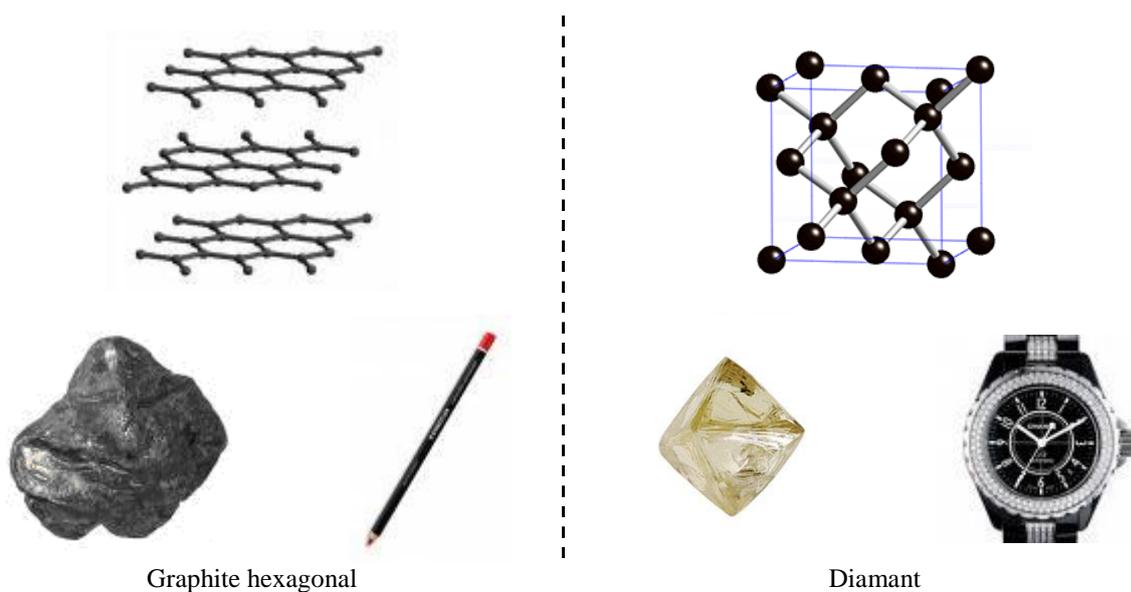


Figure 1.9 : Deux formes allotropiques naturelles du carbone

Le graphite est la source naturelle de carbone pur la plus abondante. Il est constitué d'un empilement de plusieurs couches non compactes de graphène espacées d'une distance de

⁵² Kim J.-M., Lee Y.B., Yang D.H., Lee J.-S., Lee G.S., Ahn D.J. *J. Am. Chem. Soc.* **127** 17580-17581 (2005)

⁵³ Charych D.H., Nagy J.O., Spevak W., Bednarski M.D. *Science* **261** 585 (1993)

⁵⁴ Deng J., Sheng Z., Zhou K., Duan M., Yu C.-Y., Jiang L. *Bioconjugate Chem.* **20** 533-537 (2009)

⁵⁵ Gill I., Ballesteros A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** 3264-3267 (2003)

⁵⁶ Kolusheva S., Kafri R., Katz M., Jelinek R. *J. Am. Chem. Soc.* **123** 417-422 (2001)

⁵⁷ Trester-Zedlitz M., Kamada K., Burley S.K., Fenyo D., Chait B.T., Muir T.W. *J. Am. Chem. Soc.* **125** 2416-2425 (2003)

0,335 nm, selon une séquence ABAB pour le graphite hexagonal ou ABCABC pour le graphite rhomboédrique. Notons que seul le graphite hexagonal est thermodynamiquement stable dans les conditions normales de température et de pression. Dans chaque feuillet de graphène, les atomes de carbone d'hybridation sp^2 sont fortement liés entre eux par des liaisons covalentes. En revanche, les liaisons entre les feuillets sont des liaisons de Van der Waals, beaucoup plus faibles, qui donnent au graphite son caractère friable. Une autre source naturelle de carbone pur est le diamant. Composé d'atomes de carbone d'hybridation sp^3 , il possède une structure cristalline cubique de type cubique faces centrées dont la moitié des sites tétraédriques est occupée par un atome de carbone. Cette particularité fait de lui le matériau naturel le plus dur (dureté de Mohs de 10 contre 1 pour le graphite, soit les deux valeurs extrêmes). Bien que leur composition atomique soit la même, ces deux allotropes sont utilisés dans des domaines différents en raison de leurs propriétés. Nous les retrouvons par exemple dans la composition de lubrifiants ou de mines de crayon de papier pour le graphite et en joaillerie ou dans les outils de coupe et d'usinage pour le diamant.

Depuis une vingtaine d'années, des formes allotropiques non-naturelles du carbone ont été découvertes parmi lesquelles les fullerènes (Figure 1.10), qui sont des molécules cages de structure géodésique et consistent en un enchainement régulier de pentagones et d'hexagones.

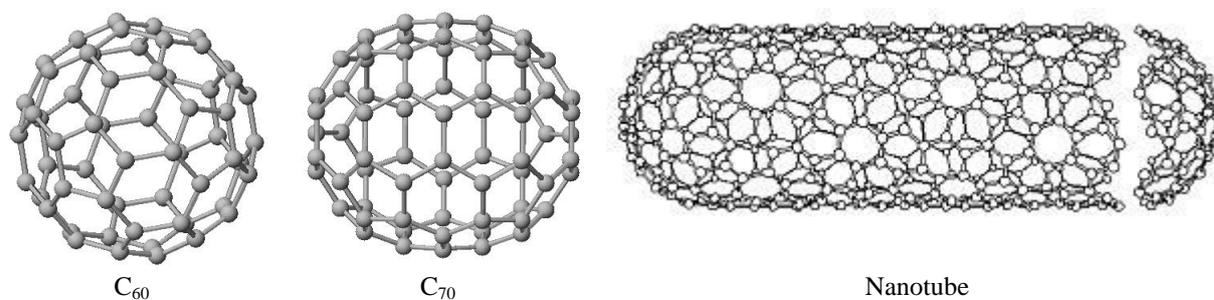


Figure 1.10 : Exemples de fullerènes

Le premier observé et le plus connu d'entre eux, le fullerène C_{60} , théoriquement suggéré par Osawa en 1970⁵⁸ puis mis en évidence en 1985 par Kroto, Heath, O'Brien, Curl et Smalley,⁵⁹ est composé de 60 atomes de carbone (12 pentagones et 20 hexagones) d'hybridation intermédiaire sp^2 et sp^3 . D'autres noms lui ont été attribués tels que le buckminsterfullerène, par analogie aux dômes géodésiques de l'architecte Richard Buckminster Fuller, ou le

⁵⁸ Osawa E. *Kagaku* **25** 854-863 (1970) ; Osawa E. *Chem. Abst.* **74** 75698v (1971)

⁵⁹ Kroto H.W, Heath J.R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E. *Nature* **318** 162-163 (1985)

footballène. La famille des fullerènes s'est ensuite élargie avec l'étude, entre autres, du C₂₀,⁶⁰ du C₇₀,⁶¹ ou encore des nanotubes.

b – Du fullerène C₆₀ aux nanotubes de carbone

La première synthèse macroscopique et isolable de fullerènes C₆₀ a été réalisée en 1990 par Krätschmer et Huffman⁶² en provoquant un arc électrique entre deux électrodes de graphite mises en contact dans une atmosphère d'hélium. En modifiant la nature du gaz rare utilisé, à savoir de l'argon au lieu de l'hélium, et en éloignant les électrodes, Iijima⁶³ observa en 1991 la croissance de fines aiguilles de carbone à la surface de la cathode. Après une étude plus approfondie, il s'est avéré que ces aiguilles étaient composées de plusieurs feuilles de graphène enroulées sur elles-mêmes et fermées à leurs extrémités donnant au final des tubes de 4 à 30 nm de diamètre pour quelques micromètres de long. Ces objets, équivalents multicouches et allongés du fullerène C₆₀, sont considérés comme les premiers nanotubes de carbone multi-parois observés même si leur existence avait déjà été prédite par d'autres groupes.⁶⁴

c – Fiche d'identité des nanotubes de carbone

Suite à cette découverte, d'autres types de nanotubes de carbone, dont le nom dépend du nombre de feuillet de graphène dont ils sont constitués, ont été mis en évidence :

- ∞ un plan de graphène : nanotubes de carbone simple-paroi (SWNTs pour single-walled carbon nanotubes)^{65,66}
- ∞ deux plans de graphène : nanotubes de carbone double-parois (DWNTs pour double-walled carbon nanotubes)⁶³
- ∞ plus de deux plans de graphène : nanotubes de carbone multi-parois (MWNTs pour multi-walled carbon nanotubes)

⁶⁰ Prinzbach H., Weiler A., Landenberger P., Wahl F., Wörth J., Scott L.T., Gelmont M., Olevano D., Issendorff B.V. *Nature* **407** 60-63 (2000)

⁶¹ Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press : San Diego CA (1996)

⁶² Krätschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Huffman D.R. *Nature* **347** 354-358 (1990)

⁶³ Iijima S., *Nature* **354** 56-58 (1991)

⁶⁴ Monthieux M., Kuznetsov V.L. *Carbon* **44** 1621-1623 (2006)

⁶⁵ Iijima S., Ichihashi, T. *Nature* **363** 603-605 (1993)

⁶⁶ Bethune, D.S., Kiang C.H., de Vries M.S., Gorman G., Savoy R., Vazquez J., Beyers R. *Nature* **363** 605-607 (1993)

Les SWNTs peuvent avoir une hélicité différente selon la façon dont la couche de graphène est enroulée sur elle-même. Ceci se traduit par la formation de nanotubes de type chaise, zigzag ou chiraux (figure 3). Cet enroulement est caractérisable par différents repères dont le plus usuel est celui de Hamada, proposé en 1992⁶⁷, qui attribue à chaque type de SWNTs une paire d'indices (n,m). De manière générale, les SWNTs ont un diamètre externe compris entre 0,5 et 2 nm mais présentent toutefois une forte tendance à s'agglomérer par interactions de type π - π et à ainsi former des fagots stables, également appelés faisceaux, (Figure 1.11) d'une dizaine de tubes organisés en une structure hexagonale.⁶⁸

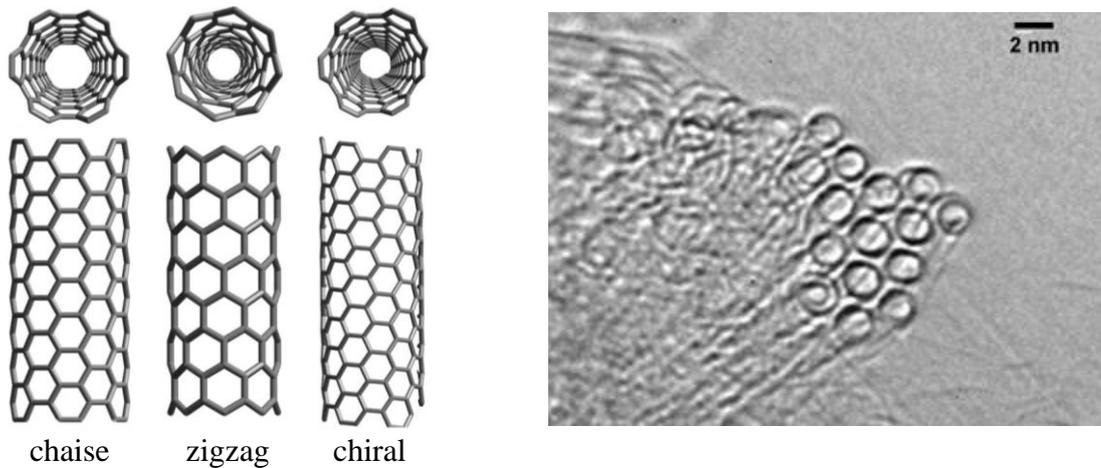


Figure 1.11 : Les trois différents types de SWNTs (gauche) ; Image MET d'un fagot de SWNTs (droite)

Les MWNTs correspondent quant à eux à une superposition de plusieurs couches de graphène. Deux modèles caractérisant cette superposition existent : le modèle "poupées russes" qui équivaut à l'emboîtement, de manière concentrique, de plusieurs cylindres et le modèle "parchemin" qui correspond à l'enroulement d'un seul feuillet de graphène (Figure 1.12). La distance moyenne entre deux couches est de 0,344 nm, c'est-à-dire une distance légèrement supérieure à celle observée pour le graphite. Le diamètre externe des MWNTs varie entre deux et quelques dizaines de nanomètres selon la méthode de production.

⁶⁷ Hamada N., Sawada S., Oshiyama A. *Phys. Rev.Lett* **68** 1579-1581 (1992)

⁶⁸ Terrones M., Terrones H., Banhart F., Charlier J.-C., Ajayan P.M. *Science* **288** 1226-1229 (2000)

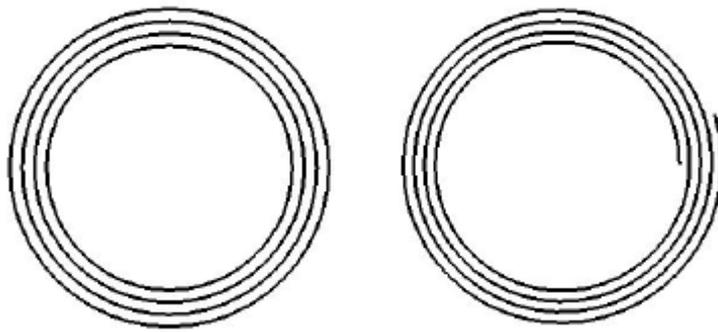


Figure 1.12 : Modèle "poupées russes" (gauche) et "parchemin" (droite) de MWNTs

Le même type d'enroulements multicouches a également été observé en 1992 par le groupe d'Ugarte au sein d'objets sphériques : les nano-oignons.⁶⁹

d – Synthèse des nanotubes de carbone

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'utilisation de nanotubes de carbone produits *via* la technique de l'arc électrique. Cette technique, peu coûteuse et historiquement utilisée par Iijima,^{63,70} consiste à établir un champ électrique entre deux électrodes de graphite sous atmosphère inerte (Figure 1.13). L'anode se consume alors en formant un plasma dont la température peut atteindre 6000°C, qui se recondense ensuite à la surface de la cathode en un dépôt filamenteux contenant les nanotubes. Pour obtenir des SWNTs, l'utilisation de catalyseurs métalliques comme le Fe(0), le Ni(0) ou le Co(0) est nécessaire. D'autres techniques faisant appel à l'ablation laser⁷¹ ou aux ultrasons⁷² peuvent être utilisées pour sublimer la cible de graphite. Toutes ces méthodes, dites à hautes températures, suivent le même principe, seule la source d'énergie diffère.

⁶⁹ Ugarte D. *Nature* **359** 707-709 (1992)

⁷⁰ Ebbesen T.W., Ajayan P.M. *Nature* **358** 220-222 (1992)

⁷¹ Thess A., Lee R., Nikolaev P., Dai H., Petit P., Robert J., Xu C., Lee Y.H., Kim S.G., Rinzler A.G., Colbert D.T., Scuseria G.E., Tomanek D., Fischer J.E., Smalley R.E. *Science* **273** 483-486 (1996)

⁷² Jeong, S.-H., Ko, J.-H., Park, J.-B., Park, W. *J. Am. Chem. Soc.* **126** 15982-15983 (2004)

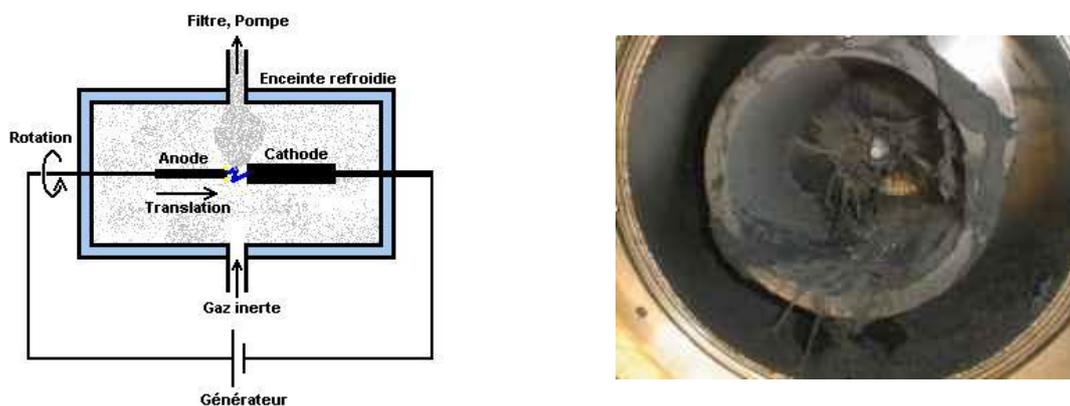


Figure 1.13 : Schéma de la méthode à arc électrique (gauche) ; Réacteur à arc électrique après synthèse (Groupe de Dynamique des Phases Condensées (GDPC) de Montpellier) (droite)

Une seconde voie de synthèse de nanotubes, correspondant aux méthodes dites à moyennes températures, consiste à décomposer, dans un four, un hydrocarbure liquide ou gazeux à la surface de particules d'un catalyseur métallique. Le carbone libéré est ensuite recondensé à la surface de ces particules pour donner des nanotubes. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer la décomposition chimique en phase vapeur (CVD)⁷³ qui, lorsque la source d'hydrocarbure utilisée est le monoxyde de carbone, fournit des nanotubes dits HiPco.⁷⁴

e – Propriétés des nanotubes de carbone

Du fait de leur nature et de leur structure, les nanotubes de carbone possèdent des propriétés originales que ce soit mécaniques, électroniques, ou encore chimiques. Bien que les dernières citées aient fait l'objet d'un intérêt plus particulier dans le cadre de nos travaux, chacune de ces propriétés sera abordée dans cette section.

Propriétés mécaniques

Avec un module de Young de l'ordre de 1 TPa,^{75,76} quelque soit le diamètre et la nature du tube, les nanotubes de carbone font partie des matériaux les plus rigides, leur conférant alors

⁷³ Colomer J.F., Henrard L., Lambin P., Van Tendeloo G. *European Physical Journal B: Condensed Matter Physics* **27** 111-118 (2002)

⁷⁴ Dai H., Rinzler A.G., Nikolaev P., Thess A., Colbert D.T., Smalley R. E. *Chemical Physics Letters* **260** 471-475 (1996)

⁷⁵ Wong E.W., Sheehan P.E., Lieber C.M. *Science* **277** 1971-1975 (1997)

⁷⁶ Agrawal P.M., Sudalayandi B.S., Raff L.M., Komanduri R. *Computational Materials Science* **38** 271-281 (2006)

des propriétés mécaniques intéressantes. Rappelons que le module de Young (ou module d'élasticité longitudinale) correspond à une constante reliant la contrainte de traction exercée sur un matériau isotrope à sa déformation. En combinant ainsi rigidité et légèreté, ils deviennent un matériau de premier choix dans la fabrication par exemple de cadres de vélo ou de raquettes de tennis en remplacement de la fibre de carbone, aussi légère mais plus cassante. Leur aptitude à absorber de gros chocs leur permet aussi d'être utilisés dans la composition de gilets pare-balles ou autres blindages (Figure 1.14).



Figure 1.14 : Exemple de vélo et de gilet pare-balles à base de nanotubes de carbone

Pour ce genre d'application, seuls les MWNTs sont utilisés, les SWNTs étant quant à eux beaucoup plus flexibles dans les directions radiales (Figure 1.15).⁷⁷



Figure 1.15 : Exemples de torsions de SWNTs

⁷⁷ Yakobson B.I., Brabec C.J., Bernholc J. *Physical Review Letters* **76** 2511-2514 (1996) ; Yakobson B.I., Smalley R.E. *La Recherche* 50-56 (1998)

Propriétés électroniques

Pour ce qui est des propriétés électroniques des nanotubes de carbone, il faut, une fois encore, faire une distinction entre les MWNTs et les SWNTs. En effet, des mesures réalisées sur les premiers⁷⁸ montrent que chaque MWNT possède ses propres caractéristiques, conduisant à un comportement métallique ou non. En revanche, en ce qui concerne les SWNTs, une répartition plus organisée existe entre les tubes métalliques ou semi-conducteurs et dépend de leur géométrie.^{79,80,81} Afin d'expliquer ce phénomène, reprenons le repère de Hamada. La paire d'indice (n,m) qui caractérise l'enroulement de la feuille de graphène représente les coordonnées du vecteur d'enroulement et détermine le diamètre, l'hélicité mais aussi les propriétés électroniques d'un SWNT (Figure 1.16).

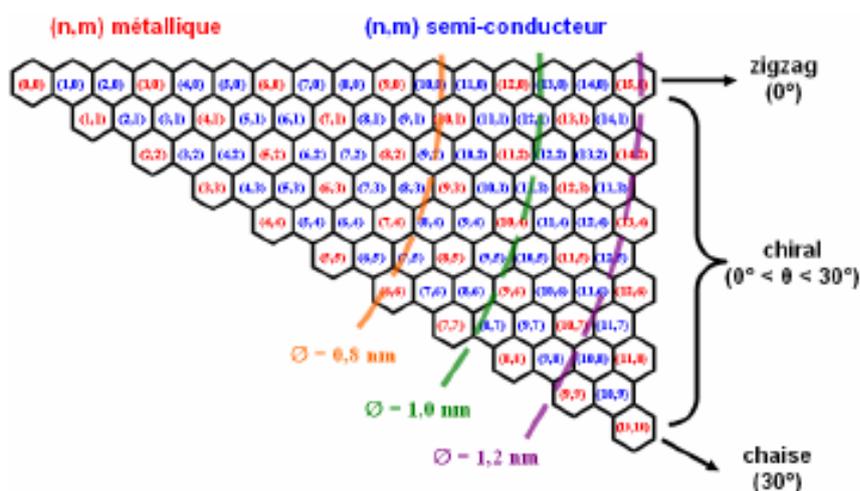


Figure 1.16 : Schéma du réseau hexagonal représentant les nanotubes (n,m) dans le repère de Hamada.

En effet, tous les nanotubes dont les indices (n,m) sont tels que $n - m = 3k$ (k entier) sont métalliques ; les autres nanotubes ($n - m \neq 3k$, k entier) sont semi-conducteurs. Ainsi, deux tiers des SWNTs sont semi-conducteurs alors que le tiers restant, dont la totalité des tubes de type chaise (où $n=m$), est métallique. Cette bonne conductivité permet aux nanotubes de carbone d'être utilisés en remplacement du silicium et autres semi-conducteurs classiques dans l'élaboration de transistors de taille très réduite, tout en augmentant leurs performances, comme l'ont déjà montré des chercheurs du groupe IBM.

⁷⁸ Tans S.J., Devoret M.H., Dai H., Thess A., Smalley R.E., Geerligs L.J., Dekker C. *Nature* **386** 474-477 (1997)

⁷⁹ Wildoer J.W.G., Venema L.C., Rinzler A.G., Smalley R.E., Dekker C. *Nature* **391** 59-62 (1998)

⁸⁰ Odom T.W., Huang J.-L., Kim P., Lieber C.M. *Nature*, **391** 62-64 (1998)

⁸¹ Mintmire J.W., White C.T. *Physical Review Letters* **81** 2506-2509 (1998)

Les SWNTs sont également très en vogue dans la conception d'écrans plats, souples, et de très haute qualité. Une technologie développée à cet effet, nommée OLED et exploitée entre autre par Samsung, repose sur la capacité des nanotubes à émettre de la lumière lorsqu'ils sont soumis à un courant électrique (Figure 1.17).⁸²



Figure 1.17 : Exemple d'écran à base de nanotubes de carbone

Propriétés chimiques

Le manque de solubilité des nanotubes de carbone pourrait restreindre leur étude et leurs applications sans l'exploitation de leurs propriétés chimiques.⁸³ Celles-ci résultent de leur structure graphitique bien particulière et de la présence de défauts dans cette structure. Plusieurs méthodes axées soit sur la fonctionnalisation covalente des nanotubes, soit sur des interactions non covalentes avec les nanotubes ont été développées (Figure 1.18, gauche).^{84,85} La première d'entre elles, consiste en une fonctionnalisation covalente des parois des nanotubes par exemple par addition de carbènes, de radicaux⁸⁶ ou d'ylures d'azote⁸⁷ ou par cycloaddition de nitrènes ou de butadiène.⁸⁸

La seconde voie, toujours covalente, consiste quant à elle à fonctionnaliser les défauts ponctuels des nanotubes présents à la fois en leurs extrémités et sur leurs parois. Ces défauts, plus ou moins importants selon le mode de synthèse utilisé, peuvent être de plusieurs types (Figure 1.18, droite). Dans un premier temps il est possible d'observer l'inclusion de

⁸² Choi W.B., Chung D.S., Kang J.H., Kim H.Y., Han I.T., Lee Y.H., Jung J.E., Lee N.S., Park G.S., Kim J.M. *Appl. Phys. Lett.* **75** 3129-3131 (1999)

⁸³ Hersam M.C. *Nature Nanotech.* **3** 387-394 (2008)

⁸⁴ Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M. *Chem. Rev.* **106** 1105-1136 (2006)

⁸⁵ Hirsch A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41** 1853-1859 (2002)

⁸⁶ Holzinger M., Vostrowsky O., Hirsch A., Hennrich F., Kappes M., Weiss R., Jellen F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** 4002-4005 (2001)

⁸⁷ Ménard-Moyon C., Izard N., Doris E., Mioskowski C. *J. Am. Chem. Soc.* **128** 6552-6553 (2006)

⁸⁸ Ménard-Moyon C., Dumas F., Doris E., Mioskowski C. *J. Am. Chem. Soc.* **128** 14764-14765 (2006)

pentagones ou d'heptagones dans le réseau hexagonal (A) pouvant générer une courbure de l'axe du tube, un changement de diamètre ou une jonction avec un autre tube. Il est également fréquent de rencontrer des atomes de carbone d'hybridation sp^3 (B) dont la quatrième liaison porte en général un atome d'hydrogène ou une fonction alcool. Enfin, les traitements oxydants nécessaires à la purification des nanotubes peuvent provoquer la formation de trous dans la structure (C) ainsi que l'ouverture des extrémités (D) se traduisant, dans les deux cas, par la présence d'atomes de carbone décorés par une fonction carboxylique. Par le biais de réactions d'estérification ou d'amidation, il devient alors envisageable d'utiliser ces fonctions carboxyliques comme point d'ancrage à des molécules d'intérêt.^{89,90}

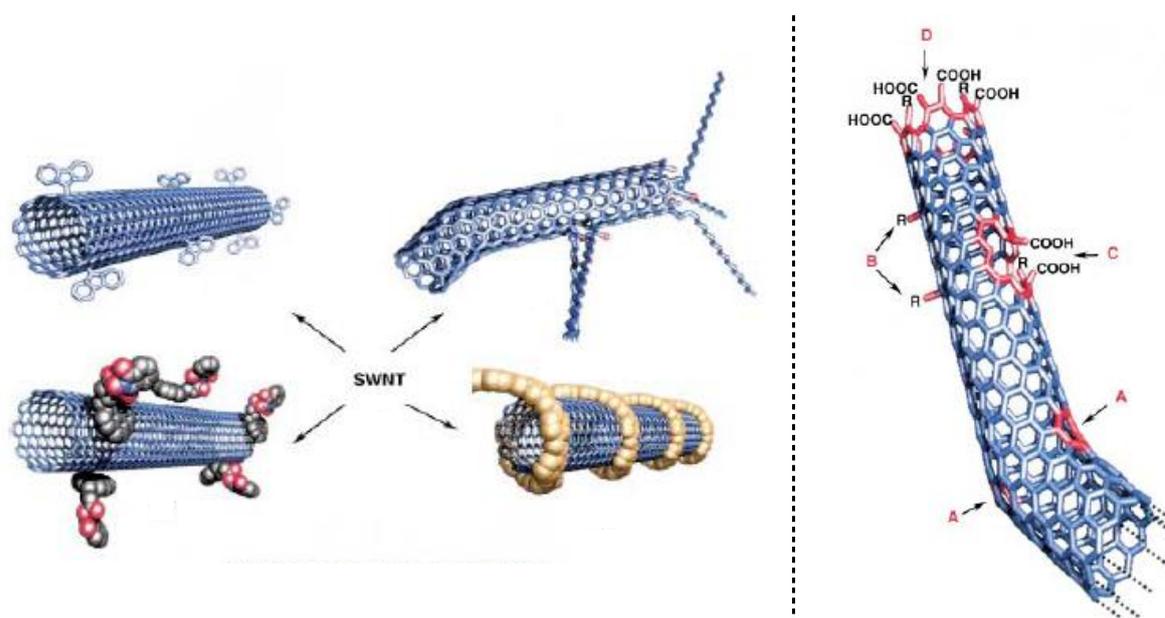


Figure 1.18 : Exemples de fonctionnalisation d'un SWNT (gauche) ; Exemple de défauts visibles à la surface d'un SWNT (droite)

La troisième méthode consiste quant à elle en une fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone. Du fait de leur surface totalement hydrophobe, il a été démontré qu'il était possible de décorer les nanotubes de carbone avec des composés amphiphiles tels que des détergents,^{91,92} des polymères,⁹³ de l'ADN,⁹⁴ des protéines,⁹⁵ ou des composés

⁸⁹ Riggs J.E., Guo Z., Carroll D.L., Sun Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **122** 5879-5880 (2000)

⁹⁰ Kahn M.G.C., Banerjee S., Wong S.S. *Nano. Lett.* **2** 1215-1218 (2002)

⁹¹ Shin J.-Y., Premkumar T., Geckeler K.E. *Chem. Eur J.* **14** 6044-6048 (2008)

⁹² Artyukhin A.B., Shestakov A., Harper J., Bakajin O., Stroeve P., Noy A. *J. Am. Chem. Soc.* **127** 7538-7542 (2005)

⁹³ Nish A., Hwang J.-Y., Doig J., Nicholas R.J. *Nature Nanotech.* **2** 640-646 (2007)

⁹⁴ Zheng M., Jagota A., Semke E.D., Diner B.A., Mclean R.S., Lustig S.R., Richardson R.E., Tassi N.G. *Nature Mater.* **2** 338-342 (2003)

aromatiques.⁹⁶ Ces différentes méthodes permettent pour la plupart de disperser les nanotubes de carbone en milieux aqueux. Ceci peut également être réalisé dans des solvants organiques.⁹⁷

II.2. Les auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone

Comme nous venons de le voir, l'utilisation de détergents pour disperser des SWNTs dans un milieu aqueux s'avère être une méthode efficace. De plus, ces molécules amphiphiles ont la particularité de former différents types d'auto-arrangements selon leur géométrie et les conditions de concentration et de température dans lesquelles elles sont étudiées. Se pose alors la question sur la façon dont ces molécules s'organisent à la surface des nanotubes de carbone. Pour répondre à cette interrogation un bref historique des différents travaux effectués à ce sujet sera dressé.

En 1994 Manne *et coll.*⁹⁸ ont démontré grâce à la microscopie par force atomique (AFM) qu'un composé tel que le bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (CTAB) (Figure 1.21), détergent à caractère cationique, avait la capacité de s'adsorber en milieux aqueux à la surface d'un plan de graphite en formant des arrangements hémi-micellaires rectilignes (Figure 1.19, gauche). La stabilité de ces arrangements s'explique par le camouflage de tous les corps hydrophobes du système, à savoir les chaînes grasses du détergent et la feuille de graphite, vis-à-vis du milieu aqueux. Ce phénomène est identique à celui observé lors de la formation de micelles. Des travaux ultérieurs, effectués par Aksay *et coll.* en 1996,⁹⁹ ont montré que le même type d'arrangements était possible en utilisant un détergent à caractère anionique : le dodécylsulfate de sodium (SDS) (Figures 1.19, droite et 1.21). Dans ces deux cas, la concentration utilisée en détergent était légèrement supérieure à leur CMC (respectivement 0.9 mM et 8 mM).

⁹⁵ Balavoine F., Schultz C., Richard C., Mallouh V., Ebbesen T.W., Mioskowski C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** 1912-1915 (1999)

⁹⁶ Marquis R., Greco C., Sadokierska I., Lebedkin S., Kappes M.M., Michel T., Alvarez L., Sauvajol J.-L., Meunier S., Mioskowski C. *Nano Lett.* **8** 1830-1835 (2008)

⁹⁷ Ausman K.D., Piner R., Lourie O., Ruoff R.S., Korobov M. *J. Phys. Chem. B* **104** 8911-8915 (2000)

⁹⁸ Manne S., Cleveland J.P., Gaub H.E., Stucky G.D., Hansma P. K. *Langmuir* **10** 4409-4413 (1994)

⁹⁹ Aksay I.A., Trau M., Manne S., Honma I., Yao N., Zhou L., Fenter P., Eisenberger P.M., Gruner S.M. *Science* **273** 892-898 (1996)

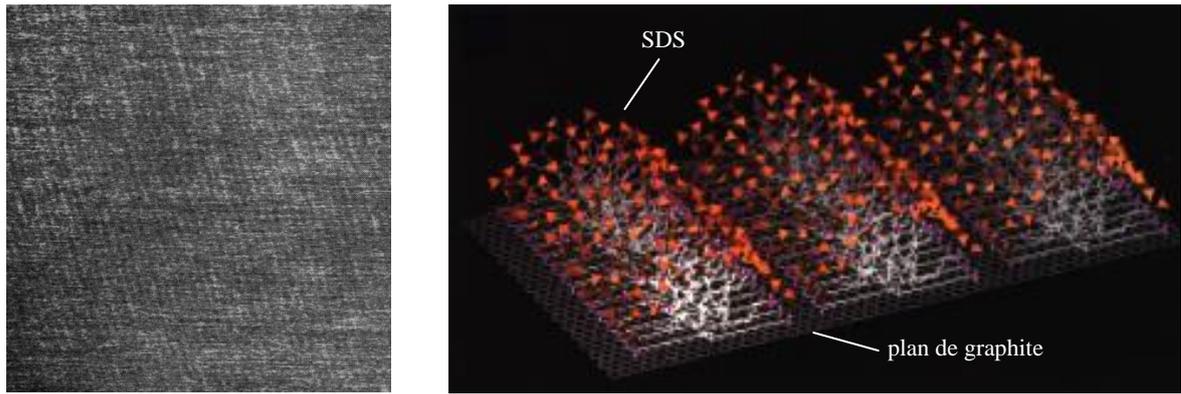


Figure 1.19 : Image AFM d'arrangements hémi-micellaires à la surface d'un plan de graphite mis en évidence par Manne *et coll.* (gauche) ; Représentation schématique de ces arrangements par Aksay *et coll.* : la partie polaire du SDS est symbolisée par un triangle rouge (droite)

Par analogie, Bonard *et coll.*¹⁰⁰ ont montré en 1997 qu'une solution aqueuse contenant 1% en masse de SDS (34 mM soit quatre fois sa CMC), conduisait à une suspension stable de SWNTs pendant plusieurs semaines. L'adsorption du détergent à la surface des nanotubes de carbone crée une distribution de charges négatives empêchant ainsi leur agrégation. Une information quant à la nature des arrangements obtenus a ensuite été donnée durant les travaux effectués au sein du laboratoire par Cyrille Richard,¹⁰¹ grâce à la microscopie électronique à transmission (MET), aussi bien avec des SWNTs qu'avec des MWNTs (Figure 1.20).

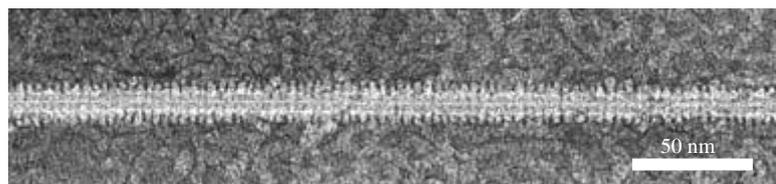


Figure 1.20 : Image MET d'arrangements de SDS à la surface d'un MWNT

En effet, alors que les striations observées à la surface d'un plan de graphite ne suivent pas d'axe précis, celles observées sur les nanotubes de carbone sont uniquement perpendiculaires à l'axe des nanotubes. Toujours dans le cadre de ces travaux, des tests similaires ont été effectués avec deux autres détergents, l'un cationique, le bromure d'octyltriméthyl ammonium

¹⁰⁰ Bonard J.-M., Stora T., Salvetat J.-P., Maier F. Stöckli T., Duschl C., Forró L., de Heer W.A., Châtelain A. *Adv. Mater.* **9** 827-831 (1997)

¹⁰¹ Richard C., Balavoine F., Schultz P., Ebbesen T.W., Mioskowski C. *Science* **300** 775-778 (2003)

(OTAB) et l'autre neutre, le Triton X-100 (Figure 1.21). L'utilisation de l'OTAB montre des résultats similaires au SDS. En revanche, l'adsorption du Triton X-100 à la surface des nanotubes se faisant par le biais d'interactions de type π - π , le recouvrement observé est complet mais sans organisation précise.

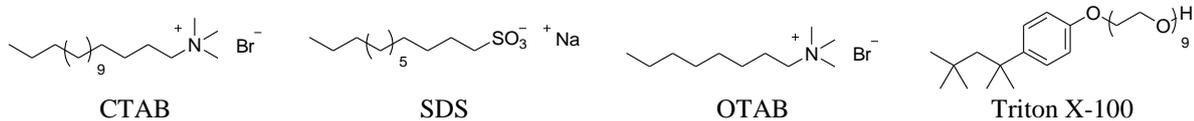


Figure 1.21 : Structures des différents détergents mentionnés

Pour terminer cette étude, les synthèses de lipides à caractère amphiphile comportant une ou deux chaînes grasses ainsi qu'une tête polaire de type acide nitrilotriacétique (NTA) ont été menées (Figure 1.22).

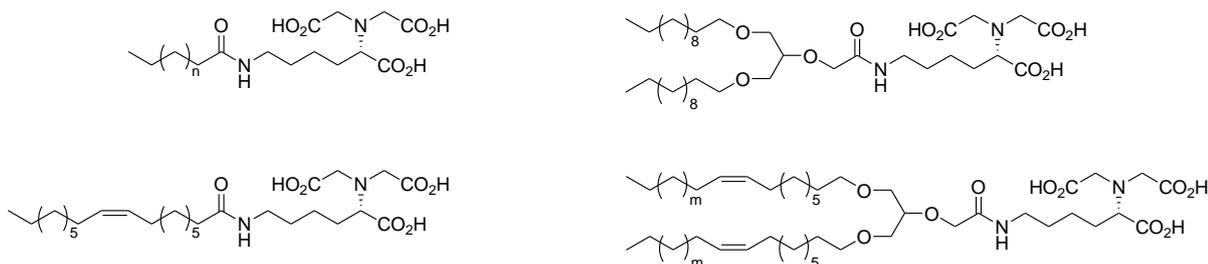


Figure 1.22 : Lipides à caractère amphiphile monobrin (gauche) et bibrins (droite) synthétisés par Cyrille Richard (avec $6 < n < 14$ et $1 < m < 5$)

En plus d'apporter à ces différents lipides leur caractère hydrophile par le biais des trois fonctions acides, l'utilisation d'une telle tête polaire était justifiée par son aptitude à former des complexes avec du nickel (II). Le motif NTA est utilisé dans de nombreuses applications en tant que fixateur de protéines marquées par exemple par des séquences de poly-histidine sur des surfaces d'or, de quartz ou de polystyrène^{102,103,104} ainsi que sur des monocouches lipidiques.^{105,106} A l'exception du lipide monobrin saturé à courte chaîne ($n=6$), tous les autres

¹⁰² Sigal G.B., Bamdad C., Barberis A., Strominger J., Whitesides G.M. *Anal. Chem.* **68** 490-497 (1996)

¹⁰³ Schmid E.L., Keller T.A., Dienes Z., Vogel H. *Anal. Chem.* **69** 1979-1985 (1997)

¹⁰⁴ Paborsky L.R., Dunn K.E., Gibbs C.S., Dougherty J.P. *Anal. Biochem.* **234** 60-65 (1996)

¹⁰⁵ Kubalek E.W., Le Grice S.F.J., Brown P.O. *J. Struct. Biol.* **113** 117-123 (1994)

¹⁰⁶ Dorn I.T., Neumaier K.R., Tampé R. *J. Am. Chem. Soc.* **120** 2753-2763 (1998)

ont démontré une aptitude à s'adsorber à la surface des nanotubes, ici des MWNTs, toujours de façon hémi-micellaire.

Depuis, d'autres travaux menés sur l'adsorption de molécules amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone ont été publiés^{107,108} parmi lesquels nous retrouvons la formation d'auto-arrangements hémi-micellaires.^{109,110}

III. Entre micelle et liposome : vers des arrangements polymérisés particuliers

III.1. Synthèses d'arrangements polymérisés particuliers

Suite à ces travaux, mettant en évidence le fait que des lipides amphiphiles synthétiques s'adsorbent à la surface de nanotubes de carbone en formant une juxtaposition d'un seul type d'auto-arrangements répétés le long du tube, le laboratoire s'est ensuite intéressé à l'étude même de ces structures en forme d'anneaux. Il a donc été question dans un premier temps d'en envisager l'extraction. C'est pourquoi, dans le but de consolider la structure de ces anneaux Stéphane Rickling¹¹¹ a considéré l'utilisation de lipides photo-polymérisables. Ces derniers présentent des têtes polaires variables (NTA **I**, acide carboxylique **J**, amine **K**, ou ammonium **L**) et une fonction photo-polymérisable portée par un motif diacétylénique (Figure 1.23). Alors que les modifications apportées au niveau des têtes polaires ont eu pour but de faire varier le milieu de solubilisation des lipides, l'insertion d'un motif diacétylénique a permis de consolider les auto-arrangements par polymérisation 1-4 *via* une irradiation UV. Ce motif, polymérisant par voie radicalaire et topochemique a été choisi pour deux raisons. La première est qu'il ne nécessite pas le recours à des réactifs initiateurs de radicaux ou à des systèmes d'irradiation très puissants. La seconde est liée à la définition d'une polymérisation topochemique où, pour que la réaction ait lieu, les fonctions diacétylénique doivent être placées à une distance bien définie les unes des autres,^{112,113} ce qui est le cas avec les arrangements hémi-micellaires observés.

¹⁰⁷ Ke P.C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** 439-447 (2007)

¹⁰⁸ Wallace E.J., Sansom M.S.P. *Nanotechnology* **20** 045101 (2009)

¹⁰⁹ Islam M.F., Rojas E., Bergey D.M., Johnson A.T., Yodh A.G. *Nano Letters* **3** 269-273 (2003)

¹¹⁰ Mackiewicz N., Surendran G., Remita H., Keita B., Zhang G., Nadjò L., Hagège A., Doris E., Mioskowski C. *J. Am. Chem. Soc.* **130** 8110-8111 (2008)

¹¹¹ Rickling S., Schultz P., Mioskowski C. Brevet FR2853657 (2003)

¹¹² Wegner G. *Makromol. Chem.* **154** 35-48 (1972)

¹¹³ Lauher J.W., Fowler F.W., Goroff N.S. *Acc. Chem. Res.* **41** 1215-1229 (2008)

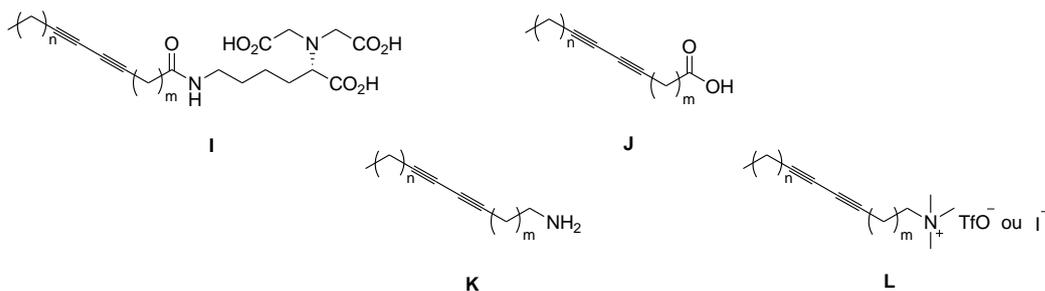


Figure 1.23 : Différents types de lipides photo-polymérisables étudiés ($4 < n < 11$ et $1 < m < 9$)

En présence respectivement de SDS ou de bromure de dodécyltriméthylammonium (DTAB), seuls les lipides NTA **I** et ammonium **L** où $n=11$ et $m=8$ ont conduit à des arrangements hémi-micellaires. Cependant, après polymérisation des structures obtenues, l'étape d'extraction n'a été étudiée qu'avec le premier lipide. Celle-ci, effectuée par électrophorèse, a permis de fournir la première génération de constructions lipidiques polymérisées (CLP) (Figure 1.24).

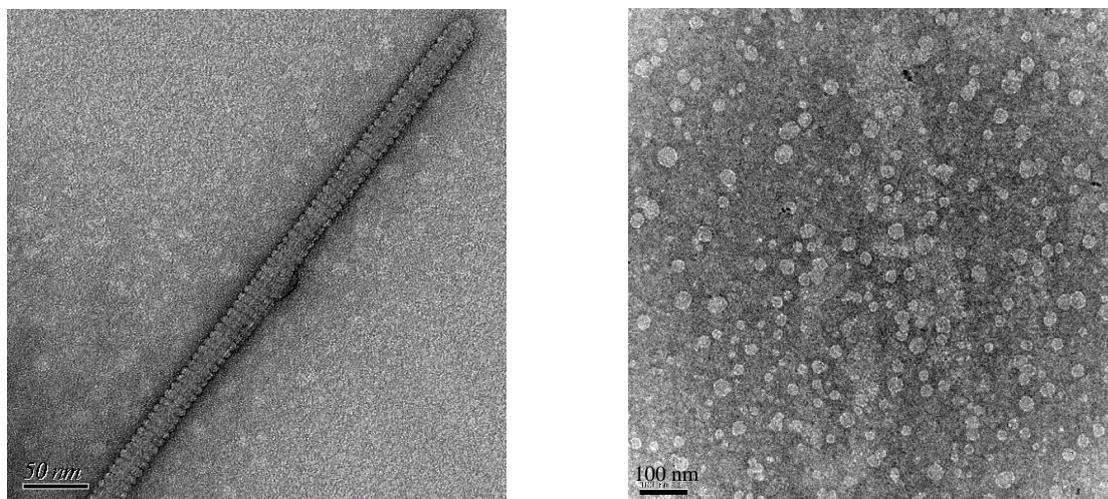


Figure 1.24 : Image MET de SWNTs couverts d'arrangements lipidiques (gauche) et de CLP (droite)

III.2. Propriétés d'encapsulation

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe **II.2.**, la force motrice vers la formation de tels types d'arrangements réside dans le fait que la totalité des corps hydrophobes (chaînes grasses des lipides et nanotubes) est protégée du milieu externe aqueux. De ce fait, une fois isolées des nanotubes, les CLP proposent une structure externe idéalisée hydrophile due à la

présence des têtes NTA et un cœur hydrophobe initialement généré par le caractère hydrophobe du nanotube (Figure 1.25). Il devient alors tout à fait envisageable d'utiliser ces CLP en tant que nouveau système pour la solubilisation de molécules hydrophobes. Une première série de tests effectués au sein du laboratoire a consisté à étudier le comportement de ces CLP en présence de trois rylènes (composés colorés). Les résultats ont été très encourageants puisque les CLP ont montré de bonnes capacités à solubiliser ces composés organiques.

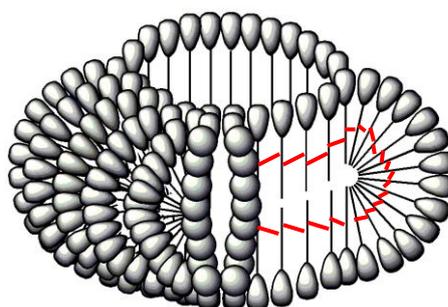


Figure 1.25 : Représentation idéale d'une CLP après son extraction du nanotube de carbone (le réseau polymérisé est représenté en rouge)

Un autre avantage de ces nouveaux nano-objets est leur diamètre qui est dépendant de celui des nanotubes de carbone utilisés comme gabarit. Ainsi, en modifiant la nature de ces derniers (SWNTs ou MWNTs), il est possible d'obtenir des CLP dont la taille est comprise entre 10 et 50 nm, ce qui correspond aux tailles observées pour les micelles et certains liposomes.

IV. Conclusion

Les problèmes de solubilisation de molécules hydrophobes sont actuellement en grande partie résolus grâce à l'utilisation de nanostructures formées à partir d'auto-assemblages de lipides amphiphiles. Les plus connues d'entre elles sont les micelles et les liposomes. En nous inspirant d'une technologie développée au sein du laboratoire, nous proposons un nouveau concept, également pourvu de propriétés de solubilisation, dont le principe repose sur l'adsorption d'un lipide amphiphile photo-polymérisable, le 11,8-NTA, à la surface de nanotubes de carbone.

Dans ce manuscrit, nous présenterons dans un premier temps les différents procédés qui nous ont permis d'obtenir des CLP à partir du lipide 11,8-NTA avec pour point de mire la faisabilité industrielle de l'un d'entre eux. Puis nous détaillerons les différentes applications

que nous avons mises en évidence avec ces arrangements polymérisés particuliers. Enfin, nous terminerons par le développement de nouvelles CLP, élaborées selon le même concept mais en utilisant d'autres types de lipides, dans le but de varier leurs domaines d'application.

Chapitre 2

Vers la synthèse des CLP

I. Introduction

Les différents travaux effectués par Stéphane Rickling au cours de son doctorat¹¹⁴ ont conduit à la mise au point d'un procédé permettant d'obtenir des solutions aqueuses de CLP à partir du lipide amphiphile 11,8-NTA et de SWNTs. Cependant, les volumes et les concentrations de ces solutions restaient trop faibles pour envisager l'étude de leurs propriétés de solubilisation. Le premier objectif de notre projet a donc été consacré à la recherche et au développement d'un procédé efficace de synthèse des CLP. Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord nos efforts vers l'optimisation de celui issu des travaux antérieurs puis nous exposerons nos résultats sur deux procédés alternatifs. Pour chacun d'entre eux, nous détaillerons successivement les cinq étapes clés de la synthèse des CLP à savoir : (1) l'adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone, (2) la purification de l'échantillon, (3) la polymérisation des structures formées, (4) l'extraction des CLP des nanotubes de carbone et (5) l'isolement des CLP. Nous verrons que selon le procédé utilisé, les étapes 2 et 3 peuvent être inversées. Mais avant cela, nous présenterons les différentes voies de synthèse élaborées pour obtenir le lipide 11,8-NTA ainsi que les tests qui ont été effectués dans le but de choisir les nanotubes de carbone les plus appropriés à notre étude.

1.1. Synthèse du lipide 11,8-NTA

Dans le but d'optimiser le protocole proposé par S. Rickling, nous nous sommes concentrés sur le lipide 11,8-NTA. L'un des avantages de ce dernier est qu'il peut être rapidement obtenu à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque (APCD) commercial. Ainsi, sa synthèse a pu se faire, dans un premier temps, en quatre étapes avec un rendement global de 45%. Les deux premières consistent à dialkyler la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine **1** par addition d'acide bromoacétique puis la déprotection du carbamate **2** donne le motif NTA **3**. La pré-activation

¹¹⁴ Rickling S., *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg* (2004)

de l'APCD **4** par la *N*-hydroxysuccinimide puis le couplage peptidique entre l'intermédiaire activé **5** et la tête NTA **3** permettent enfin d'obtenir le lipide 11,8-NTA **6** (Schéma 2.1).

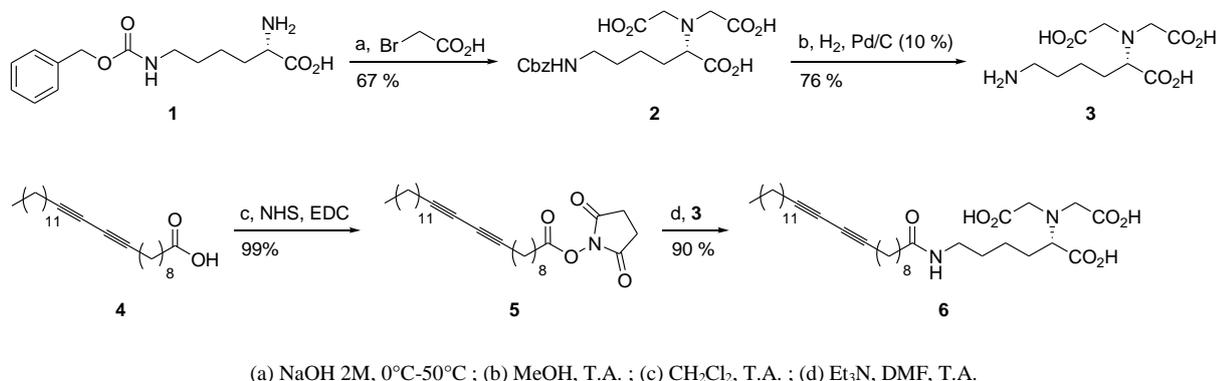


Schéma 2.1 : Première approche vers la synthèse du lipide 11,8-NTA

Les deux étapes limitantes de cette approche sont celles liées à la synthèse du motif NTA. C'est pourquoi, une seconde voie de synthèse a été développée dans le but d'augmenter le rendement d'obtention de ce motif et donc le rendement global. Bien que le nombre d'étapes passe de deux à trois, le principe reste le même. Dans ce cas, l'étape initiale consiste en une double addition de bromoacétate de méthyle sur l'ester méthylique de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine **7**. La déprotection du carbamate **8** par hydrogénéation catalytique permet d'obtenir l'intermédiaire **9** qui, après une dernière étape d'hydrolyse donne le motif NTA **3**. Les rendements de ces trois étapes sont respectivement de 97, 99 et 98% ce qui est meilleur que pour la première approche (67 et 76%). La suite de la synthèse reste identique et permet d'obtenir le lipide 11,8-NTA avec un rendement global de 84% (Schéma 2.2).

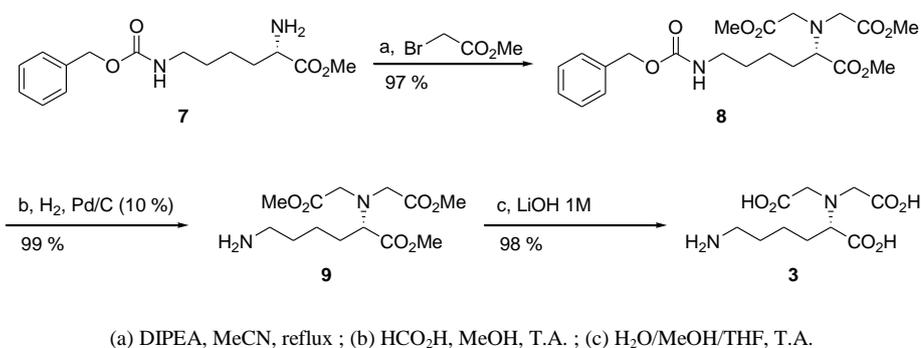


Schéma 2.2 : Seconde approche vers la synthèse du lipide 11,8-NTA

Notons que la tête NTA **3** est devenue commercialement disponible. Son utilisation directe a permis de diminuer le nombre d'étapes de la synthèse du lipide à deux (activation de l'APCD puis couplage) avec un rendement global de l'ordre de 90%. De plus, ces deux étapes peuvent encore être simplifiées puisqu'il n'est pas nécessaire d'isoler l'ester activé **5**.

1.2. Choix des nanotubes de carbone

a – Etude qualitative sur les différents fournisseurs de nanotubes de carbone

Parmi les trois types de nanotubes de carbone existants, SWNTs, DWNTs et MWNTs, tous sont compatibles avec la stratégie mise en place quant à l'adsorption de lipides sur leur surface. Cependant, de nombreux fournisseurs proposent ces nanotubes. C'est pourquoi nous avons décidé de mener une rapide étude comparative dans le but de déterminer lequel d'entre eux offrait le produit le mieux adapté à notre recherche. Pour cela, le comportement de plusieurs nanotubes de carbone en présence du lipide 11,8-NTA selon des conditions standard d'adsorption (1mg/ml en nanotubes ; 1mg/ml en lipide ; 1% de SDS ; TRIS) a été analysé par MET. Un lot de nanotubes est considéré adapté lorsque (1) des striations régulières sont observées à la surface des nanotubes, (2) le cliché MET est de bonne qualité (faible présence d'impureté, nanotubes dissociés) et (3) les nanotubes sont faciles à manipuler (certains lots pouvant être très pulvérulents) (Tableau 2.1). Notons que les critères concernant les nanotubes sont classés par ordre d'importance décroissant.

| Type de nanotubes | Fournisseur | Critères de sélections | | | Observations |
|--------------------------|---------------------|-------------------------------|----------|----------|---------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| SWNTs | Aldrich | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Nanocyl | ✓ | x | ✓ | adapté |
| | Mer Corp. (purifié) | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Mer Corp. (brut) | ✓ | x | ✓ | adapté |
| | Nanoledge (lot 448) | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Nanoledge (lot 502) | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| DWNTs | Aldrich | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Nanocyl | ✓ | x | ✓ | non adapté |
| | Mer Corp. | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Dongshey Tang | ✓ | ✓ | x | non adapté |
| MWNTs | Aldrich | x | x | ✓ | non adapté |
| | Nanocyl (thin) | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Nanocyl (very thin) | x | x | ✓ | non adapté |

| | | | | | |
|-------|--|---|---|---|------------|
| | Nanostructured and Amorphous Materials, Inc. | x | ✓ | x | non adapté |
| MWNTs | Arkema (lot 4062) | ✓ | x | ✓ | adapté |
| | Arkema (lot 5002) | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | n-Tec | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |
| | Prof. Forró | ✓ | ✓ | ✓ | adapté |

Tableau 2.1 : Etude comparative des différents types de nanotubes de carbone

Ces nombreux tests ont permis dans un premier temps de démontrer que tous les SWNTs sont appropriés à notre recherche. Cependant, nous nous sommes limités à l'utilisation de ceux du fournisseur américain MER Corporation (Figure 2.1, gauche) puisqu'ils avaient déjà été employés lors des travaux précédents. Notons toutefois que nous avons travaillé avec le lot purifié mais que celui-ci n'est plus commercialisé. En ce qui concerne les MWNTs, nous remarquons que plusieurs lots pourraient être utilisés. Toutefois, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux de la compagnie norvégienne n-Tec et à ceux du Prof. Forró¹¹⁵ (Figure 2.1, milieu et droite). En effet, en plus de répondre aux différents critères décrits précédemment, les nanotubes issus de ces deux lots ont la particularité d'être rectilignes, ce qui pourrait être un atout lors de l'étape d'extraction des CLP. Notons que les n-Tec sont synthétisés industriellement par la technique de l'arc électrique, comme le sont les SWNTs MER Corp. précédemment cités alors que les Forró sont obtenus, à l'échelle du laboratoire, par la méthode CVD en décomposant catalytiquement de l'acétylène à 720°C en présence de différents catalyseurs supportés sur du CaCO₃. Pour des raisons de disponibilité, notre choix s'est cependant arrêté sur les MWNTs n-Tec, commerciaux.

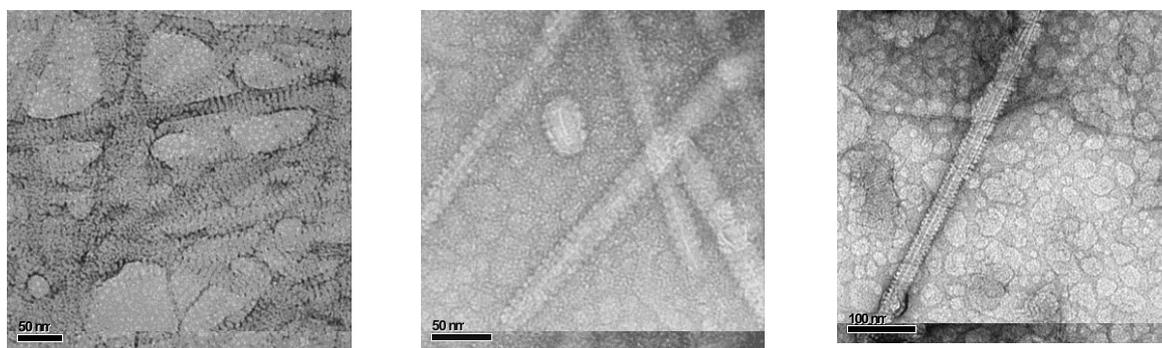


Figure 2.1 : Images MET de SWNTs MER Corp. (gauche), de MWNTs Forró (centre) et de MWNTs n-Tec (droite) couverts par le lipide 11,8-NTA

¹¹⁵ Couteau E., Hernadi K., Seo J.W., Thiên-Nga L., Mikó Cs., Gaál R., Forró L. *Chem. Phys. Lett.* **378** 9-17 (2003)

Enfin, pour ce qui est des DWNTs, le prix de ces derniers encore trop élevé et les résultats trop peu encourageants n'en ont pas justifié l'utilisation. Depuis le début du projet, cette liste de fournisseurs non exhaustive et les améliorations quant à la qualité des nanotubes n'ont cessé de croître et ce quelque soit le type de nanotubes. Par conséquent, il reste tout à fait possible d'envisager l'utilisation de nanotubes provenant d'autres compagnies.

b – Caractéristiques des nanotubes choisis

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les deux lots de nanotubes de carbone que nous avons choisis sont produits *via* la méthode de l'arc électrique. En ce qui concerne les SWNTs MER Corp., une étape supplémentaire de purification par une méthode non révélée par le fournisseur permet de générer des échantillons d'une pureté supérieure à 99%. Le diamètre de ces nanotubes est compris entre 1,2 et 1,4 nm et leur longueur entre 10 et 50 μm . Cependant ils sont le plus souvent présents sous forme de petits agrégats d'une vingtaine de nanotubes (Figure 2.2, gauche ; cette illustration est représentative d'un lot non purifié, le lot purifié n'étant plus commercialisé donc absent du site internet MER). Pour ce qui est des MWNTs n-Tec, les échantillons sont composés de 65% en masse de nanotubes et de 35% d'impuretés, en majorité des particules graphitiques. Notons qu'aucune indication quant à une étape de purification n'a été donnée par le fournisseur. Leur diamètre est compris entre 2 et 50 nm avec une moyenne se situant autour de 30 nm et leur longueur est de l'ordre de 2 μm (Figure 2.2, droite).

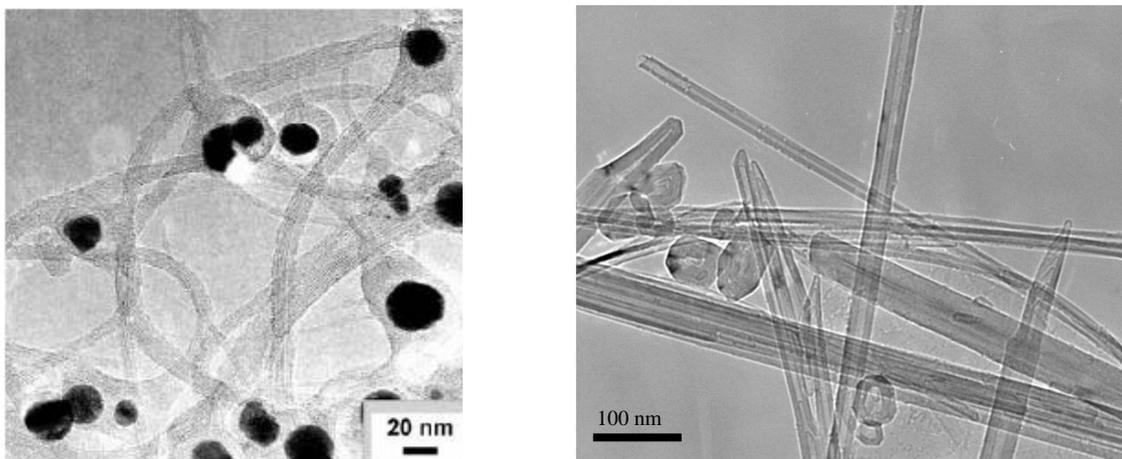


Figure 2.2 : Images MET de SWNTs¹¹⁶ MER Corp. (gauche) et de MWNTs¹¹⁷ n-Tec (droite)

¹¹⁶ www.opus1.com/~mercorp/nano.pdf

¹¹⁷ www.n-tec.no/Leftmenu/Products/MultiwallNanotubes.aspx

II. Premier procédé d'obtention des CLP

Le but principal de ce premier procédé a été d'obtenir en quantité suffisante un lot très pur de CLP. Nous détaillerons dans ce paragraphe chacune des étapes étudiées à cet effet avec un intérêt plus particulier pour l'extraction des CLP des nanotubes par électrophorèse.

II.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone

Pour cette première étape, une solution de lipide 11,8-NTA est préparée à une concentration de 1 mg/ml dans une solution tampon aqueuse de TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminométhane 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8) contenant 1% massique de SDS. Notons que sans indication contraire, le terme général de tampon TRIS sera utilisé pour ces proportions. A cette valeur de pH, nous constatons que le lipide 11,8-NTA est totalement solubilisé. L'utilisation de SDS est, quant à elle, supposée permettre la formation de micelles mixtes avec le lipide 11,8-NTA et ainsi faciliter la formation des auto-arrangements. A cette solution est ajoutée la même quantité de SWNTs que de lipide puis le mélange est soniqué trente minutes au bain à ultrasons pour favoriser la dissociation des plus gros agrégats de SWNTs. L'échantillon ainsi obtenu est analysé par MET (Figure 2.3).



Figure 2.3 : Echantillon de SWNTs MER Corp. dans du tampon TRIS sans lipide 11,8-NTA (gauche) et avec lipide 11,8-NTA (milieu) ; Image MET de SWNTs MER Corp. couverts par le lipide 11,8-NTA (droite)

Comme nous pouvons le remarquer sur ces différentes photographies, l'adsorption du lipide à la surface des nanotubes permet la mise en suspension homogène de SWNTs dans un milieu aqueux. La stabilité de ces suspensions a été observée pendant plusieurs mois. En ce qui concerne le cliché MET, l'adsorption du lipide à la surface des SWNTs est mise en évidence

par la présence de striations régulières autour des tubes d'apparence semblable à des anneaux. A partir de ce point, nous utiliserons le terme de nanotubes habillés pour parler de nanotubes couverts d'arrangements lipidiques. Ce terme est à mettre en opposition à celui de nanotubes nus pour parler de nanotubes dépourvus d'arrangements lipidiques.

Conditions retenues :

- œ concentration en lipide : 1 mg/ml
- œ rapport massique lipide/nanotubes : 1/1
- œ apport en SDS : 1% massique
- œ durée de sonication : 30 min au bain à ultra-sons

II.2. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques

Dans l'hypothèse où du détergent est présent dans les striations observées à la surface des SWNTs, des problèmes pourraient être rencontrés lors de l'étape de polymérisation. La deuxième étape du procédé 1 consiste donc à purifier l'échantillon isolé au point précédent pour obtenir une suspension stable de SWNTs habillés, exempte de SDS et de lipide non-adsorbé. Cette purification se fait par le biais de deux sous-étapes : dialyse et centrifugation. La dialyse, répétée sept fois contre du tampon TRIS, permet d'obtenir un premier échantillon dépourvu de SDS, dont l'analyse MET (Figure 2.4, gauche) révèle encore la présence d'agrégats de lipide stables et de taille trop importante pour traverser la membrane de dialyse (cutoff : 25000 MW).

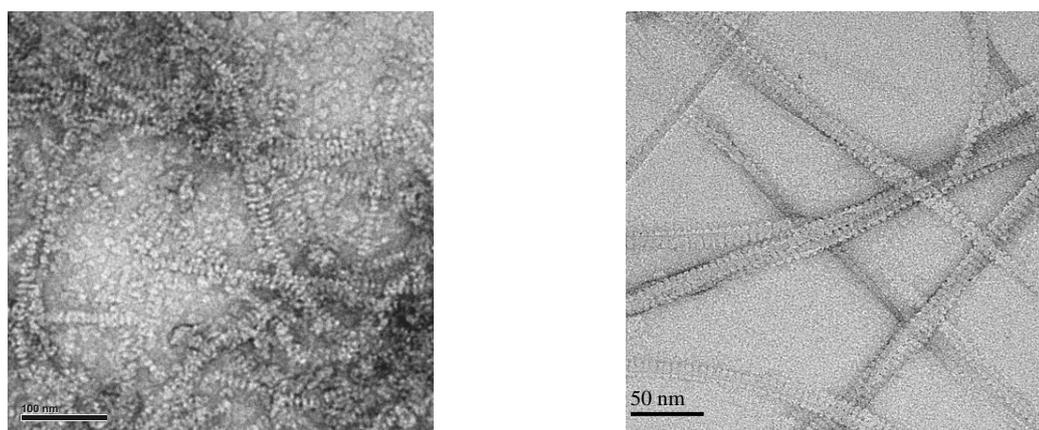


Figure 2.4 : Images MET d'un échantillon de SWNTs habillés après dialyse (gauche) et après centrifugation (droite)

Cet échantillon est ensuite soumis à deux cycles de centrifugation à 14000×g en remplaçant à chaque fois le surnageant par du TRIS. Après ce traitement supplémentaire, l'analyse MET (Figure 2.4, droite) montre que la totalité des agrégats de lipides précédemment cités a totalement disparu, fournissant un premier lot propre de SWNTs habillés et validant cette méthode de purification.

Pour ce qui est de l'aspect des nanotubes, nous observons la présence de petits fagots de SWNTs complètement recouverts de lipides. La morphologie exacte des arrangements fait l'objet de nombreux débats et des structures telles que des hémi-micelles, des micelles cylindriques, une adsorption aléatoire ou encore des couches lipidiques suivant une direction parallèle ou antiparallèle ont été suggérées.^{118,119,120,121,122} Comme cela avait déjà été observé avec le SDS et d'autres lipides amphiphiles,¹²³ le recouvrement observé dans notre cas correspond à la juxtaposition régulière de striations perpendiculaires à l'axe du tube, pouvant être comparées à des anneaux, dont la largeur est égale à $8,5 \pm 0,3$ nm. Ces deux observations sont en accord avec l'hypothèse de la formation d'arrangements hémi-micellaires. En effet, dans cette configuration, l'organisation des lipides est telle que la largeur d'une striation correspond à deux fois la longueur du lipide. Or, le lipide 11,8-NTA a une longueur de 4,3 nm dans sa version allongée, ce qui conduit à une largeur théorique des striations de 8,6 nm. Afin de clarifier la structure de ces anneaux, il faudrait déterminer la façon dont le lipide s'organise, individuellement, dans ces arrangements. Pour cela, les images MET ne suffisent plus. En revanche, des études complémentaires de simulations moléculaires dynamiques pourraient nous aider à comprendre les dynamiques de reconnaissance du lipide 11,8-NTA et des SWNTs avec des résolutions temporaires et spatiales adéquates.¹²⁴ Différents types de champs de force devraient être pris en compte pour la simulation de systèmes comprenant un SWNT, plusieurs entité de lipide 11,8-NTA et des molécules d'eau.^{118,125,126}

Conditions retenues :

- œ sept cycles de dialyse contre du TRIS
- œ deux cycles de centrifugation à 14000×g

¹¹⁸ Qiao, R., Ke, P.C. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13656-13657 (2006)

¹¹⁹ Wu, Y. *et al. J. Phys. Chem. B* **110**, 2475-2478 (2006)

¹²⁰ Yurekli, K., Mitchell, C.A., Krishnamoorti, R. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9902-9903 (2004)

¹²¹ Islam, M.F., Rojas, E., Bergey, D.M., Johnson, A.T., Yodh, A.G. *Nano Lett.* **3** 269-273 (2003)

¹²² O'Connell M.J., Bachilo S.M., Huffman C.B., Moore V.C., Strano M.S., Haroz E.H., Rialon K.L., Boul P.J., Noon W.H., Kittrell C., Ma J., Hauge R.H., Weisman R.B., Smalley R.E. *Science* **297** 593-596 (2002)

¹²³ Richard C., Balavoine F., Schultz P., Ebbesen T.W., Mioskowski C. *Science* **300** 775-778 (2003)

¹²⁴ Ke, P.U. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** 439-447 (2007)

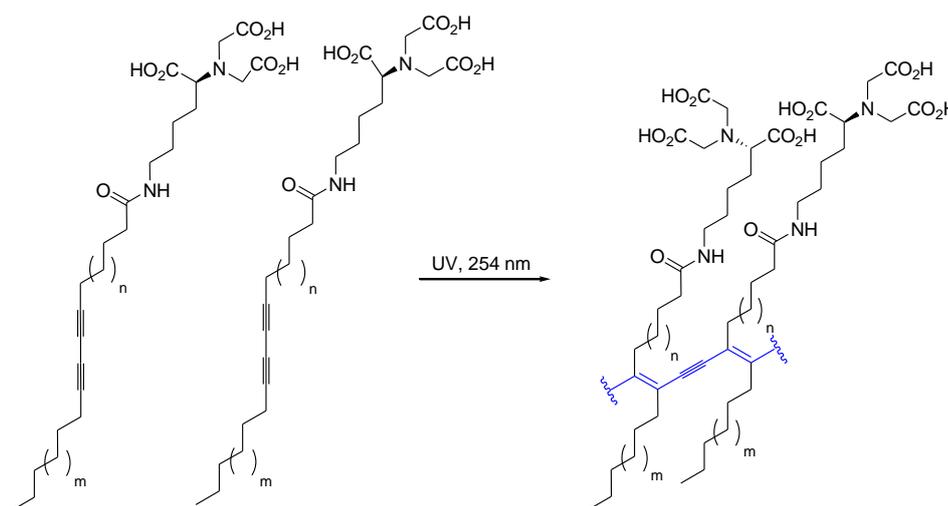
¹²⁵ Matarredona, O. *et al. J. Phys. Chem. B* **107** 13357-13367 (2003)

¹²⁶ O'Connell, M.J. *et al. Chem. Phys. Lett.* **342**, 265-271 (2001)

II.3. Polymérisation des arrangements lipidiques

Cette troisième étape a pour but de consolider la structure des anneaux précédemment formés en liant de façon covalente un lipide avec deux de ses plus proches voisins, selon une réaction de polymérisation topochimique. Comme nous l'avons signalé dans le chapitre 1, cette étape de polymérisation est possible grâce à la formation de radicaux au niveau du motif diacétylénique sous l'effet d'une irradiation UV de longueur d'onde λ égale à 254 nm conduisant à une addition 1-4 des monomères.¹²⁷ Un échantillon purifié de SWNTs habillés est donc soumis à un rayonnement UV (12 W ; 254 nm) pendant une heure. Par MET, aucun discernement ne peut être fait avant et après irradiation. Dans le but de vérifier l'efficacité de la polymérisation, un traitement supplémentaire de trois cycles de lavage au méthanol et de centrifugation à $3000\times g$ est effectué sur deux échantillons dont un seul a été irradié. Cette technique a pour effet de détruire les structures formées sur les SWNTs lorsque celles-ci ne sont pas consolidées. L'analyse en MET du dernier culot de chacun des deux échantillons permet de confirmer la présence d'anneaux uniquement dans le cas de celui irradié ; l'étape de polymérisation a donc été efficace et peut être validée.

Une information supplémentaire peut être apportée quant à la nature du polymère formé en prenant compte de la disposition des lipides au sein des arrangements ainsi que le schéma réactionnel général de polymérisation (Figure 2.5).



¹²⁷ Lauher J.W., Fowler F.W., Goroff N.S. *Acc. Chem. Res.* **41** 1215-1229 (2008)

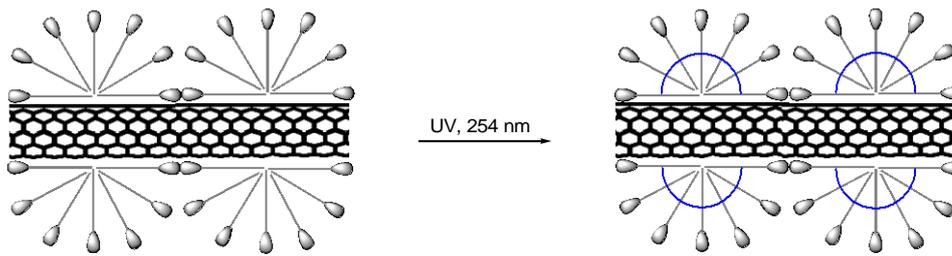


Figure 2.5 : Schéma général de polymérisation (haut) ; Représentation schématique d'une portion de nanotubes de carbone recouverte par des arrangements lipidiques (bas) (la ligne bleue correspond à la chaîne polymérisée)

En effet, nous pouvons supposer (1) que celle-ci n'a lieu qu'au sein d'un même anneau et donc qu'il n'y a pas formation de liaisons covalentes entre deux anneaux adjacents, (2) qu'il n'y a pas formation de liaisons covalentes entre les lipides et les nanotubes.

De plus, l'irradiation UV des anneaux ne génère pas une seule chaîne de polymères réticulée mais plutôt un réseau tridimensionnel de plusieurs chaînes de polymères linéaires enchevêtrées au sein d'un anneau. En tenant compte de ces différentes informations, il devient alors possible d'imaginer l'extraction de ces structures en les faisant glisser le long de l'axe des nanotubes.

Conditions retenues :

- ☞ durée d'irradiation : une heure
- ☞ appareil : lampe UV (12 W ; 254 nm)

II.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés

Après avoir obtenu des SWNTs recouverts d'arrangements lipidiques polymérisés, nous avons cherché à extraire ces derniers de leur gabarit par le biais d'une méthode électrochimique : l'électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 2.6, haut). Lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique, les anneaux, chargés négativement en milieu basique, migrent vers la cathode en glissant le long de l'axe des nanotubes. Une fois extraites, les CLP piégées dans le gel d'agarose sont isolées par une autre méthode électrochimique au principe identique : l'électroélution (Figure 2.6, bas).

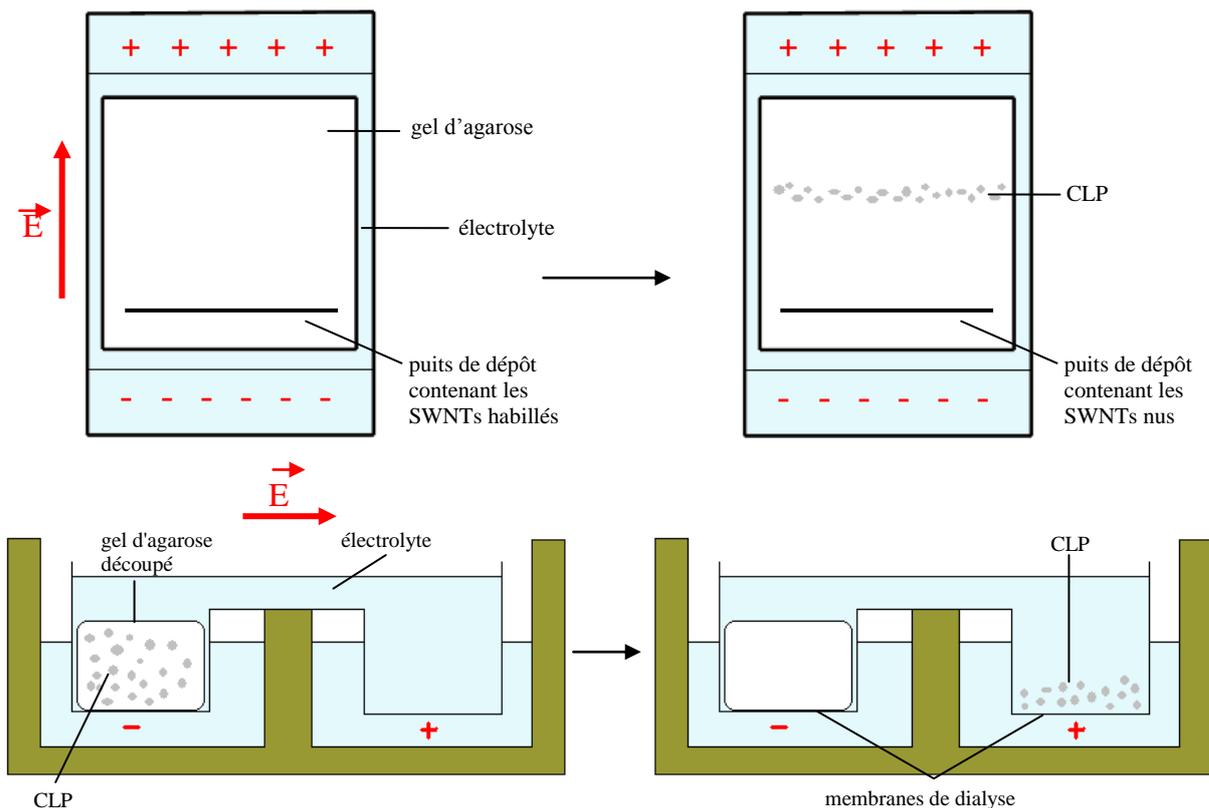


Figure 2.6 : Montages d'électrophorèse (haut) et d'électroéluion (bas) (la flèche rouge représente le sens de migration)

Ces deux méthodes, dont nous commencerons par présenter le principe, ont déjà été utilisées lors du procédé initial.¹¹³ Cependant, nous avons cherché à les optimiser en faisant varier certains paramètres puis en développant une nouvelle technique d'extraction combinant l'électrophorèse et l'électroéluion.

a – Principes généraux de l'électrophorèse sur gel d'agarose et de l'électroéluion

Très utilisée dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire pour la séparation de protéines ou d'ADN, l'électrophorèse¹²⁸ est une technique chimique d'analyse de masse des molécules. Elle repose sur l'aptitude de molécules chargées à migrer dans un gel poreux lorsqu'un courant électrique y est appliqué. Selon la porosité du gel et la taille des objets à séparer, la migration est plus ou moins rapide. Dans le cadre de notre projet, nous nous limiterons à l'utilisation de gels d'agarose dont l'efficacité a déjà été prouvée dans le

¹²⁸ Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press : New York (1987)

protocole initial. Cette substance très hydrophile est capable de former des gels solides même à faible concentration (de l'ordre de 1%). Le phénomène de gélification, à basse température, est dû à la formation d'une multitude de liaisons hydrogènes entre les longues molécules linéaires de dextran dont il est composé. La grande porosité des gels d'agarose les rend très utiles pour séparer des objets de taille élevée. Pour les objets de plus petites tailles, l'utilisation de gels de polyacrylamide est plus fréquente, mais s'est avéré inappropriée dans notre cas. Après migration, les différentes molécules piégées dans le gel d'électrophorèse sont ensuite extraites par électroélution. Le principe de cette technique est le même que celui de l'électrophorèse et permet d'obtenir des échantillons d'objets en solution dans l'électrolyte.

b – Résultats : électrophorèse sur gel d'agarose suivie de l'électroélution

Pour l'étape d'électrophorèse, nous avons voulu étudier les effets causés par la densité du gel d'agarose et par la présence de SDS à la fois dans l'électrolyte et dans le gel. Une modification au niveau du premier paramètre permet de faire varier la structure du gel en le rendant plus ou moins poreux, ce qui devrait avoir une incidence sur la séparation des différentes espèces migrantes. L'utilisation de SDS est quant à elle justifiée dans le cas de séparations de protéines, où la partie hydrophobe du détergent interagit avec les parties hydrophobes de la protéine permettant à cette dernière d'augmenter sa densité de charge. Ceci est moins évident dans notre cas, la surface des anneaux étant complètement chargée. Plusieurs gels sont donc préparés, à différentes proportions en agarose, dans une solution aqueuse tamponnée de TRIS-glycine (Tris 25 mM, glycine 185 mM, pH 8) en présence ou non de 1% massique de SDS. Des échantillons de SWNTs habillés et polymérisés tels qu'obtenus au point **II.3.** sont déposés sur ces différents gels puis une tension de 64 V et une intensité de 30 mA sont appliquées pendant 90 min au montage (Tableau 2.2).

| Entrée | Présence de SDS | Proportion en agarose (%) |
|--------|-----------------|---------------------------|
| 1 | | 0,25 |
| 2 | oui | 1 |
| 3 | | 2 |
| 4 | | 0,25 |
| 5 | non | 0,5 |
| 6 | | 1 |

Tableau 2.2 : Conditions expérimentales d'électrophorèse

A la fin de l'expérience et ce quelque soit le protocole utilisé, nous pouvons constater la présence de deux traces noires, l'une au niveau du puits de dépôt correspondant aux différents matériaux qui n'ont pu pénétrer le gel et l'autre, beaucoup plus claire, à une distance d'environ 4 cm du puits de dépôt. Leur analyse MET, après électroélution, a permis de montrer qu'elles correspondaient à des amas de nanotubes pour la première et à des nanotubes courts complètement recouverts d'arrangements lipidiques pour la seconde (Figure 2.7).

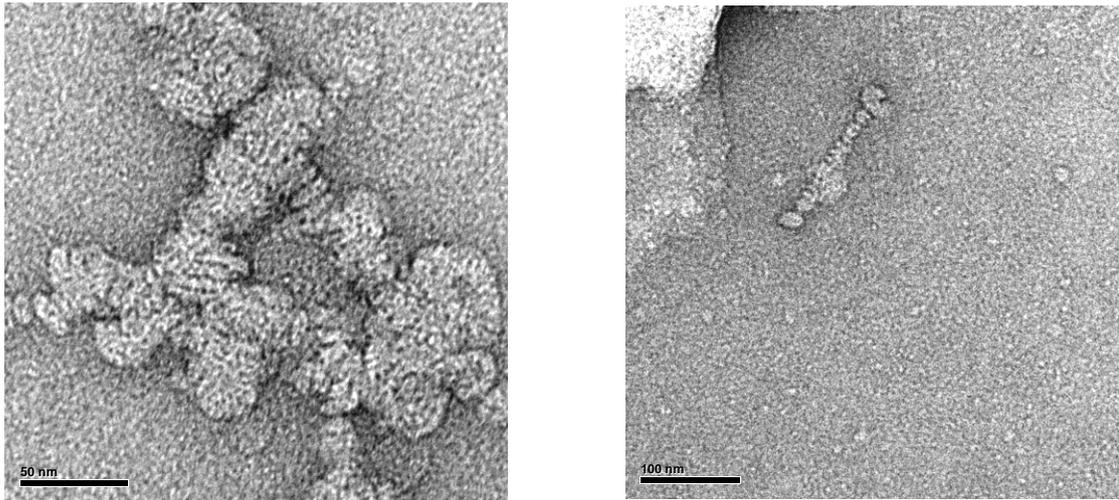


Figure 2.7 : Images MET d'échantillons électroélués prélevés dans le puits de dépôts (gauche) et dans la bande noire ayant migré (droite)

D'après la largeur moyenne des striations observées sur ces clichés ($8,3 \pm 0,1$ nm), nous pouvons affirmer qu'elles sont composées de lipide 11,8-NTA et non de SDS pour lequel ces largeurs sont de 4,5 nm. Dans le but de révéler la présence ou non de CLP dans les gels, ces derniers ont tous été incubés une nuit dans une solution aqueuse de chlorure de nickel (II), le motif NTA possédant la capacité de complexer ce métal. Une bande vert clair est ainsi devenue visible à 4,5 cm du puits de dépôt, soit la distance de migration maximale observée (Figure 2.8). Nous l'avons, par déduction, attribuée aux CLP. Ces différents résultats montrent par leur similitude que, dans la gamme étudiée, l'utilisation de gels plus concentrés en agarose, donc plus discriminants, n'a pas eu d'effet sur la migration des espèces.

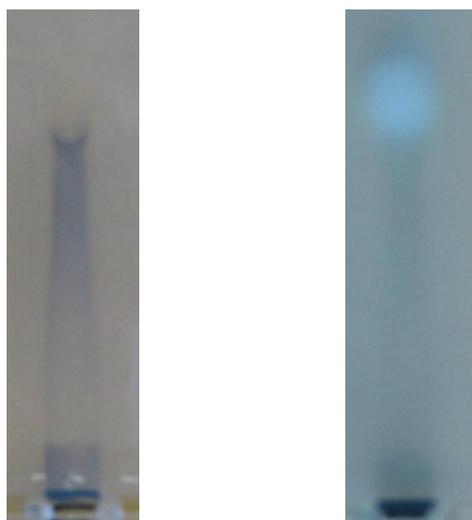


Figure 2.8 : Gels d'électrophorèse sur agarose avant (gauche) et après (droite) incubation dans une solution de chlorure de nickel (II) observés après traitement d'une solution de SWNTs habillés et polymérisés (Entrée 1)

Dans le but de vérifier la nature des objets contenus dans la zone verte, son équivalent non-incubé est découpé puis électro-élué sous une tension de 64 V et une intensité de 30 mA pendant une heure pour chacun des gels. L'électrolyte utilisé est le même que pour l'étape d'électrophorèse. La totalité de la solution contenue dans la cuve reliée à la cathode est ensuite prélevée, dialysée sept fois contre du tampon TRIS afin d'éliminer le SDS (dans le cas des expériences sans SDS, cette étape de dialyse n'est pas à prendre en compte) puis étudiée en MET. Nous ne traiterons ici que les clichés correspondants à l'entrée 1 du tableau 1 (Figure 2.9), les autres gels, en particulier ceux où le SDS n'est pas utilisé, ayant présenté des résultats beaucoup moins convaincants. Les meilleures conditions pour cette expérience sont donc un gel à 0,25% en agarose et la présence de SDS.

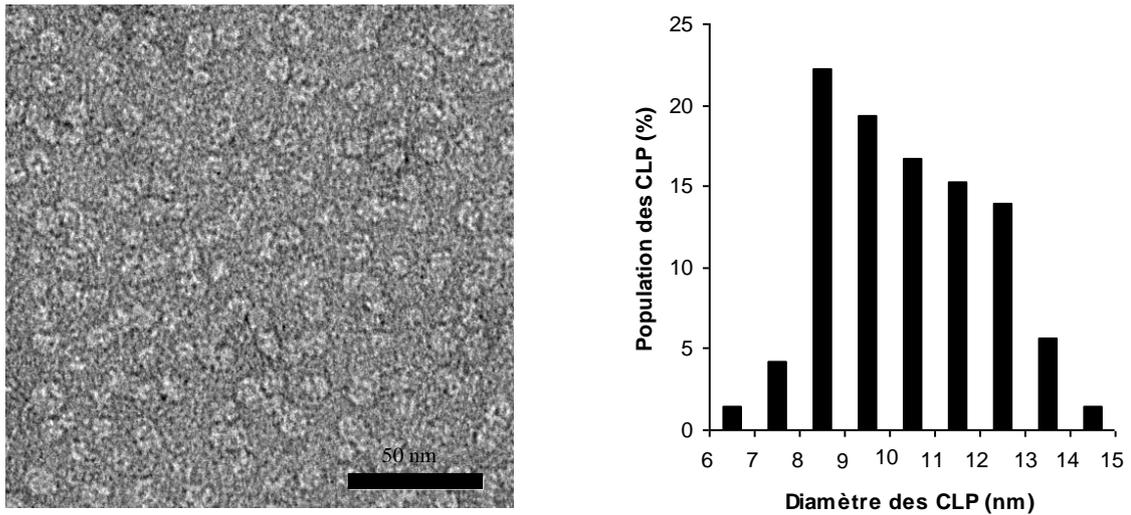
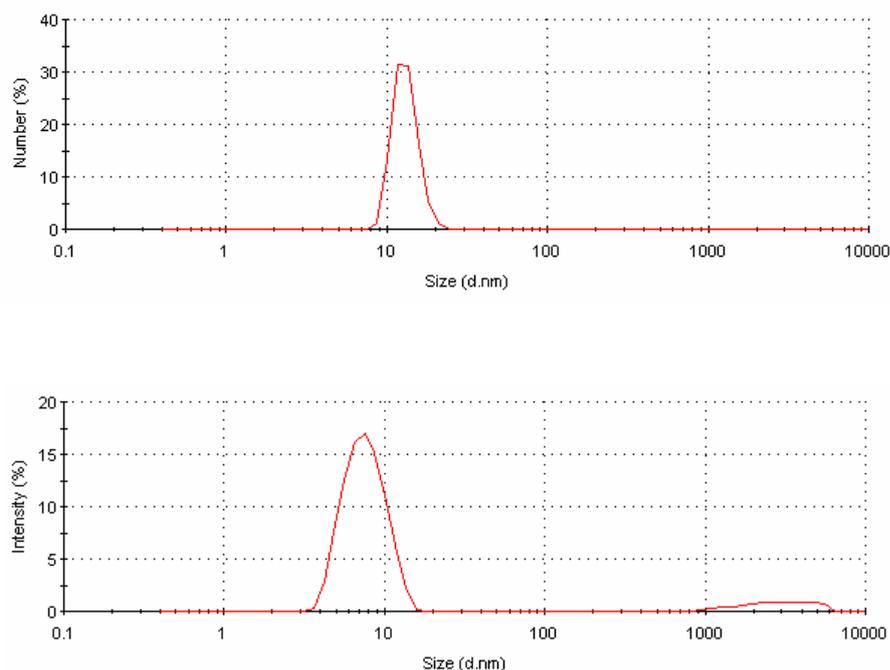


Figure 2.9 : Image MET et histogramme représentant la répartition en taille d'un même échantillon de CLP

Sur ce cliché MET, nous observons une solution homogène de particules *quasi* circulaires ayant une taille moyenne de $10,3 \pm 1,8$ nm et un rapport longueur/largeur moyen de $1,2 \pm 0,1$. Des mesures de granulométrie par diffraction dynamique de la lumière (DLS), donnant une population unique de particules dont la taille est comprise entre 9 et 20 nm, ont par la suite confirmé ces observations (Figure 2.10, haut), les micelles non-polymérisées et polymérisées de lipides 11,8-NTA ont une taille respectivement comprises entre 3 et 15 nm (Figure 2.10, milieu) et entre 3 et 10 nm (Figure 2.10, bas).



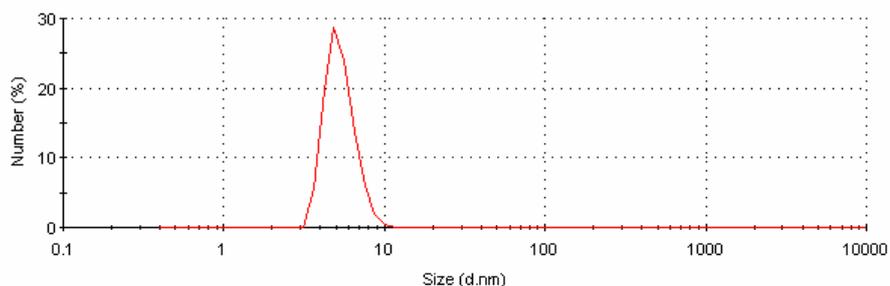


Figure 2.10 : Analyses granulométriques d'échantillons de CLP (haut) et de micelles de lipide 11,8-NTA non-polymérisées (milieu) et polymérisées (bas)

Ces résultats sont en accord avec ceux que la théorie proposait. En effet, en estimant le diamètre d'une CLP à deux fois la longueur du lipide 11,8-NTA ($2 \times 4,3 \text{ nm}$) plus le diamètre d'un nanotube isolé ou d'un petit fagot de nanotubes ($1,2 < x < \sim 6 \text{ nm}$) nous obtenons des valeurs théoriques comprises entre 9 et 15 nm.

Après l'étape d'électroélution, les CLP sont isolées en solution dans l'électrolyte (tampon TRIS-glycine + 1% de SDS). L'échantillon est donc dialysé sept fois douze heures contre du tampon TRIS. A ce stade, nous pouvons assurer que le SDS n'est présent dans l'échantillon que sous forme de traces. En effet, une analyse complémentaire consistant à dialyser sept fois une solution de CLP dans le TRIS à une concentration de 1 mg/ml contenant 1% en masse de SDS puis à doser la présence de détergent en spectrométrie de masse a permis de démontrer qu'il restait moins de 0,3% de SDS en fin de traitement (Figure 2.11).

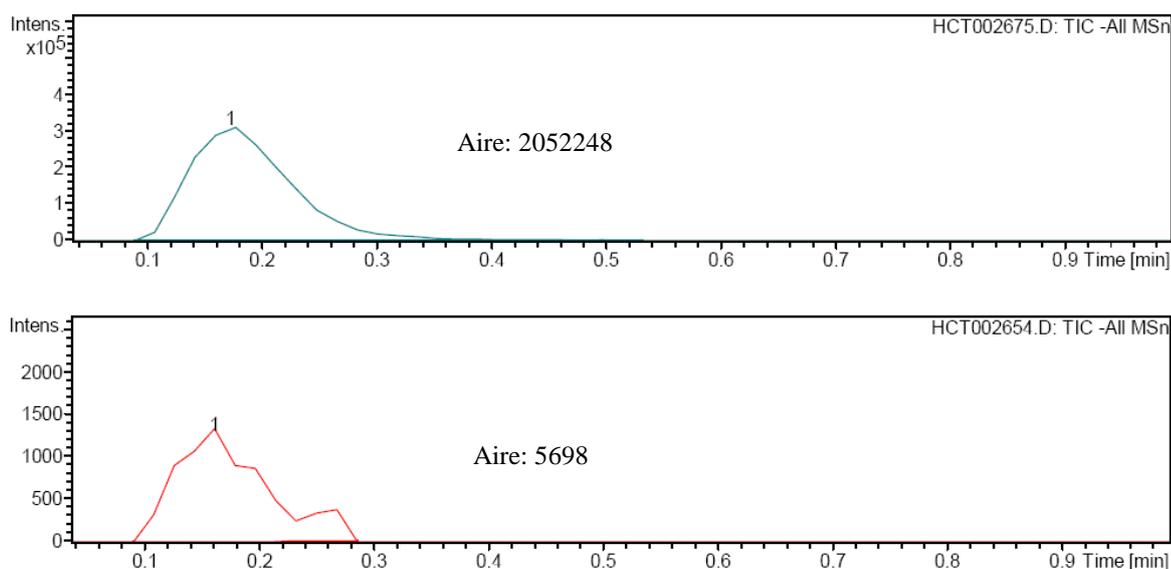


Figure 2.11 : Dosage du SDS avant (haut) et après (bas) sept cycles de dialyse

Une étude similaire est également effectuée, en guise de comparaison, à partir de MWNTs n-Tec. A cet effet, plusieurs gels d'agarose sont préparés de la même façon que pour l'étude à partir de SWNTs MER Corp., puis des échantillons de MWNTs habillés et polymérisés obtenus selon le protocole décrit au paragraphe II.3. sont déposés sur ces différents gels avant d'appliquer une tension de 64 V et une intensité de 30 mA au montage pendant 90 minutes (Tableau 2.3).

| Entrée | Présence de SDS | Proportion en agarose (%) |
|--------|-----------------|---------------------------|
| 1 | oui | 0,25 |
| 2 | | 0,5 |
| 3 | non | 0,25 |
| 4 | | 0,5 |
| 5 | | 1 |

Tableau 2.3 : Conditions expérimentales d'électrophorèse sur des MWNTs n-Tec

Après une nuit d'incubation dans une solution aqueuse de chlorure de nickel (II) de l'échantillon correspondant à l'entrée 1, une tache vert clair attribuée aux CLP se révèle à une distance constante d'environ 4,5 cm du puits de dépôt. L'analyse MET de cette zone (Figure 2.12), après électroélution montre la présence de particules sphériques semblables à celles observées précédemment mais de diamètre moyen supérieur.

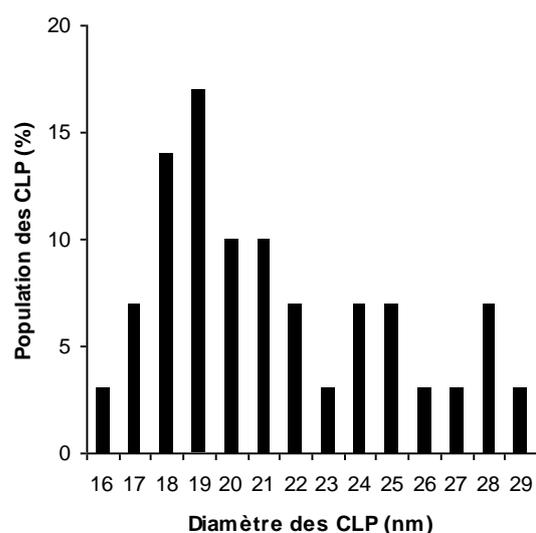
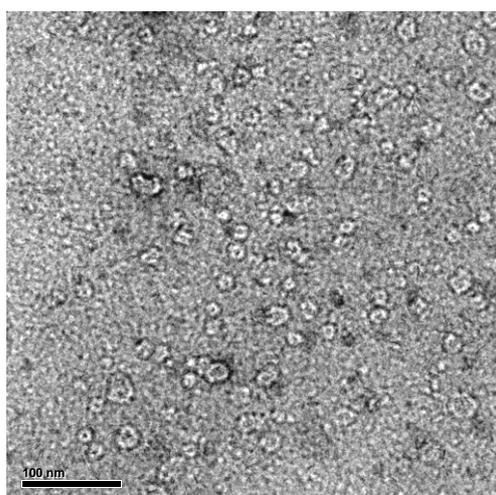


Figure 2.12 : Image MET et histogramme représentant la répartition en taille d'un même échantillon de CLP obtenues à partir de MWNTs

Sur ce cliché MET, nous observons une solution relativement homogène de particules *quasi* circulaires ayant une taille moyenne de 21,4 nm. Ces valeurs sont légèrement inférieures à ce que la théorie propose. En effet, le diamètre moyen des MWNTs n-Tec est de 30 nm ce qui devrait donner des CLP au diamètre de l'ordre de 38 nm ($30 + 2 \times 4,3$ nm). Néanmoins, ces nano-objets sont bien différents, au niveau de leur taille, de ceux issus de SWNTs MER Corp. Ces résultats illustrent le fait que pour des conditions identiques, à savoir un gel à 0,25% en agarose et la présence de SDS, il est possible d'obtenir des CLP issues de l'auto-arrangement de lipide 11,8-NTA à la surface aussi bien de SWNTs que de MWNTs. Notons également que la trace noire correspondant à des nanotubes ayant migrés est également visible.

c – Résultats : électrophorèse sur gel d'agarose et électroélution combinées

Dans le but de simplifier l'étape d'extraction, nous avons voulu combiner les deux étapes d'électrophorèse et d'électroélution : leur principe étant le même. Pour cela, nous avons utilisé un montage d'électroélution classique où nous avons tout d'abord coulé, dans la cuve reliée à l'anode, un premier gel d'agarose contenant une solution de SWNTs habillés et polymérisés. Puis nous l'avons recouvert d'un autre gel d'agarose neutre. En nous basant sur les observations faites lors de l'étape d'électrophorèse, nous avons appliqué un courant électrique de 64 V et de 30 mA jusqu'à ce que la trace noire correspondant aux nanotubes courts couverts d'anneaux arrive à la limite supérieure du gel neutre. A cet instant, les CLP isolées devraient déjà se situer dans la cuve reliée à la cathode (Figure 2.13).

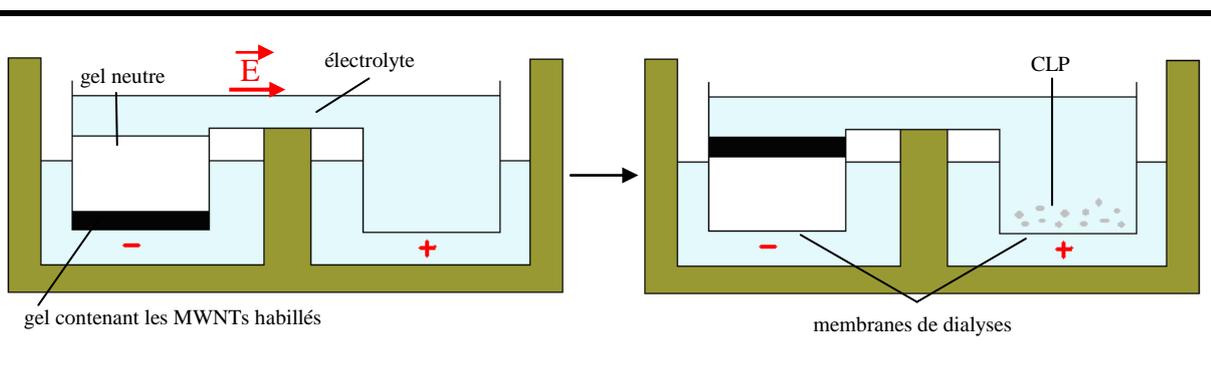


Figure 2.13 : Montage du système électrophorèse/électroélution combinées (la flèche rouge représente le sens de migration)

Ces tests n'ont été effectués que sur des échantillons obtenus à partir de SWNTs et, une fois encore, en présence ou non de SDS. De plus, au niveau du gel neutre, différentes concentrations en agarose ont été étudiées (Tableau 2.4).

| Entrée | Présence de SDS | % en agarose |
|--------|-----------------|--------------|
| 1 | | 0,25 |
| 2 | oui | 0,7 |
| 3 | | 0,7 |
| 4 | non | 1 |

Tableau 2.4 : Essais d'électrophorèse et d'électroélution combinées

Ces tests ont été encourageants dans le sens où l'utilisation de cette nouvelle méthode nous a permis d'obtenir le même type d'objets qu'avec la méthode initiale (Entrée 1). Cependant les différences de migration entre les nanotubes habillés et les CLP sont trop faibles pour permettre une bonne séparation de ces deux corps. Ce problème a été contourné au service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA de Saclay où une barrière physique a été appliquée entre les deux cuves empêchant ainsi les nanotubes de passer de l'une à l'autre.

Conditions retenues :

- œ électrophorèse sur gel d'agarose puis électroélution
- œ proportion massique d'agarose dans le gel : 0,25%
- œ apport en SDS : 1% massique
- œ condition d'électrophorèse : 64 V, 30 mA, 90 min
- œ condition d'électroélution : 64 V, 30 mA, 60 min
- œ purification des CLP : sept cycles de dialyse contre du TRIS

II.5. Isolement des CLP

La technique d'extraction des CLP utilisée et présentée précédemment permet d'obtenir une solution de nano-objets dans du tampon TRIS à pH 8. Ainsi, l'acidification de cette solution jusqu'à un pH < 1 entraîne la précipitation des CLP, phénomène aisément visualisable (Figure 2.14).



Figure 2.14 : CLP dans du tampon TRIS avant (gauche) et après (droite) acidification

Le précipité est ensuite filtré puis lyophilisé pour fournir un premier lot de CLP sec avec un rendement global de l'ordre de 20%.

Conditions retenues :

œ précipitation des CLP par acidification puis filtration et lyophilisation

II.6. Récapitulatif expérimental du procédé 1

A une solution de 8 mg de lipide 11,8-NTA dans 8 ml d'une solution tampon aqueuse de TRIS (100 mM, NaCl 150 mM, pH 8) contenant 1% massique de SDS sont ajoutés 8 mg de SWNTs MER Corp. Le milieu est soniqué 30 min dans un bain à ultra-sons. Après sept dialyses de 12h contre du tampon TRIS, la solution est centrifugée 10 min à 14000×g puis le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon TRIS puis à nouveau centrifugé 10 min à 14000×g. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon TRIS puis irradié 1h sous une lampe UV (12 W, 254 nm). La suspension homogène est déposée sur un gel d'agarose à 0,25% dans une solution tampon de TRIS-glycine (TRIS 25 mM, glycine 185 mM, pH 8) contenant 1% massique de SDS puis un courant de 64 V et 30 mA est appliqué pendant 90 min. Une portion du gel est ensuite incubée une nuit dans une solution aqueuse de chlorure de nickel (II) à 1% afin de révéler les CLP. La partie de gel non-incubé contenant les CLP est électroélueée avec un courant de 64 mV et de 30 mA pendant 60 min en utilisant comme électrolyte la même solution tampon de TRIS-glycine. Un courant inverse est ensuite appliqué pendant 30 sec dans le but de détacher les CLP "collées" sur la membrane. La solution de CLP obtenue est dialysée 7 fois 12h contre du tampon TRIS puis acidifiée avec 3 gouttes d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée jusqu'à

obtention d'un précipité ($\text{pH} < 1$). Celui-ci est filtré puis lyophilisé pour donner 1,6 mg de CLP (Rdt global : 20%).

III. Second procédé d'obtention des CLP

Bien qu'efficace, le procédé 1 ne permet pas de fournir de grandes quantités de CLP du fait de la faible capacité des gels d'agarose utilisés lors de l'étape d'électrophorèse. C'est pourquoi, un second procédé a été développé pour palier ce problème. Les principales modifications apportées à celui-ci ont consisté à utiliser des MWNTs, à s'affranchir de l'emploi de SDS, à changer les conditions de purification et à remplacer les étapes d'électrophorèse et d'électroélution par une étape d'ultra-sonication. Les raisons qui nous ont conduits à travailler avec des MWNTs sont leur prix, moins élevé que celui des SWNTs, et leur capacité à fournir des CLP de diamètre interne plus grand.

III.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone

Pour supprimer l'emploi de SDS, il a été envisagé d'utiliser le lipide 11,8-NTA à une concentration plus forte que dans le procédé 1 (pour rappel : 1 mg/ml). A cette concentration, S. Rickling avait montré qu'aucune striation n'était visible à la surface des nanotubes de carbone, l'obligeant à ajouter du détergent. Une suspension de MWNTs est donc préparée en ajoutant 500 mg de MWNTs n-Tec à 100 ml d'une solution de lipide 11,8-NTA dans le TRIS à une concentration de 5 mg/ml puis en soniquant l'échantillon trente minutes au bain à ultrasons (Figure 2.15)

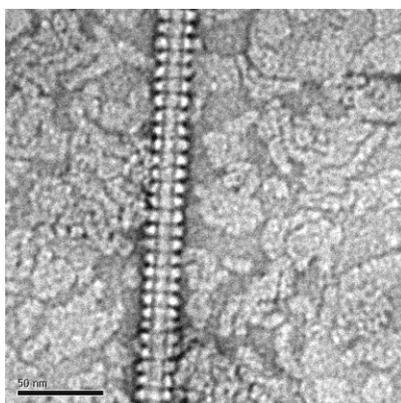


Figure 2.15 : Image MET de MWNTs habillés

Sur ce cliché MET, nous constatons que, dans ces conditions, les MWNTs sont complètement recouverts d'anneaux et que la largeur des striations reste identique à celle observée lors du procédé 1 à savoir $8,6 \pm 0,2$ nm. Cependant, nous observons également la présence d'arrangements lipidiques dans le fond.

Conditions retenues :

☞ concentration en lipide : 5 mg/ml

☞ rapport massique lipide/nanotubes : 1/1

☞ apport en SDS : non

☞ durée de sonication : 30 min au bain à ultra-sons

III.2. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques

Contrairement au procédé 1 qui était axé sur l'aspect qualitatif des CLP, le procédé 2 est plus axé sur l'aspect quantitatif et tient compte d'une éventuelle adaptation sur gros volume. Ainsi, nous avons décidé d'éliminer l'étape de centrifugation qui peut être une difficulté à l'échelle industrielle et de ne conserver que l'étape de dialyse. L'échantillon obtenu au paragraphe précédent est donc purifié par huit cycles de dialyse contre du tampon TRIS puis analysé en MET (Figure 2.16).

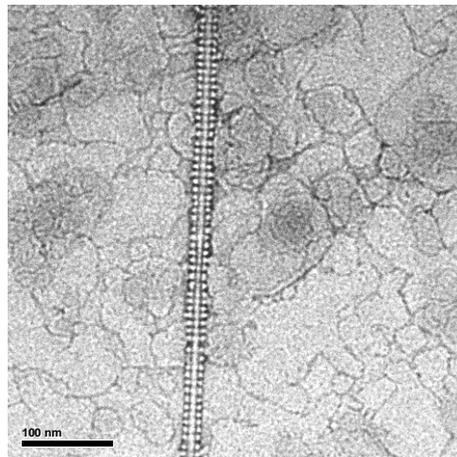


Figure 2.16 : Image MET de MWNTs habillés après purification

Nous constatons toujours sur ce cliché la présence d'arrangements lipidiques dans le fond confirmant le fait que cette méthode de purification est moins efficace que celle du procédé 1. Cependant, aucune trace de SDS n'étant présente, nous avons décidé de poursuivre l'étude.

Conditions retenues :

œ huit cycles de dialyse contre du TRIS

III.3. Polymérisation des arrangements lipidiques

Comme pour le procédé 1, cette étape de polymérisation s'est effectuée au moyen d'une lampe UV (12 W, 254 nm) pendant une heure.

Conditions retenues :

œ durée d'irradiation : une heure

œ appareil : lampe UV (12 W ; 254 nm)

III.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés

La stabilité des auto-arrangements lipidiques à la surface des nanotubes de carbone dans du tampon TRIS est principalement due à une très forte affinité hydrophobe entre la surface carbonée des nanotubes et la longue chaîne grasse des lipides. En suivant le même principe que l'extraction par électrophorèse où les CLP glissent le long des SWNTs suite à l'action d'un champ électrique, nous avons envisagé l'utilisation d'une méthode mécanique, l'ultra-sonication. Dans le but de favoriser cette extraction, nous avons pensé ajouter au milieu un solvant organique non miscible à l'eau. Cette opération permettrait ainsi aux nanotubes devenus nus au cours du traitement, donc hydrophobes, de se trouver dans un environnement plus favorable (Figure 2.17).

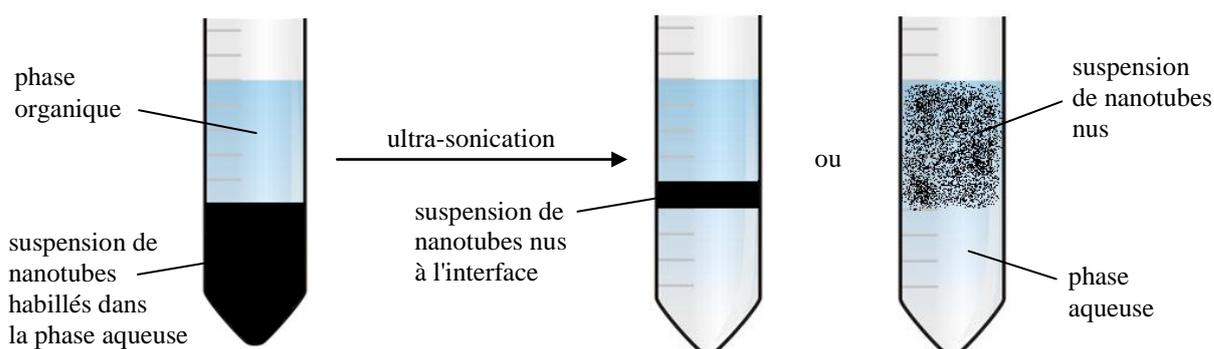


Figure 2.17 : Concept de l'extraction par ultra-sonication

La première étude effectuée a consisté dans un premier temps à valider le concept puis à déterminer le meilleur solvant. Pour cela, nous avons ultra-soniqué 2 ml d'une solution de

MWNTs habillés et polymérisés dans du tampon TRIS pendant deux heures et à une puissance de 240 W dans un bain de glace à l'aide d'un doigt à ultra-sons (mode pulse 9.9s on – 5s off ; Bioblock Scientific, VibraCell 72412) en présence de différents solvants. Après évaporation du solvant, cette étape d'extraction est considérée efficace lorsqu'il est possible d'observer par MET des CLP de forme régulière et des nanotubes dépourvus d'anneaux (Tableau 2.5).

| Entrée | Solvant | Observations |
|--------|-----------------------------|--------------|
| 1 | TRIS (absence de solvant) | inefficace |
| 2 | dichlorométhane | inefficace |
| 3 | benzène | inefficace |
| 4 | acétate d'éthyle | inefficace |
| 5 | éther diéthylique | efficace |
| 6 | éther diisopropylique | efficace |
| 7 | éther tert-butyl méthylique | inefficace |

Tableau 2.5 : Tests d'ultra-sonication avec différents solvants

Comme cela avait été suggéré, un lien entre efficacité d'extraction et apparence de l'échantillon a pu être fait puisque, selon le solvant, la phase aqueuse devient plus ou moins limpide et les nanotubes nus se placent soit à l'interface soit en suspension dans la phase organique, d'où l'importance de cette dernière. Ce constat est confirmé par MET où, en l'absence de solvant organique, l'extraction des CLP sous ultra-sonication est inefficace (Entrée 1). Cependant, parmi les six solvants étudiés, seuls les éthers diéthylique et diisopropylique (Entrées 5 et 6) ont mené à de bonnes observations en MET. Arbitrairement, l'éther diéthylique (Figure 2.18) a, pour ce procédé, été préféré à l'éther diisopropylique.

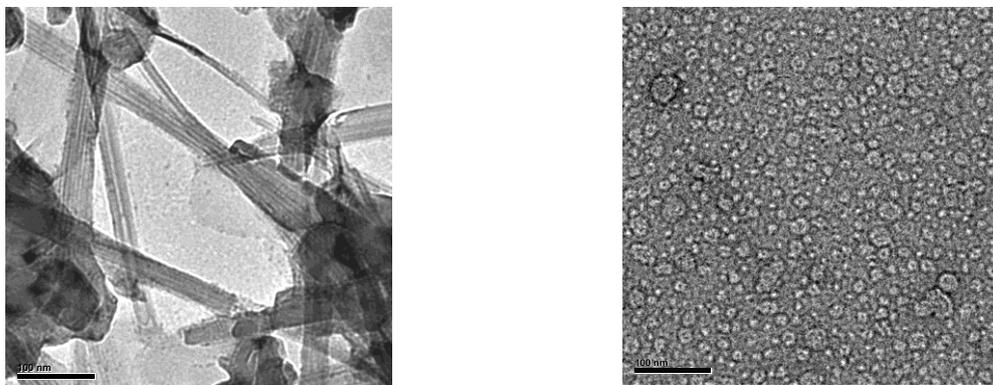


Figure 2.18 : Images MET de MWNTs n-Tec nus après extraction des CLP (gauche) et de CLP (droite)

Sur ce cliché MET, nous observons deux populations de particules *quasi* circulaires dont le diamètre moyen est de 22,2 nm pour la première et de 9,7 nm pour la seconde. Des mesures de granulométrie par DLS, plus représentatives de l'échantillon, donnent une population unique de particules dont la taille est comprise entre 5 et 15 nm, avec une valeur moyenne centrée à 8 nm (Figure 2.19).

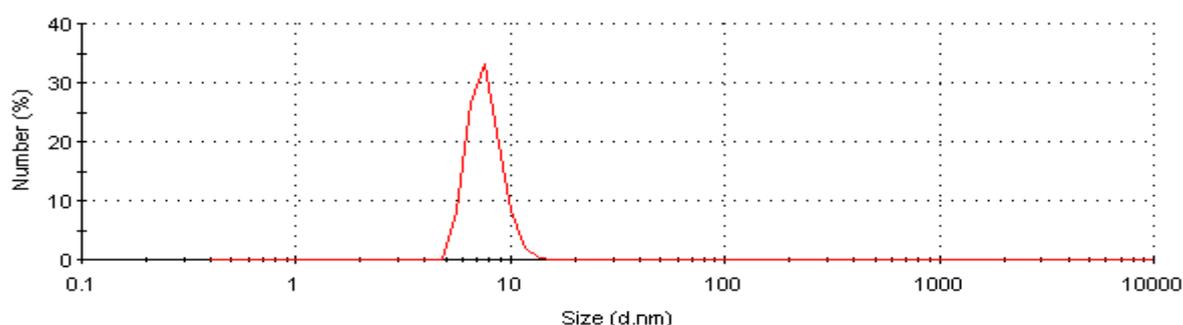


Figure 2.19 : Analyse granulométrique d'un échantillon de CLP extraites par ultra-sonication

Au vu des résultats obtenus au point **II.4.b** quant à la taille des nano-objets issus de MWNTs, (21,4 nm ; Figure 2.12) et quant à celle des micelles polymérisées (3-10 nm ; Figure 2.10), nous pouvons conclure que les plus grosses particules correspondent à des CLP et les plus petites à des micelles. L'étape de purification n'ayant pas éliminé toutes les traces de lipide en excès, la présence de micelles fait baisser la moyenne de la taille des particules (pour rappel, la taille des micelles de lipide 11,8-NTA polymérisées est comprise entre 3 et 10 nm), ce qui est mis en évidence par les mesures granulométriques.

Conditions retenues :

œ ultra-sonication en milieu bi-phasique TRIS/éther diéthylique

œ conditions d'ultra-sonication : 2 h (mode pulse 9.9s on – 5s off), 240 W, bain de glace

III.5. Isolement des CLP

Comme pour le procédé 1, les CLP sont isolées par acidification de la phase aqueuse issue du traitement décrit au paragraphe **III.4**. Ainsi, l'addition d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée permet de faire précipiter les CLP. L'échantillon est ensuite centrifugé dix minutes à 3000×g. Le culot contenant les CLP subit trois cycles de lavage à l'eau et de dix minutes de centrifugation à 3000×g. Le dernier culot est rincé à l'éther

diéthylique, concentré puis séché pour donner un lot de CLP avec un rendement global de 76%. Notons que par ce procédé, plus d'un gramme de CLP ont pu être isolées.

Conditions retenues :

œ précipitation des CLP par acidification puis centrifugation et lyophilisation

III.6. Récapitulatif expérimental du procédé 2

A une solution de 500 mg de lipide 11,8-NTA dans 100 ml d'une solution tampon aqueuse de TRIS sont ajoutés 500 mg de MWNTs (n-Tec). Le milieu est soniqué 30 min au bain à ultra-sons, dialysé 8 fois 12h contre 2 l de tampon TRIS puis irradié 1h sous une lampe UV (12 W, 254 nm). 50 ml de cette préparation sont ultra-soniqués 2h dans un bain de glace, à une puissance de 240 W à l'aide d'un doigt à ultra-sons et en présence de 50 ml d'Et₂O. La phase organique est évaporée puis la phase aqueuse est ultra-centrifugée 1h à 90000×g. Le surnageant est isolé puis ultra-une seconde fois 1h à 90000×g. Le surnageant est de nouveau isolé et acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée au goutte à goutte tant que le phénomène de précipitation est observé (pH < 1). Après une étape de centrifugation de 10 min à 3000×g le précipité est séparé du surnageant, lavé à l'eau (30 ml), centrifugé 10 min à 3000×g (le cycle de lavage est répété 3 fois) puis séché au lyophilisateur pour donner 0,190 g de produit désiré sous la forme d'un solide (Rdt : 76%). Notons que selon la nature du lipide 11,8-NTA utilisé, les CLP obtenues peuvent être rouges (lipide synthétisé au laboratoire) ou légèrement grisées (lipide synthétisé par la société Novalix). Nous parlerons donc de procédé 2.1 pour les rouges et de procédé 2.2 pour les autres.

IV. Troisième procédé d'obtention des CLP

Ce troisième procédé a été développé dans le but de combiner les aspects qualitatifs du procédé 1 et les aspects quantitatifs du procédé 2, donc d'obtenir un lot pur de CLP en grande quantité.

IV.1. Adsorption du lipide à la surface des nanotubes de carbone

Avec les deux procédés précédents, lorsqu'un rapport massique lipide/nanotubes égal à un est utilisé, une quantité non négligeable de lipide en excès, sous forme de micelles, est observable par MET avant purification. C'est pourquoi, afin d'augmenter la quantité de lipide adsorbé à la

surface des MWNTs, nous avons décidé de diminuer le rapport lipide/nanotubes en le faisant varier de 1/1 à 1/10. Pour cela, plusieurs échantillons sont préparés en ajoutant des quantités variables de MWNTs dans des solutions de lipide 11,8-NTA dans le TRIS à une concentration fixée à 5 mg/ml, selon les résultats du procédé 2. Les échantillons sont ensuite soniqués trente minutes au bain à ultra-sons. Afin de déterminer les quantités de lipide non adsorbées, nous nous sommes servis de la propriété du lipide à changer de couleur lorsqu'il est sous forme de polymère. Ainsi, chaque échantillon est irradié 5h40 dans une enceinte UV (48 W ; 254 nm) puis centrifugé trente minutes à 14000×g. Les surnageants, contenant l'excès de lipide, sont ensuite analysés par spectrophotométrie UV-visible (Tableau 2.6 et Figure 2.20) afin de déterminer la concentration en lipide et d'en déduire la quantité de lipide adsorbé à la surface des MWNTs. Le coefficient d'extinction molaire, permettant de convertir la valeur d'absorbance relevée en concentration, est déterminé à partir d'échantillons de lipide 11,8-NTA en solution dans le TRIS à différentes concentrations (de 1 à 10 mg/ml) et irradiés 5h40 dans une enceinte UV (48 W ; 254 nm).

| Rapport lipide/nanotubes | Concentration de lipide en excès (mg/ml) | Proportion de lipide adsorbé (%) |
|--------------------------|--|----------------------------------|
| 1/1 | 4,32 | 14 |
| 1/2 | 4,26 | 15 |
| 1/3 | 4,14 | 17 |
| 1/4 | 3,80 | 24 |
| 1/5 | 3,56 | 29 |
| 1/10 | 2,26 | 55 |

Tableau 2.6 : Analyse spectrophotométrique en fonction du rapport massique lipide/nanotubes ($\epsilon_{(\lambda : 353 \text{ nm})}$: $0,5793 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)

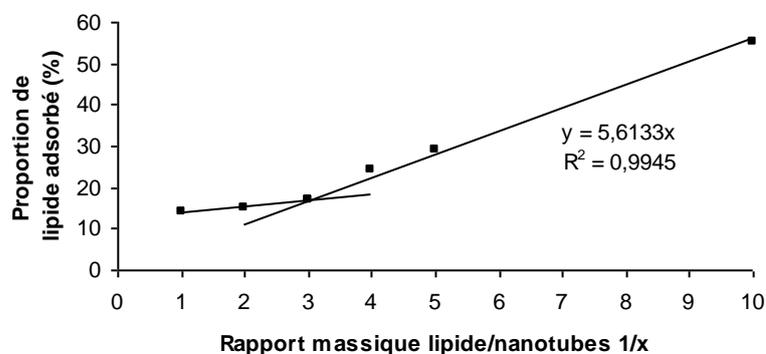


Figure 2.20 : Proportion de lipide adsorbé en fonction du rapport massique lipide/nanotubes

Ces résultats montrent, en rappelant que la concentration initiale en lipide 11,8-NTA est fixe, que la quantité adsorbée de ce dernier dépend de la concentration en nanotubes. De plus, passé un rapport lipide/nanotubes de 1/3, il semblerait qu'il existe un lien de proportionnalité révélé par la présence d'une courbe de tendance linéaire passant par l'origine et dont le coefficient de régression est égal à 0,9945. Cependant, dans la gamme de rapport étudiée, aucun palier synonyme d'adsorption totale du lipide 11,8-NTA à la surface des MWNTs n'est observé. La suite de l'étude mettant en jeu des rapports lipide/nanotubes plus élevés n'a pas pour autant été réalisée pour des raisons pratiques. En effet, lorsque les concentrations en nanotubes sont trop fortes, les échantillons sont difficiles à manipuler et présentent une viscosité élevée. Pour ces mêmes raisons, nous avons choisi de fixer le rapport massique lipide/nanotubes à 1/4 et de le conserver durant tout le procédé 3.

Conditions retenues :

☞ concentration en lipide : 5 mg/ml

☞ rapport massique lipide/nanotubes : 1/4

☞ durée de sonication : 30 min au bain à ultra-sons

IV.2. Polymérisation des arrangements lipidiques

Pour ce troisième procédé, nous avons fait le choix d'invertir l'ordre des étapes de purification et de polymérisation. Dans le but de déterminer l'existence d'un lien entre durée d'irradiation et efficacité de polymérisation, une étude a été menée sur la durée d'irradiation au moyen d'une enceinte UV (48 W, 254 nm), source plus puissante que la lampe UV (12 W, 254 nm) utilisée pour les procédés 1 et 2. La polymérisation du lipide 11,8-NTA est suivie par spectrophotométrie UV-visible à 353 nm pour les mêmes raisons que celles énoncées au paragraphe précédent, dans un premier temps sur une solution de lipide dans du TRIS à une concentration arbitraire de 2 mg/ml (Figure 2.21, courbe noire) puis sur un échantillon de lipide et de nanotubes tel qu'obtenu au paragraphe **IV.1.** (Figure 2.21, courbe grise).

Ces résultats montrent qu'en présence ou en l'absence de nanotubes, les valeurs d'absorbance relevées à 353 nm tendent vers un palier à partir de quatre heures d'irradiation. Cette durée d'irradiation a donc été choisie dans le cadre du procédé 3.

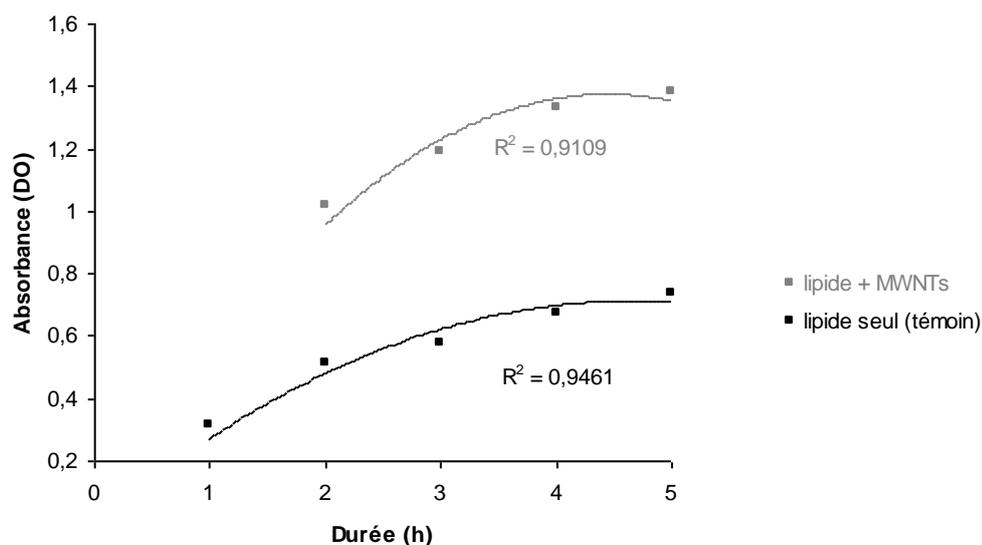


Figure 2.21 : Evolution de l'absorbance en fonction du temps d'irradiation

Conditions retenues :

œ durée d'irradiation : quatre heures

œ appareil : enceinte UV (48 W ; 254 nm)

IV.3. Purification des nanotubes couverts d'arrangements lipidiques polymérisés

Contrairement au procédé 2 où cette étape de purification, se faisant uniquement par dialyse, ne permet pas d'éliminer la totalité de lipide en excès, nous avons choisi, dans ce procédé 3, de purifier les échantillons par trois cycles d'ultra-centrifugation à 90000×g en remplaçant à chaque fois le surnageant par du tampon TRIS.

Sur le cliché MET (Figure 2.22, droite), plus aucune trace de lipide en excès n'est visible et la pureté de l'échantillon est similaire à celle de l'échantillon observé au cours du procédé 1. Ainsi, en plus d'être efficace, cette méthode est également plus rapide puisqu'elle permet de réduire le temps de purification de sept jours, lorsque la dialyse est utilisée, à trois heures.

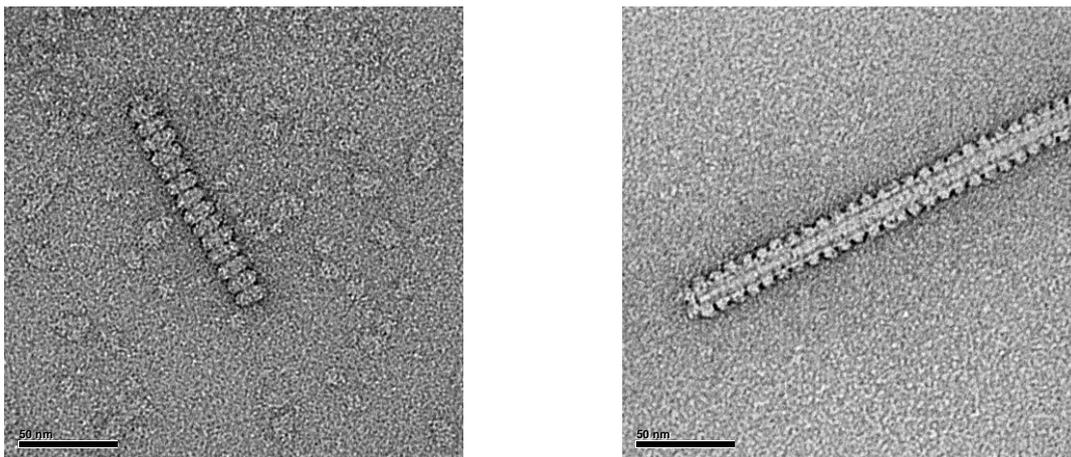


Figure 2.22 : Echantillons de MWNTs habillés et polymérisés avant (gauche) et après (droite) purification

Conditions retenues :

☞ trois cycles d'ultra-centrifugation à $90000\times g$

IV.4. Extraction des arrangements lipidiques polymérisés

Pour ce troisième procédé, l'étape d'extraction des CLP a fait l'objet de nombreuses investigations portant sur les paramètres clés de l'ultra-sonication qui sont le temps et puissance de sonication, la température de l'échantillon et la nature du solvant organique. Chacune d'entre-elles sera présentée en détail dans les paragraphes suivants.

a – Temps et puissance d'ultra-sonication

Dans le but de déterminer l'existence ou non d'une relation entre l'efficacité de l'extraction des CLP et le temps et la puissance de sonication, nous avons commencé par étudier simultanément ces deux paramètres. Les expériences menées ont consisté à ultra-soniquer à l'aide d'un doigt à ultra-sons, à puissances et temps variables, deux millilitres d'une suspension de MWNTs habillés et polymérisés, telle qu'obtenue au paragraphe précédent, en milieu biphasique TRIS/éther diisopropylique et dans un bain de glace. Notons qu'ici, l'éther diisopropylique, qui présente également de bons résultats vis-à-vis de l'extraction des CLP, est préféré à l'éther diéthylique, utilisé dans le procédé 2, du fait de son point d'ébullition plus élevé ($68\text{ }^{\circ}\text{C}$ contre $34\text{ }^{\circ}\text{C}$). Les variations de températures générées au cours de l'étape de sonication ont ainsi moins d'influence sur la nature de l'échantillon. L'efficacité de l'étape d'extraction est évaluée visuellement selon le principe expliqué au point **III.4.** (Tableau 2.7).

De cette manière, l'obtention d'une suspension de nanotubes dans la phase organique et d'une phase aqueuse limpide est un résultat positif, la conservation d'une teinte grisée de la phase aqueuse, et ce même après une étape complémentaire de dix minutes de centrifugation à 3000×g, est un résultat négatif.

| Entrée | Puissance | Observations après 2 h | Observations après 1 h | Observations après 30 min |
|--------|-----------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | 50 W | négatif | négatif | négatif |
| 2 | 100 W | négatif | négatif | négatif |
| 3 | 150 W | positif (-) | négatif (+) | négatif |
| 4 | 200 W | positif | positif | positif |
| 5 | 240 W | positif | positif | positif |

Tableau 2.7 : Tests d'ultra-sonication à différentes puissances et sur différentes durées

Ces résultats montrent que l'extraction des CLP par la méthode d'ultra-sonication en milieu biphasique est inefficace pour des puissances de sonication inférieures ou égales à 100 W (Entrées 1 et 2) et efficace pour des puissances supérieures ou égales à 200 W (Entrées 4 et 5), et ce quel que soit le temps de sonication. En revanche, cette efficacité devient variable à la puissance de 150 W (Entrée 3). Notons que les résultats observés à la puissance de 50 W peuvent en partie s'expliquer par des problèmes d'homogénéisation des phases aqueuses et organiques. Cette expérience permet d'établir un lien entre efficacité d'extraction et temps et puissance de sonication. En effet, pour un temps donné, plus la puissance est élevée plus l'extraction est efficace et pour une puissance donnée, plus le temps est élevé, plus l'extraction est efficace. Pour mémoire, dans le cadre du procédé 2, cette étape nécessitait deux heures de sonication à une puissance de 240 W. Ces conditions sont considérablement réduites ici.

b – Température de l'échantillon

Au cours de ces expériences, de fortes élévations de température lors de la sonication et ce malgré la présence d'un bain de glace ont été observées. Ceci a été vérifié en ultra-soniquant pendant dix minutes un volume constant d'eau à différentes puissances (Figure 2.23).

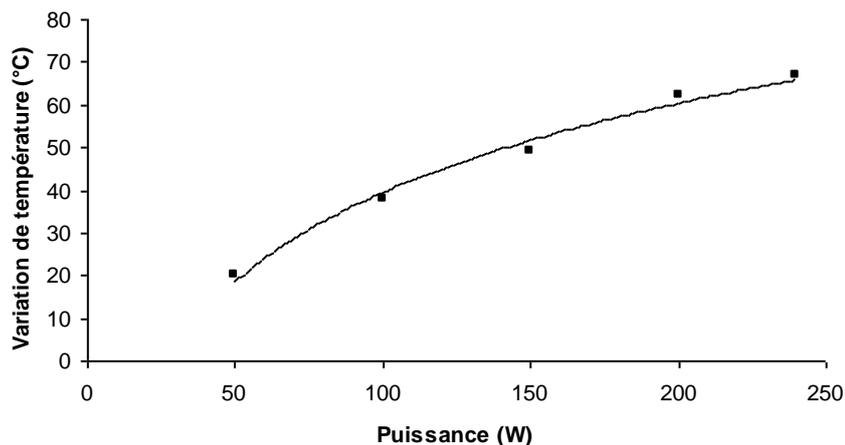


Figure 2.23 : Variation de la température en fonction de la puissance de sonication (température initiale : 21°C)

Sur ce diagramme, nous observons que plus la puissance utilisée est élevée, plus la variation de température est élevée. Pour analyser l'importance de ce facteur thermique sur le phénomène de désorption des CLP, deux études complémentaires ont été envisagées. La première a consisté à ultra-soniquer deux millilitres d'une solution de MWNTs habillés et polymérisés sur différents temps et à différentes puissances en absence de bain de glace. La seconde a consisté à préchauffer deux millilitres de la même solution de MWNTs à une température de 60°C avant de l'ultra-soniquer toujours sur différents temps et à différentes puissances. Notons qu'en fixant le temps de sonication à trente minute nous avons cherché, par ces tests, à diminuer la puissance de sonication efficace (Tableau 2.8) et qu'en fixant la puissance à 240 W, nous avons cherché à diminuer le temps de sonication efficace (Tableau 2.9). Le test visuel cité précédemment a été de nouveau utilisé pour vérifier l'efficacité de ces essais et les résultats décrits précédemment, obtenus en présence de bain de glace, sont ajoutés à ces deux tableaux.

| Entrée | Puissance | Température initiale | Observations après 30 min |
|--------|-----------|----------------------|---------------------------|
| 1 | 50 W | 0 °C | négatif |
| 2 | | T.A. | négatif |
| 3 | | 60 °C | négatif |
| 4 | 100 W | 0 °C | négatif |
| 5 | | T.A. | positif |
| 6 | | 60 °C | positif |

Tableau 2.8 : Etude sur le facteur thermique à 50 et 100 W (T.A. : température ambiante)

| Entrée | Puissance | Température initiale | Observations après | | |
|--------|-----------|-------------------------|--------------------|---------|---------|
| | | | 5 min | 10 min | 30 min |
| 7 | | 0 °C | négatif | négatif | positif |
| 8 | 240 W | T.A. | négatif | négatif | positif |
| 9 | | 60 °C | négatif | négatif | positif |

Tableau 2.9 : Etude sur le facteur thermique à 240 W (T.A. : température ambiante)

Ces résultats mettent en évidence le fait qu'en absence de refroidissement par un bain de glace (noté T.A. dans les deux tableaux), il est possible de réduire la puissance de sonication à 100 W (Entrée 5) tout en conservant une extraction efficace en trente minutes (au lieu de 200 W dans un bain de glace). Cependant, même à puissance maximale (240 W), un temps plus court de sonication ne permet pas d'extraire efficacement les CLP (Entrée 8). De plus, nous observons qu'un chauffage préalable ne permet pas d'abaisser la puissance de sonication à 50 W (Entrée 3), pas plus que de diminuer le temps de sonication à 5 min voire 10 min en utilisant une puissance de 240 W (Entrée 9), la mise en suspension des nanotubes n'étant pas totale.

Au vu de ces différents résultats, les conditions optimales, dans le cadre d'une ultra-sonication de petits volumes (2 ml), sont une puissance de 100 W et un temps de 30 min sans bain de glace ni préchauffage.

c – Ultra-sonication en milieu uniquement organique

En vue d'une simplification du procédé 3, une alternative intéressante pour l'étape d'extraction des CLP en milieu biphasique TRIS/éther diisopropylique serait de considérer un milieu uniquement organique. Les affinités hydrophobes entre les anneaux et les nanotubes seraient ainsi affaiblies ce qui faciliterait l'extraction. Cette méthode présenterait également de nombreux avantages au niveau de l'étape de récupération des CLP. Le but de l'étude a donc été d'ultra-soniquer 2 ml d'une suspension de nanotubes couverts d'anneaux polymérisés dans différents solvants organiques pendant trente minutes et à une puissance de 100 W à l'aide d'un doigt à ultra-sons (mode pulse 9.9s on – 5s off). Les CLP sont ensuite séparées des nanotubes nus par centrifugation. Les échantillons sont préparés à partir d'une solution de nanotubes couverts d'anneaux polymérisés dans le TRIS à laquelle trois étapes d'acidification, de centrifugation et de lavage à l'eau ont été appliquées. Le culot contenant les nanotubes est repris dans le solvant organique (Figure 2.24).

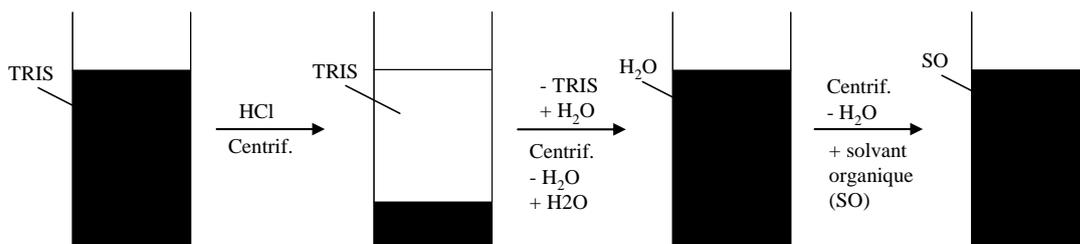


Figure 2.24 : Schéma général obtention d'une suspension de MWNTs habillés dans un solvant organique

Afin de déterminer l'efficacité de l'extraction, deux critères ont été simultanément pris en compte :

- ∞ aspect de l'échantillon après sonication (phase organique claire)
- ∞ comportement des nanotubes dans du tampon TRIS après traitement (des nanotubes nus ne se remettent pas en suspension)

Notons que dans un solvant organique, la mise en suspension des nanotubes de carbone couverts d'arrangements lipidiques est moins évidente que dans le TRIS. Ceci explique la nécessité du deuxième critère lorsque le premier est vérifié. Parmi les différents solvants présentant des résultats positifs, l'éthanol a été choisi puisqu'il est le plus adapté à un usage industriel du procédé (Tableau 2.10).

| Solvant | Observations |
|-------------------|--------------|
| chloroforme | positif |
| tétrahydrofurane | |
| toluène | |
| éthanol | |
| butanol | |
| tert-butanol | négatif |
| diméthylformamide | |
| diméthylsulfoxyde | |
| chlorobenzène | |
| diéthylamine | |
| dibutylamine | |

Tableau 2.10 : Liste des solvants testés pour l'extraction des CLP par ultra-sonication en milieu uniquement organique

Une analyse en MET de la solution obtenue après ultra-sonication révèle la présence d'objets sphériques dont le diamètre moyen est de 24,5 nm (Figure 2,25), ce qui est très proche des

objets présentés précédemment lorsque des MWNTs sont utilisés (diamètre moyen de l'ordre de 20 nm). Cette taille est confirmée grâce à une analyse granulométrique par DLS donnant une valeur moyenne centrée à 20 nm. Ces résultats sont très encourageants puisqu'ils permettent d'envisager des études complémentaires afin de réduire au maximum la puissance et le temps de sonication, voire d'apporter une alternative à l'ultra-sonication en utilisant des méthodes plus douces telles qu'un chauffage à reflux ou une agitation mécanique. Une étude plus complète serait tout de même nécessaire pour valider cette méthode.

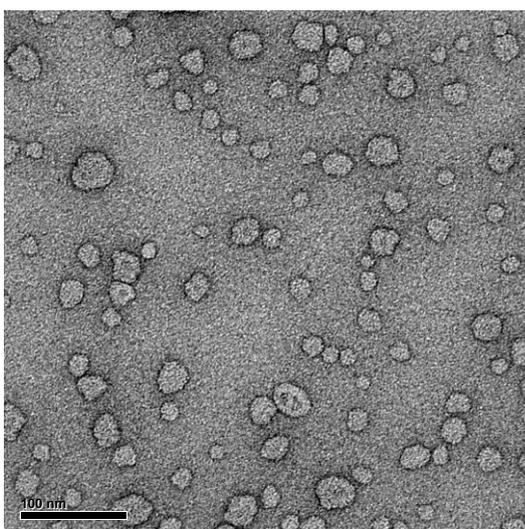


Figure 2.25 : Image MET de CLP après ultra-sonication dans l'éthanol

Conditions retenues :

œ ultra-sonication en milieu bi-phasique TRIS/éther diisopropylique

œ conditions d'ultra-sonication : 30 min (mode pulse 9.9s on – 5s off), 100 W

IV.5. Isolement des CLP

Pour isoler les CLP, plusieurs méthodes peuvent être utilisées selon les conditions de l'étape d'ultra-sonication (Tableau 2.11) :

œ ultra-sonication biphasique TRIS/éther diisopropylique : précipitation des CLP en milieu acide puis isolement par extraction des CLP dans du chloroforme (Entrée 1), centrifugation (Entrée 2), filtration (Entrée 3)

œ ultra-sonication en milieu uniquement organique : isolement par concentration (Entrée 4)

Le rendement calculé dans chacun des cas est un rendement global sur la totalité du procédé et prend en compte les quantités initiales de lipide.

| Entrée | Méthode de récupération | Précipitation préalable | Rendement |
|--------|------------------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | extraction CHCl ₃ | oui | 10% |
| 2 | centrifugation | oui | 9% |
| 3 | filtration | oui | / |
| 4 | concentration | / | 10% |

Tableau 2.11 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes utilisées pour isoler les CLP

Pour chacun des protocoles menés à terme, les rendements obtenus sont *quasi* similaires et de l'ordre de 10%. Rappelons qu'en tenant compte du taux d'adsorption du lipide 11,8-NTA à la surface des nanotubes déterminé au paragraphe **IV.1.** le rendement global maximal serait de 24%. Ceci donne un rendement de 42% pour les étapes d'extraction et d'isolement des CLP. En ce qui concerne la récupération des CLP par filtration (Entrée 3), la faible quantité de CLP déposée sur le filtre n'a pas permis de les collecter.

Conditions retenues pour l'ultra-sonication en milieu bi-phasique :

☞ précipitation des CLP par acidification puis extraction au chloroforme ou centrifugation et lyophilisation

Conditions retenues pour l'ultra-sonication en milieu uniquement organique :

☞ concentration

IV.6. Récapitulatif expérimental du procédé 3

A une solution de 500 mg de lipide 11,8-NTA dans 100 ml d'une solution tampon aqueuse de TRIS sont ajoutés 2 g de MWNTs (n-Tec). Le milieu est soniqué 30 min dans un bain à ultrasons, irradié 4h dans une enceinte UV (48W, 254 nm), puis purifié par 3 cycles d'ultra-centrifugation à 90000×g en remplaçant, à chaque fois, le surnageant par le même volume d'une solution tampon aqueuse de TRIS. 2 ml de cette solution de nanotubes couverts d'anneaux sont ultra-soniqués 30 min, à une puissance de 100 W à l'aide d'un doigt à ultrasons (mode pulse 9.9s on – 5s off) en présence de 2 ml d'éther diisopropylique. La phase organique est évaporée puis le milieu est centrifugé 10 min à 14000×g. La phase aqueuse est isolée des nanotubes restés dans le culot puis est acidifiée par 2 gouttes d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée jusqu'à la formation d'un précipité (pH < 1), lequel est extrait trois fois avec 2 ml de chloroforme. Les phases organiques combinées sont concentrées

et séchées sous vide pur donner 0,5 mg de CLP (Rdt global : 10%) sous la forme d'un solide blanc.

V. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons proposé trois procédés permettant d'obtenir des lots variables de CLP à partir du lipide 11,8-NTA et de nanotubes de carbone. Le principe général de chacun d'entre eux repose sur l'adsorption du lipide à la surface des nanotubes, la purification de l'échantillon, la polymérisation des auto-arrangements formés, l'extraction des CLP des nanotubes de carbone et l'isolement des CLP (Tableau 2.12).

| Procédé | Adsoption | | | SDS | Purification ^a | Polymérisation ^a |
|---------|-----------------|--------------------|--------------------|-----|---------------------------|-----------------------------|
| | Conc. en lipide | Conc. en nanotubes | Type de nanotubes | | | |
| 1 | 1 mg/ml | 1 mg/ml | SWNTs MER Corp. | 1 % | dialyse + centrifugation | UV (12 W, 254 nm, 1h) |
| 2 | 5 mg/ml | 5 mg/ml | MWNTs n-Tec | / | dialyse | UV (12 W, 254 nm, 1h) |
| 3 | 5 mg/ml | 20 mg/ml | MWNTs n-Tec | / | ultra-centrifugation | UV (48 W, 254 nm, 4h) |

| Procédé | Extraction | Récupération | Résultats | |
|---------|------------------|---------------------------------|-----------|------------------------|
| | | | Rendement | Taille moyenne des CLP |
| 1 | électrophorèse | précipitation à l'acide, lyoph. | 20% | 10 nm |
| 2 | ultra-sonication | précipitation à l'acide, lyoph | 75% | 22 nm |
| 3 | ultra-sonication | précipitation à l'acide, lyoph | 10% | 25 nm |

Tableau 2.12 : Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour les trois procédés développés au cours de cette thèse (^a ces étapes sont inversées lors des procédés 2 et 3)

Le procédé 1, basé sur une d'étape d'extraction des CLP par électrophorèse et dans lequel des SWNTs MER Corp. et du SDS sont utilisés a permis d'obtenir, en petite quantité, un lot pur de nano-objets dont le diamètre moyen est de l'ordre de 10 nm. Pour augmenter ces quantités, le procédé 2, introduisant une nouvelle méthode d'extraction des CLP par ultra-sonication, a été développé avec des MWNTs n-Tec et sans SDS. Ces nouvelles conditions ont fourni une quantité plus importante (de l'ordre du gramme) de CLP plus grosses (diamètre moyen de l'ordre de 20 nm) mais avec une pureté moindre due à une étape de purification moins

efficace. Pour combiner qualité et quantité des CLP respectivement obtenues par les procédés 1 et 2, un procédé 3 a été mis au point. Celui repose sur une optimisation de l'étape d'adsorption en augmentant le rapport lipide/nanotubes (de 1/1 à 1/4). D'autres modifications ont également été apportées sur la durée d'irradiation (de 1h à 4h) et sur les conditions d'ultrasonication. Ce procédé n'a pas permis, au cours de cette thèse, de fournir des quantités suffisamment importantes de CLP pour entrevoir l'étude de leurs applications, et est toujours en cours d'amélioration au sein du laboratoire.

Chapitre 3

Etude des applications envisagées pour les CLP

I. Introduction

Il a été montré précédemment que les micelles et les liposomes, au même titre que d'autres arrangements lipidiques, trouvaient une utilité dans la solubilisation en milieux aqueux de composés hydrophobes, le plus souvent biologiquement actifs. Ils permettent ainsi d'augmenter la biodisponibilité de ces composés, de les protéger du milieu extérieur ou encore de les transporter jusqu'à une cible biologique (vectorisation).¹²⁹ En considérant la structure idéalisée des CLP (Figure 3.1), à savoir une enveloppe hydrophile et un cœur hydrophobe ouvert sur le milieu extérieur, le second objectif de cette thèse, après la mise au point puis l'élaboration de procédés permettant de produire des CLP en grosse quantité, a donc été d'étudier le comportement de ces dernières en présence de composés hydrophobes.

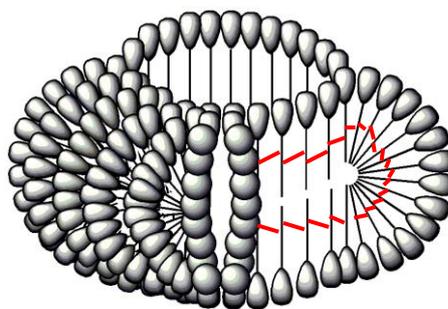


Figure 3.1 : Représentation idéale d'une CLP après son extraction du nanotube de carbone

Pour cela, nous avons étudié des molécules de géométrie, de caractère ou encore de propriétés diverses. Ainsi, nous débuterons en exposant nos résultats sur la solubilisation de fullerènes C_{60} . Nous poursuivrons par la présentation des travaux de solubilisation effectués sur deux protéines membranaires, composés d'intérêt biologique, puis sur deux composés d'intérêt cosmétique, un pigment et un filtre UV. Enfin, comme nous l'avons souligné précédemment,

¹²⁹ Rawat M., Singh D., Saraf S., *Biol. Pharm. Bull.* **29** 1790-1798 (2006)

l'une des applications liée à la solubilisation de molécules hydrophobes est la vectorisation. Il est donc devenu indispensable de trouver une méthode capable de tracer le parcours du complexe encapsulé/encapsulant vers la cible biologique. Ainsi, dans l'idée d'une possible utilisation des CLP en tant que vecteurs de principe actif, nous avons cherché à les rendre détectables en imagerie-X en les marquant avec du diiode. Nous concluons donc ce chapitre en discutant les résultats obtenus à ce sujet.

Notons que pour la réalisation de ces différentes expériences seules les CLP obtenues par le biais des procédés 1 et 2 ont été utilisées ; les quantités de CLP isolées par le troisième étant encore insuffisantes pour en envisager un réel usage.

II. Solubilisation de fullerènes C₆₀

Les fullerènes C₆₀ possèdent d'intéressantes propriétés biologiques et sont considérés comme des agents antioxydants, neuroprotecteurs, anti-VIH ou encore anti-microbiens.^{130,131} Cependant, leur manque de solubilité dans l'eau en restreint largement l'exploitation.¹³² Pour palier ce problème, deux stratégies ont été proposées. La première consiste en une modification chimique des C₆₀.¹³³ La seconde repose sur leur solubilisation par des polymères,¹³⁴ des micelles de polymères,^{135,136} ou encore d'autres systèmes tels que les cyclodextrines^{137,138} ou les calixarènes.¹³⁹

Les tests de solubilisation ont consisté à soniquer pendant quatre heures 3 mg d'une poudre de C₆₀ dans un bain à ultra-sons (80 W) en présence d'1 ml de solution de CLP, telles qu'obtenues par le procédé 1, dans du tampon TRIS et à des concentrations variables. La quantité de C₆₀ non solubilisée est ensuite séparée par une étape de centrifugation. Ce protocole est également appliqué sur un échantillon contrôle ne contenant pas de CLP. Contrairement au surnageant de ce dernier, incolore, la présence de surnageants de couleur orangée lorsque les CLP sont utilisées illustre la solubilisation partielle de C₆₀ en milieu

¹³⁰ Jensen A.W., Wilson S.R., Schuster D.I. *Bioorg. Med. Chem.* **4** 767-779 (1996)

¹³¹ Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M. *Eur. J. Med. Chem.* **38** 913-923 (2003)

¹³² Korobov M.V., Smith A.L. *Fullerenes : Chemistry, physics, and technology*, Kadish K.M., Ruoff R.S. Eds. Wiley : New York (2000)

¹³³ Nakamura E., Isobe H., *Acc. Chem. Res.* **36** 807-815 (2003)

¹³⁴ Yamakoshi Y.N., Yagami T., Fukuhara K., Sueyoshi S., Miyata N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 517-518 (1994)

¹³⁵ Jenekhe S.A., Chen X.L. *Science* **279** 1903-1907 (1998)

¹³⁶ Akiyama M., Ikeda A., Shintani T., Doi Y., Kikuchi J.-I., Ogawa T., Yogo K., Takeya T., Yamamoto N. *Org. Biomol. Chem.* **6** 1015-1019 (2008)

¹³⁷ Samal S., Geckeler K.E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **57** 1101-1102 (2000)

¹³⁸ Kojima C., Toi Y., Harada A., Kono K. *Bioconjugate Chem.* **19** 2280-2284 (2008)

¹³⁹ Ikeda A., Nobukuni S., Udzu H., Zhong Z., Shinkai S. *Eur. J. Org. Chem.* **19** 3287-3293 (2000)

aqueux. Cette couleur nous a également permis d'envisager l'analyse de ces échantillons par spectrophotométrie UV-visible (Figure 3.2). Les C_{60} étant insolubles dans le TRIS, il n'a pas été possible de déterminer un coefficient d'extinction molaire dans ce milieu. Ainsi, ce sont les valeurs d'absorption des différentes solutions de C_{60} , mesurées à 437 nm et à la dilution 1, qui sont reportées après y avoir retranché celles des CLP à cette même longueur d'onde.

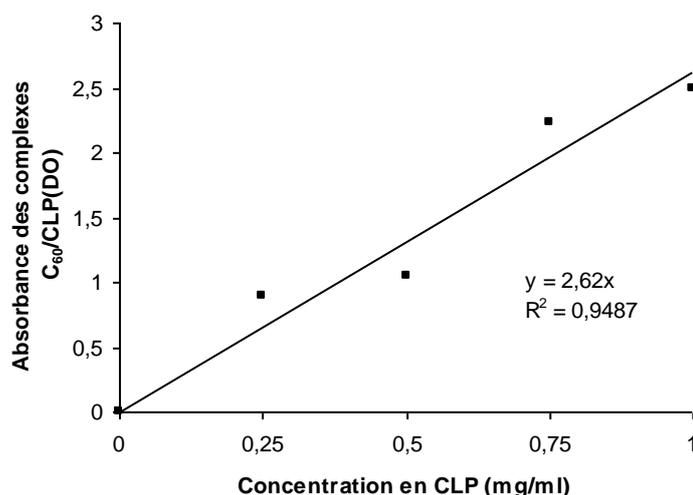


Figure 3.2 : Solubilisation de fullerènes C_{60} par les CLP

Le graphe montre que les quantités de C_{60} solubilisées par les CLP sont proportionnelles aux concentrations de ces dernières, les quantités initiales en fullerènes étant constantes. Cette proportionnalité se traduit par la présence d'une courbe de tendance linéaire passant par l'origine et dont le coefficient de régression est égal à 0,9487. Cependant, dans la gamme de concentration étudiée, aucun palier synonyme de solubilisation totale des C_{60} n'est observé. Une analyse MET a ensuite été effectuée sur le surnageant de l'échantillon dont la concentration en CLP était de 1 mg/ml. Sur le cliché obtenu (Figure 3.3, gauche), nous remarquons la présence de particules composées d'un cœur cristallin et d'une enveloppe amorphe. Une étude complémentaire par diffraction des électrons de ce cœur cristallin a permis de révéler des paramètres de maille de 7,6 Å et 5,2 Å correspondant à un empilement cubique face centrée (Figure 3.3, droite), empilement déjà observé avec des nanocristaux de C_{60} .¹⁴⁰ De plus, l'épaisseur de l'enveloppe, estimée à 4,2 nm sur le cliché MET, est identique à la longueur d'un lipide 11,8-NTA et donc identique à l'épaisseur théorique d'une CLP (pour

¹⁴⁰ Liu S., Lu Y.-J., Kappes M.M., Ibers J.A. *Science* **254** 408–410 (1991)

rappel 4,3 nm). Ces deux observations laissent à penser que ces particules correspondent bel et bien à des cristaux de C_{60} piégés au sein des cavités hydrophobes des CLP.

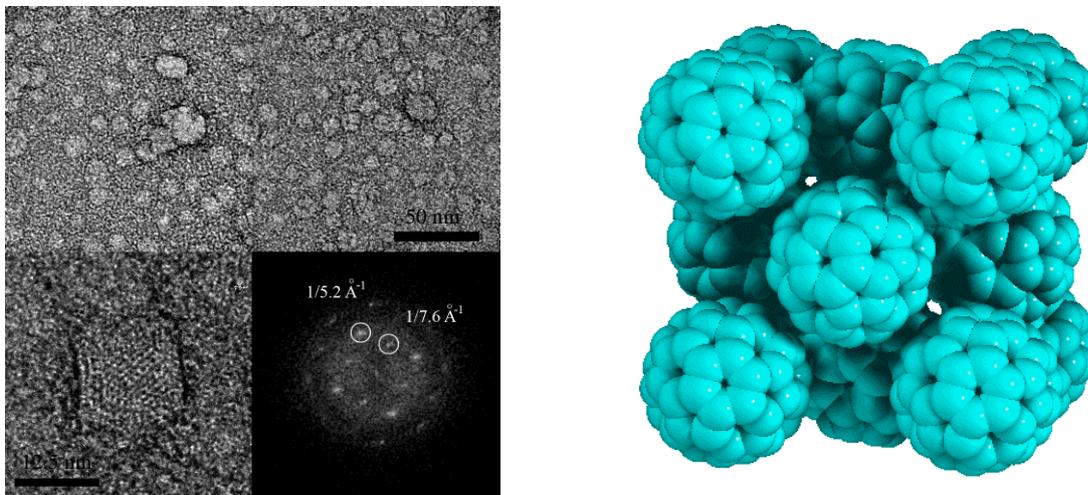


Figure 3.3 : Image MET de C_{60} solubilisés par les CLP (haut : vue générale ; bas gauche : agrandissement ; bas droite : diffraction des électrons) ; Représentation d'un empilement cubique face centrée

Une seconde indication peut être apportée suite à l'analyse du cliché MET quant à la taille des particules. En effet, nous constatons que celles-ci ont une distribution comprise entre 12 et 50 nm. Les plus petits cristaux de C_{60} étant les plus nombreux, la taille moyenne d'un système C_{60} /CLP se situe autour de 19 nm, ce qui reste plus grand que la taille moyenne d'une CLP "vide" (de l'ordre de 10 nm). Pour expliquer cette différence, revenons sur la synthèse des CLP. En considérant la réaction de photo-polymérisation du lipide 11,8-NTA, nous nous attendons à ce que chacune des CLP soit formée de plusieurs chaînes de polymères enchevêtrées, ce qui laisserait une certaine flexibilité à la structure finale. Ainsi, nous pensons que les CLP ont la particularité de s'adapter à la taille de leur hôte par gonflement.

III. Solubilisation de deux protéines membranaires

Comme leur nom l'indique, les protéines membranaires se situent au niveau de la membrane cellulaire et peuvent être classées en fonction de la nature et de l'organisation des structures interférant avec cette dernière : nous parlons alors de topologie membranaire.¹⁴¹ Ainsi, il existe d'une part les protéines polytopiques, caractérisées par la présence d'un domaine

¹⁴¹ Branden C., Tooze J. *Introduction à la structure des protéines*, Eds De Boeck Université Paris/Brussels (1996)

transmembranaire en contact avec les deux compartiments définis par la membrane, l'un extra- et l'autre intracellulaire, et d'autre part les protéines monotopiques, en contact avec un seul compartiment défini par la membrane. Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes limités aux protéines polytopiques. Du fait de leur domaine transmembranaire, elles possèdent de nombreuses fonctions comme celle de transporteur de molécules entre les milieux extra- et intracellulaires, de récepteur/transmetteur de signaux ou encore d'enzyme. Les protéines membranaires sont composées d'une **A** ou plusieurs **B** hélices α ou d'un cylindre β comprenant de 8 à 22 brins parallèles ou antiparallèles **C** (Figure 3.4).

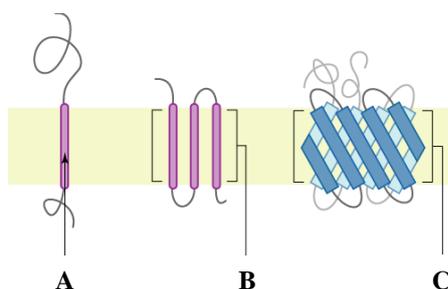


Figure 3.4 : Différents types d'interaction entre les protéines membranaires polytopiques et la membrane cellulaire (représentée par la bande pastel)

Le caractère hydrophobe de ces protéines leur confère une forte affinité avec la membrane cellulaire. Aussi, retirées de cet environnement, elles présentent une forte tendance à s'agréger par interaction de leur domaine hydrophobe et à précipiter en milieu aqueux. C'est pourquoi, l'utilisation de détergents "doux" mimant la bicouche membranaire tels que des bicelles,^{142,143} des détergents à base de peptides¹⁴⁴ ou de lipopeptides,¹⁴⁵ ou encore des amphipols¹⁴⁶ (polymères amphiphiles) s'avère nécessaire tout d'abord pour les extraire de la membrane cellulaire puis pour les stabiliser.¹⁴⁷ Notons qu'avec des détergents plus "forts" comme le SDS, les protéines peuvent se dénaturer. Au même titre que tous ces systèmes, nous avons cherché à évaluer l'action des CLP vis-à-vis de la solubilisation de deux protéines

¹⁴² Sanders C.R., Scott Prosser R. *Structure* **6** 1227–1234 (1998)

¹⁴³ Whiles J.A., Deems R., Vold R.R., Dennis E.A. *Bioorganic Chemistry* **30** 431–442 (2002)

¹⁴⁴ Schafmeister C.E., Miercke L.J., Stroud R.M. *Science* **262** 734–738 (1993)

¹⁴⁵ McGregor C.-L., Chen L., Pomroy M.C., Hwang P., Go S., Chakrabartty A., Pivé G.G. *Nature Biotechnol.* **21** 171–176 (2003)

¹⁴⁶ Popot, J.-L., Berry E.A., Charvolin D., Creuzenet C., Ebel C., Engelman D.M., Flötenmeyer M., Giusti F., Gohon Y., Hervé P., Hong Q., Lakey J.H., Leonard K., Shuman H.A., Timmins P., Warschawski D.E., Zito F., Zoonens M., Pucci B., Tribet C. *Cell. Mol. Life Sci.* **60** 1559–1574 (2003)

¹⁴⁷ Sanders C.R., Myers J.K. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** 25–51 (2004)

membranaires de structures et de poids moléculaires similaires : FecA de *Escherichia coli*¹⁴⁸ et FpvA de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁴⁹ Leur domaine transmembranaire correspond à un cylindre β de 4 à 5 nm de diamètre composé de 22 brins antiparallèles (Figure 3.5). Alors que FecA est un récepteur de citrate de fer, FpvA est un récepteur de pyoverdine. Fe^{3+} . Notons que la pyoverdine, ligand naturel de FpvA, est un sidérophore sécrété sous sa forme non complexée par *P. aeruginosa*. Pour réaliser nos différentes expériences, des solutions de protéines pré-stabilisées par un détergent "doux", le n-octylpolyoxyéthylène (octyl-POE) ont été utilisées.

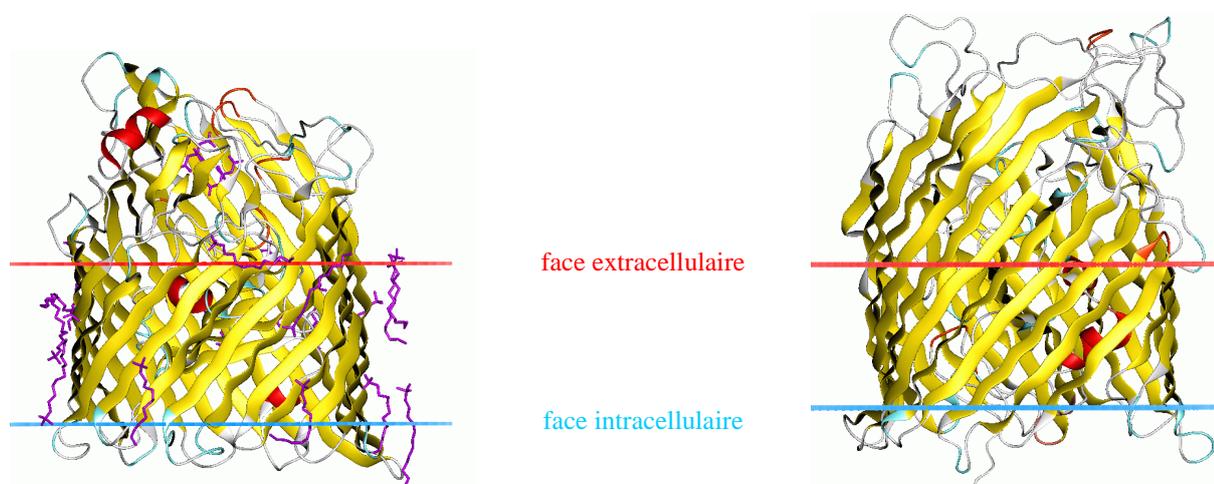


Figure 3.5 : Structure des protéines FecA (gauche) et FpvA (droite)

Dans un premier temps, une solution aqueuse de FecA (0,1 mg/ml) est ajoutée à une solution de CLP dans du tampon TRIS (TRIS 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) à différentes concentrations. Après une heure à température ambiante, l'octyl-POE est éliminé par plusieurs additions successives de Biobeads SM2 (polystyrène non polaire, 20-50 mesh, taille moyenne des pores 90 Å, Bio-Rad).¹⁵⁰ Les complexes Biobeads/détergent ainsi formés et les résidus de protéines agrégées non solubles sont ensuite séparés par centrifugation. Ce protocole est également appliqué sur un échantillon contrôle ne contenant pas de CLP. La concentration en FecA de chacun des surnageants est déterminée par le biais d'un test Biuret BCA qui permet de titrer les quantités de fonctions amides présentes dans les solutions. Les CLP contenant également des motifs amides, les valeurs correspondantes sont retranchées pour chaque concentration étudiée (Figure 3.6).

¹⁴⁸ Braun V., Mahren S. *FEMS Microbiol. Rev.* **29** 673–684 (2005)

¹⁴⁹ Schalk I.J., Hennard C., Dugave C., Poole K., Abdallah M.A., Pattus F. *Mol. Microbiol.* **39** 351–361 (2001)

¹⁵⁰ Rigaud J.-L. *J. Struct. Biol.* **118** 226-235 (1997)

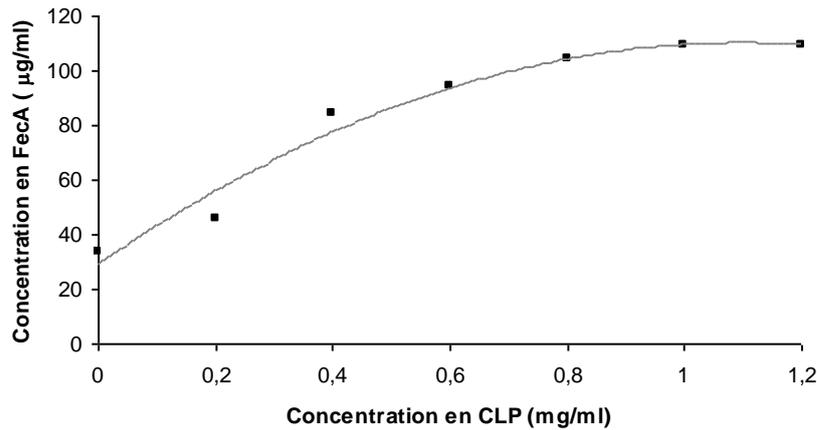


Figure 3.6 : Solubilisation de FecA par les CLP

Cette première expérience nous a permis de constater que les CLP sont capables de maintenir FecA en solution, en absence de détergent (octyl-POE), et ce de façon concentration dépendante. De plus, nous observons sur ce graphe l'atteinte d'un palier à partir de 1 mg/ml en CLP apportant une information supplémentaire quant au taux de solubilisation. En effet, en rappelant que la concentration initiale en protéine est de 0,1 mg/ml, nous pouvons calculer un rapport massique FecA/CLP de l'ordre de 1/10.

Les résultats obtenus avec FecA étant très encourageants, nous avons poursuivi l'étude avec FpvA. L'avantage de cette protéine membranaire est que le complexe formé par FpvA et son ligand naturel, la pyoverdine, peut être détecté par transfert d'énergie par résonance (FRET). Ainsi, travailler avec FpvA permettra de déterminer si la fraction de protéine solubilisée conserve ses propriétés de reconnaissance vis-à-vis du ligand. Concrètement, lorsque le fluorophore donneur (protéine) est excité à une longueur d'onde λ_1 , des photons de longueur d'onde λ_2 sont libérés. Mais il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation au fluorophore accepteur (ligand) qui libère à son tour des photons à une longueur d'onde λ_3 qui lui est propre (Figure 3.7). Plus le transfert d'énergie est efficace, plus le receveur émet de photons par rapport au donneur. Cependant, pour qu'un FRET soit observé, certaines conditions doivent être respectées. Le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher celui du donneur, les deux molécules doivent être séparées d'une distance précise et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être à peu près parallèles. A partir du moment où la première condition est reconnue entre FpvA et la pyoverdine, une

absence de FRET entre cette protéine et son ligand ne peut s'expliquer que par une perturbation au niveau des conditions spatiales.

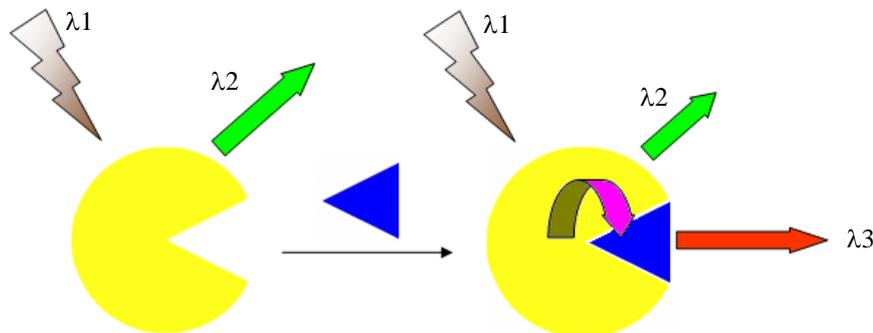


Figure 3.7 : Schéma explicatif du phénomène de FRET (la protéine est représentée en jaune, le ligand en bleu et le FRET en rose)

Dans ce contexte, nous avons préparé une solution de FpvA stabilisée par des CLP, en suivant le même protocole que pour FecA, ainsi qu'une solution témoin de FpvA stabilisée par l'octyl-POE. Les spectres d'émission de fluorescence de ces deux solutions ont d'abord été mesurés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 290 nm. Puis, après avoir ajouté le ligand pyoverdine.Ga, une deuxième série de spectres d'émission de fluorescence a été mesurée en utilisant la même longueur d'onde d'excitation (Figure 3.8). Notons que les ions Ga^{3+} complexés à la pyoverdine remplacent ici les ions Fe^{3+} .

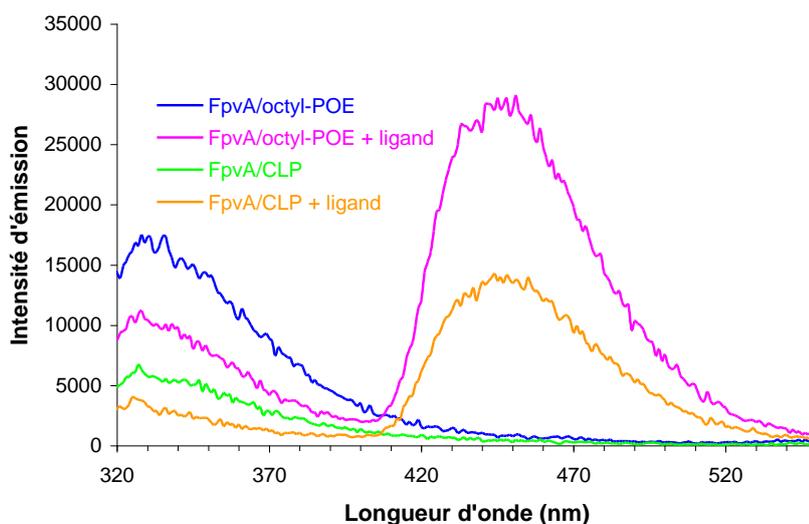


Figure 3.8 : Mise en évidence du FRET sur des solutions de FpvA stabilisée par l'octyl-POE ou par les CLP

Ces expériences confirment dans un premier temps l'efficacité des CLP quant à la solubilisation de FpvA puisque le signal de fluorescence correspondant à cette protéine est observé à 330 nm aussi bien dans le cas du complexe FpvA/CLP (vert) que dans celui du complexe initial FpvA/octyl-POE (bleu). Les valeurs d'émission relevées pour le premier cité sont trois fois inférieures à celles du second. En signalant que les concentrations initiales en protéine et en CLP étaient respectivement de 0,36 et 1,34 mg/ml, nous pouvons alors en déduire que la concentration en protéine stabilisée par les CLP est de $0,36/3$ soit 0,12 mg/ml ce qui conduit à un rapport massique FpvA/CLP de l'ordre de 1/10, identique à celui révélé avec FecA.

Lorsque le ligand est présent, les deux échantillons montrent à nouveau des spectres d'émission similaires. Nous observons alors deux signaux ; l'un à 330 nm propre à la protéine et l'autre à 450 nm correspondant au ligand. La détection de ce dernier, confirme l'existence d'un transfert de fluorescence de la protéine vers le ligand. Celui-ci se traduit par une intensité d'émission trois fois plus grande à 450 nm (ligand) qu'à 330 nm (protéine) et ce pour les complexes FpvA/octyl-POE + ligand (mauve) et FpvA/CLP + ligand (orange). Cette conservation de proportionnalité laisse à penser que FpvA conserve les mêmes propriétés de reconnaissance dans les deux solutions et par conséquent que la protéine ne se dénature pas en présence des CLP. Ainsi, ces nano-objets ne permettent pas uniquement de solubiliser FpvA en se substituant au détergent mais elles préservent également leur géométrie et donc leur activité spécifique.

Les échantillons de FecA solubilisée par les CLP sont analysés en MET dans le but d'observer d'éventuels complexes protéine/CLP. Pour cela, nous avons analysé un échantillon de FecA/CLP à une concentration en protéine de l'ordre de 0,1 mg/ml tel qu'obtenu ci-dessus. Sur le cliché MET (Figure 3.9), nous constatons la présence de particules sphériques et de particules allongées. Ce constat est confirmé par l'histogramme gris représentant la fréquence des particules en fonction de leur rapport longueur/largeur, sur lequel nous distinguons effectivement une première population aux rapports proche de 1 (particules sphériques) et une seconde aux rapports compris entre 1,4 et 1,8 (particules allongées). En guise de comparaison, les résultats obtenus avec les CLP isolées sont représentés en noir et montrent une unique population d'objets sphériques.

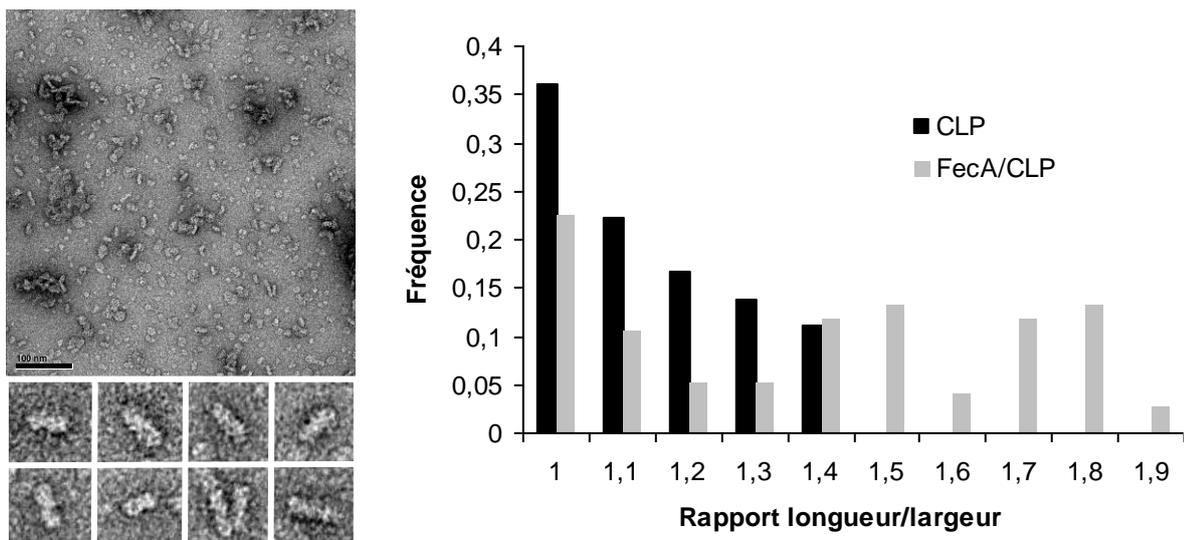


Figure 3.9 : Image MET de FecA solubilisée par les CLP (vue générale : haut ; agrandissements 5x : bas) ; Répartition des particules en fonction de leur rapport longueur/largeur

D'après ce cliché MET, nous émettons l'hypothèse que les particules allongées correspondent à des vues latérales de CLP et plus particulièrement à des complexes FecA/CLP. En effet, alors que leur longueur moyenne ($13,1 \pm 1,1$ nm) est comparable à celle des CLP ($10,3 \pm 1,8$ nm), leur largeur moyenne ($8,1 \pm 0,9$ nm) concorde avec celle des striations de lipide 11,8-NTA observées à la surface des nanotubes de carbone ($8,5 \pm 0,3$ nm). De plus, ces particules allongées n'ont été observées au préalable ni dans les solutions initiales de CLP ni dans celles de protéines. En revanche, pour ce qui est des particules circulaires, celles-ci étant similaires à celles observées en l'absence de protéine, aucune conclusion ne peut être faite sur leur nature (CLP "vides" ou complexes FecA/CLP). Enfin, il est intéressant de constater que la cavité des CLP est semblable, dans sa structure, à une bicouche lipidique, ce qui peut être à l'origine d'interactions particulières entre la protéine et les nano-objets. En effet, il est possible d'imaginer que ces derniers enveloppent le domaine transmembranaire de la protéine telle une bouée en laissant les sites de reconnaissance accessibles au ligand.

IV. Solubilisation de composés d'intérêt cosmétique

Dans les paragraphes précédents, nous avons montré que les CLP permettaient de solubiliser dans l'eau des composés complètement hydrophobes tels que les C_{60} . Or la problématique d'incorporer des substances actives non solubles dans l'eau dans des préparations majoritairement aqueuses est également très courante dans le domaine cosmétique. De ce fait,

et dans le cadre de notre collaboration avec le service de Recherche et Technologie de la société Chanel Parfums Beauté, nous avons étudié la solubilisation par les CLP de deux molécules d'intérêt cosmétique : un pigment et un filtre UV. La totalité des expériences présentées dans ce paragraphe a été effectuée avec les CLP issues du procédé 2.

IV.1. Solubilisation d'un pigment

Le premier composé d'intérêt cosmétique que nous avons cherché à solubiliser par les CLP est le RED30. Ce pigment de couleur rouge entre dans la composition de produits de maquillage (Figure 3.10) et présente une solubilité nulle en milieu aqueux et très faible en milieu organique.



Figure 3.10 : Structure, aspect et exemple d'utilisation du pigment RED30

Connaissant les problèmes de solubilité du RED30, le protocole choisi pour les essais de solubilisation consiste à soniquer au bain à ultra-sons (80 W) 3 mg de pigment dans 1 ml d'une solution de CLP issues du procédé 2.1 dans le TRIS à une concentration de 1 mg/ml. Le pigment non solubilisé, solide, est séparé par centrifugation puis le surnageant est analysé par spectrophotométrie UV-visible à la longueur d'onde de 540 nm qui correspond à l'absorbance maximale du RED30 (Tableau 3.1). Notre étude a commencé par l'analyse de l'effet du temps de sonication sur l'efficacité de la solubilisation. Pour cela, cinq échantillons ont été préparés selon le protocole énoncé précédemment avec des durées de sonication différentes. En guise de témoins, cinq autres échantillons ont également été préparés dans une solution de TRIS pur, c'est-à-dire sans nano-objets. Aussi, les CLP présentant une absorbance à 540 nm, cette dernière est systématiquement retranchée de celles présentées pour les solutions contenant le complexe RED30/CLP, après avoir vérifié qu'elle ne variait pas lors de la sonication (absorbance de 0,114 à $t = 0$ contre 0,124 à $t + 8h$).

| Entrée | Temps de sonication | Absorbance à 540 nm | |
|--------|---------------------|---------------------|-----------|
| | | RED30 | RED30/CLP |
| 1 | t = 0 | 0 | 0 |
| 2 | 15 minutes | 0 | 0,042 |
| 3 | 4 heures | 0 | 0,291 |
| 4 | 8 heures | 0 | 0,775 |
| 5 | 16 heures | 0 | 0,788 |

Tableau 3.1 : Etude de l'influence du temps de sonication sur l'efficacité de la solubilisation

D'après ces résultats, nous constatons dans un premier temps que le RED30 reste totalement insoluble dans le TRIS même après une longue sonication. En revanche, en présence de CLP, plus le temps de sonication est long, plus la densité optique relevée est élevée avec un palier atteint à partir de huit heures (Entrée 4). Cette première expérience permet donc de fixer la durée de sonication pour le reste de l'étude à huit heures, et de mettre en évidence le fait que le lot de CLP utilisé est capable de solubiliser du RED30 dans une solution aqueuse.

Dans le but de vérifier la stabilité du complexe RED30/CLP formé, nous avons observé son comportement par le biais d'une étape d'extraction par un solvant organique. A cet effet, le pigment est tout d'abord soniqué 15 minutes dans un bain à ultra-sons dans plusieurs solvants usuels tels que le toluène **A**, l'acétate d'éthyle **B**, l'éther diéthylique **C**, le chloroforme **D**, le cyclohexane **E** et l'éthanol **F**. L'observation des différents surnageants après centrifugation (Figure 3.11) montre que le toluène et le chloroforme sont les deux solvants dans lesquels le RED30 se solubilise le mieux ; le second est choisi pour les expériences d'extraction.

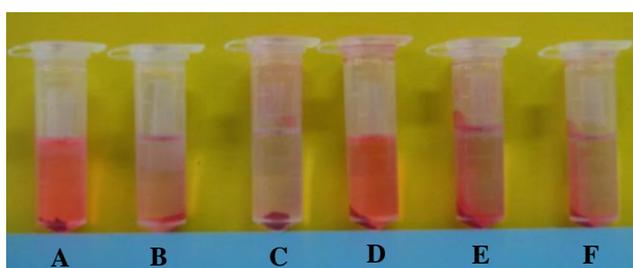


Figure 3.11 : Echantillons de RED30 dans différents solvants après sonication et centrifugation

L'étude est donc poursuivie en extrayant quatre fois les échantillons correspondant aux entrées 3 et 4 du tableau 3.1 par le même volume de chloroforme soit 1 ml. Chaque phase organique ainsi que la dernière phase aqueuse est analysée par spectrophotométrie UV-visible (Tableau 3.2). Pour l'échantillon issu d'une sonication de quatre heures (Entrée 1), nous constatons une

légère diminution de la densité optique dans la phase aqueuse (0,238 contre 0,291 initialement), et des valeurs relativement constantes et de l'ordre de 0,070 pour chacune des phases organiques. Un témoin consistant à ajouter du chloroforme à une solution de CLP dans le TRIS montre que les nano-objets restent dans la phase aqueuse. Les valeurs d'absorbance relevées dans la phase organique correspondent donc uniquement à la présence de pigment. Pour l'échantillon issu d'une sonication de huit heures (Entrée 2), l'absorbance observée est semblable à celle de l'échantillon initial et aucun signal n'est détecté pour les différentes phases organiques. Bien que ces résultats soient similaires, il semble qu'une sonication plus longue permette de favoriser les interactions RED30 - CLP et RED30 - micelles polymérisées en cassant plus efficacement les agrégats de pigment et rende son extraction moins facile.

| Entrée | Temps de sonication | Absorbance à 540 nm | |
|--------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | | Phase aqueuse (solution initiale) | Phase aqueuse (après 4 extractions) |
| 1 | 4 heures | 0,291 | 0,238 |
| 2 | 8 heures | 0,775 | 0,752 |

Tableau 3.2 : Etude sur la stabilité du complexe RED30/CLP

Nous avons ensuite poursuivi cette étude en nous intéressant à la solubilisation de RED30 par des échantillons témoins correspondant à (1) une solution de lipide 11,8-NTA à 1 mg/ml, (2) une solution de lipide 11,8-NTA à 1 mg/ml polymérisé et (3) une solution de micelles de lipide 11,8-NTA polymérisées préparée à 5 mg/ml puis remplacée à 1 mg/ml par dilution. En préparant ces échantillons à deux concentrations différentes, nous estimons que la nature des arrangements formés ne sera pas la même, une analyse MET ne permettant pas d'en apporter la confirmation. Dans un premier temps, l'effet de la sonication a été observé sur ces différents échantillons, en relevant leurs valeurs d'absorbance après huit heures de sonication. Puis les expériences sur la solubilisation du RED30 ont ensuite été effectuées en ajoutant 3 mg de pigment à 1 ml de chacune de ces solutions témoins. Les valeurs d'absorbance sont relevées après huit heures de sonication, après avoir éliminé le pigment non solubilisé par centrifugation, et en ayant pris soin de retrancher les valeurs obtenues sans RED30 (Tableau 3.3).

| Entrée | Echantillon | Absorbance à 540 nm | Absorbance à 540 nm sans RED30 |
|--------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1 | RED30/lipide | 0,179 | 0 |
| 2 | RED30/lipide polymérisé | 0,478 | 0,448 |

| | | | |
|---|-----------------------------|-------|-------|
| 3 | RED30/micelles polymérisées | 0,150 | 0,221 |
| 4 | RED30/CLP | 0,775 | 0,124 |

Tableau 3.3 : Tests témoins sur l'encapsulation du RED30

Pour ce qui est des échantillons témoins (Entrées 1-3), la solubilisation du pigment est la plus efficace avec la solution de lipide polymérisé (Entrée 2), les deux autres solutions présentant des absorbances plus faibles et relativement proches. Cependant, ces résultats restent nettement inférieurs à ceux obtenus avec les CLP (Entrée 4), prouvant la meilleure efficacité de ces dernières. Pour expliquer ces différences, deux hypothèses complémentaires peuvent être émises sur la façon dont le phénomène de solubilisation du RED30 se produit. La première consiste à dire que cette solubilisation est en partie due aux interactions hydrophobes entre le pigment et les chaînes carbonées du lipide. La seconde hypothèse repose sur le fait que dans le cas d'un système polymérisé, une certaine flexibilité entre les chaînes grasses est nécessaire pour incorporer les molécules de RED30. Ainsi, plusieurs conséquences peuvent en découler :

- ∞ tous les échantillons sont capables de solubiliser le RED30 (hypothèse 1)
- ∞ le lipide polymérisé à faible concentration est plus flexible donc plus favorable à complexer le RED30 (hypothèse 2)
- ∞ les micelles polymérisées à forte concentration sont trop compactes et offrent moins d'accès au RED30 (hypothèse 2)
- ∞ les CLP présentent les meilleurs résultats du fait de leur structure particulière qui consiste en un réseau tridimensionnel de chaînes de polymères très flexible (hypothèse 2) et qui offre une cavité hydrophobe (hypothèse 1) prédisposée à accueillir plus facilement de petits agrégats de RED30 (comme cela a été montré avec les C₆₀)

Cependant, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 1, les lots de CLP issues du procédé 2 sont en réalité un mélange de CLP et de micelles polymérisées. Pour tenter d'évaluer l'influence des différentes étapes du procédé 2 sur l'excès de lipide polymérisé, présent dans ces lots, ainsi que sa contribution à la solubilisation du RED30, deux échantillons sont préparés (Tableau 3.4) en reproduisant point par point le procédé 2.2 en présence (Entrée 1) ou en l'absence (Entrée 2) de MWNTs. Notons tout de même que les expériences de solubilisation ont été réalisées avec des solutions cinq fois plus concentrées que précédemment en CLP et en RED30. Aux valeurs d'absorbance mesurées après huit

heures de sonication et centrifugation des deux échantillons, sont retranchées les valeurs témoins.

| Entrée | Nature de l'échantillon | Absorbance à 540 nm |
|---------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1 | RED30/CLP | 1,285 |
| 2 | RED30/micelles polymérisées | 0,604 |

Tableau 3.4 : Tests d'encapsulation avec des CLP issues du procédé 2.2

En comparant les valeurs obtenues lors de ce test, nous constatons que la solution contenant les micelles polymérisées (Entrée 2), très proche dans sa composition des impuretés lipidiques présentes dans le lot de CLP issues du procédé 2, montre une valeur d'absorbance deux fois moins grande que celle obtenue avec les CLP. Les propriétés de solubilisation des CLP sont encore une fois mises en évidence.

Pour finir cette étude, d'autres protocoles de solubilisation du RED30 ont été envisagés (Tableau 3.5). Les modifications portent principalement sur le milieu de solubilisation des CLP. Ainsi le tampon TRIS est tout d'abord remplacé par du tampon phosphate (pH 7,4), un mélange TRIS/DMSO et un mélange TRIS/éthanol. Alors que l'utilisation de tampon phosphate devrait permettre de déterminer l'influence de la nature du tampon, celle de co-solvants miscible à l'eau a pour but de pré-solubiliser le pigment et de diminuer ainsi la présence d'agrégats. Ensuite, la phase aqueuse est complètement substituée par du chloroforme, et une méthode d'encapsulation plus douce est testée. Celle-ci consiste à chauffer l'échantillon à reflux sous agitation magnétique pendant treize heures, à le concentrer pour éliminer le chloroforme puis à le replacer dans le même volume de tampon TRIS. L'échantillon est enfin centrifugé à 14000×g pour éliminer le RED30 non solubilisé. Enfin, un dernier test consistant à augmenter la quantité initiale de pigment est effectué. Dans ce cas, un rapport RED30/CLP de 17/1 est utilisé. Pour chacune des conditions testées, des échantillons témoins de RED30 dans le TRIS sont également préparés. Les analyses en spectrophotométrie UV-visible sont effectuées selon les conditions déjà énoncées.

| Entrée | Solvant | Conditions d'encapsulation | Absorbance à 540 nm | |
|---------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | | RED30 | RED30/CLP^a |
| 1 | TRIS | sonication (8 h) | 0 | 0,775 |
| 2 | tampon phosphate | sonication (8 h) | 0 | 0,223 |
| 3 | TRIS/DMSO | sonication (8 h) | 0 | 0,070 |
| 4 | TRIS/EtOH | sonication (8 h) | 0 | 0,058 |
| 5 | chloroforme | chauffage + agitation | 0 | 0,127 |

Tableau 3.5 : Etude sur de nouvelles conditions d'encapsulation (^a DO corrigée par soustraction du signal dû aux CLP dans les mêmes conditions ; NC = non calculée)

Pour chacun de ces exemples, nous constatons la présence de pics d'absorbance à 540 nm mettant en évidence la présence de RED30. Cependant, des différences sont à noter en fonction des conditions utilisées. Dans un premier temps, l'emploi de tampon phosphate donne une densité optique de 0,223 (Entrée 2). Cette valeur est nettement inférieure à celle observée dans les mêmes conditions avec le tampon TRIS (Entrée 1). La diminution du pH de la solution (de 8 à 7,4) peut avoir pour effet de modifier la densité de charge à la surface des CLP et de ce fait modifier les conditions d'encapsulation. Dans les cas d'utilisation de co-solvants organiques miscibles à l'eau, les valeurs d'absorbance observées sont proches de zéro et laissent à penser que cette méthode est inefficace (Entrées 3 et 4). Avec un milieu de solvation uniquement organique, nous observons une légère solubilisation mais qui reste cependant assez faible (Entrée 5). Ici, le pigment étant pré-solubilisé, la différence d'affinité RED30/CLP et RED30/chloroforme peut être moins importante que dans le cas d'un milieu aqueux et diminue finalement l'effet escompté par la pré-solubilisation. Aussi, les différents solvants peuvent interagir avec les CLP en perturbant de ce fait les interactions RED30 – CLP. Tous ces résultats laissent à penser, qu'avec un rapport massique RED30/CLP de 3/1, les conditions initiales (TRIS, huit heures de sonication) restent les plus efficaces (Entrée 1). Cependant, lorsque ce rapport passe à 17/1 (Entrée 6), nous observons une absorbance de 0,819, valeur très proche de celle obtenue avec un rapport 3/1. Il serait donc intéressant d'entreprendre une étude complémentaire pour déterminer le rapport RED30/CLP optimal.

IV.2. Solubilisation d'un filtre UV

Le second principe actif que nous avons cherché à solubiliser par les CLP a été l'octyl méthoxycinnamate (OMC), un filtre contre les rayons ultra-violet B responsables des coups de soleil. Cette molécule hydrophobe entre principalement dans la composition de crèmes solaires (Figure 3.12) sous forme d'émulsion.

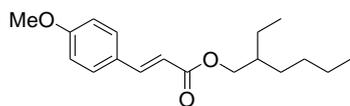


Figure 3.12 : Structure, aspect et exemple d'utilisation de l'OMC

Les expériences de solubilisation ont consisté dans un premier temps à soniquer pendant cinq minutes 15 μl d'OMC dans 5 ml d'une solution de CLP dans le TRIS à 1 mg/ml. Contrairement aux RED30, l'OMC se présente sous la forme d'une huile. D'un point de vue expérimental, la séparation de l'excès non solubilisé par une étape de centrifugation ou de filtration s'avère inadaptée. En revanche, à cause de son hydrophobie, cette molécule montre une affinité très élevée pour les solvants organiques, lesquels peuvent être utilisés pour éliminer l'OMC non solubilisé. L'étude a donc commencé par le choix d'un solvant capable d'éliminer au mieux l'excès de principe actif sans pour autant extraire l'OMC complexé par les CLP. Pour cela, quatre échantillons tels qu'obtenus au début de ce paragraphe sont lavés deux fois avec 5 ml de l'un des solvants sélectionnés, à savoir l'éther diisopropylique, le cyclohexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. L'efficacité du solvant utilisé est évaluée à l'issue des deux extractions en analysant par spectrophotométrie UV-visible les phases organiques et aqueuses de chaque échantillon (Figure 3.13). De part sa solubilité dans les solvants organiques étudiés, le coefficient d'extinction molaire de l'OMC dans chacun d'entre eux est déterminé à la longueur d'onde de 309 nm avec des solutions d'actif à des concentrations connues et exprimé en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$. Pour des raisons inverses, ceci n'a pas été possible dans les phases aqueuses. Les quantités d'OMC seront donc calculées en mM pour les phases organiques et relevées en DO pour les phases aqueuses.

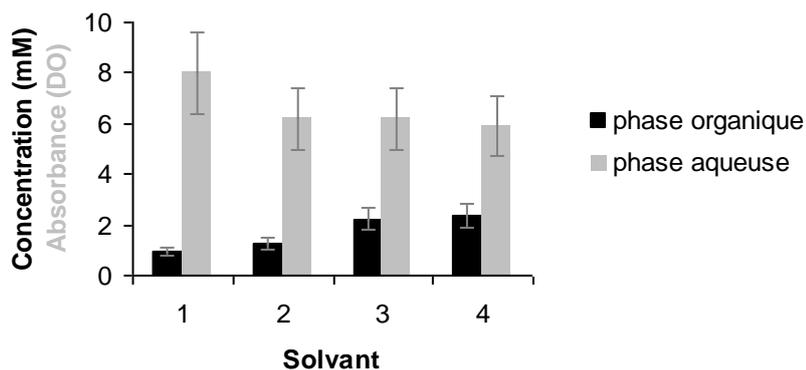


Figure 3.13 : Etude comparative sur l'extraction de l'excès d'OMC par différents solvants organiques : éther diisopropylique (1), cyclohexane (2), dichlorométhane (3), acétate d'éthyle (4)

Cette étude comparative nous montre, par la présence d'un pic d'absorbance à la longueur d'onde de 309 nm, que chacune des phases aqueuses analysées contient de l'OMC. Cependant, les valeurs d'absorbance correspondantes diffèrent selon le solvant organique utilisé et, de manière générale, plus elles sont basses, plus les quantités d'OMC présentes dans la phase organique sont élevées. En reprenant notre critère de sélection qui privilégie un solvant capable d'éliminer au mieux l'excès de principe actif sans extraire l'OMC complexé par les CLP, notre choix s'est arrêté sur l'utilisation du cyclohexane lequel a été ensuite sujet à une étude plus complète. Dans un premier temps, nous avons extrait six fois par ce solvant un échantillon d'OMC dans du tampon TRIS en absence de CLP (Figure 3.14). Le protocole suivi et les quantités mises en jeu sont les mêmes qu'au point précédent.

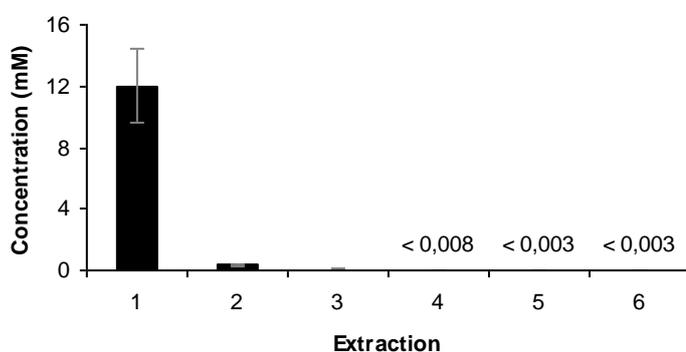


Figure 3.14 : Concentration d'OMC extraite par le cyclohexane en fonction du nombre d'extractions ($\epsilon_{(\lambda : 309 \text{ nm})}$ dans cHex : $18413 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)

L'analyse par spectrophotométrie UV-visible de chacune des six phases organiques atteste de l'efficacité de ce solvant vis-à-vis de l'élimination de l'excès d'OMC. En effet, il suffit d'une seule extraction par le cyclohexane pour éliminer la *quasi* totalité d'OMC présent dans la phase aqueuse (la concentration initiale théorique en OMC est de 10,43 mM). De plus, à partir de la quatrième extraction, les quantités de principe actif extraites sont de plus en plus infimes. Une fois le solvant et le protocole d'extraction validé, l'étude est poursuivie en présence de CLP (Figure 3.15).

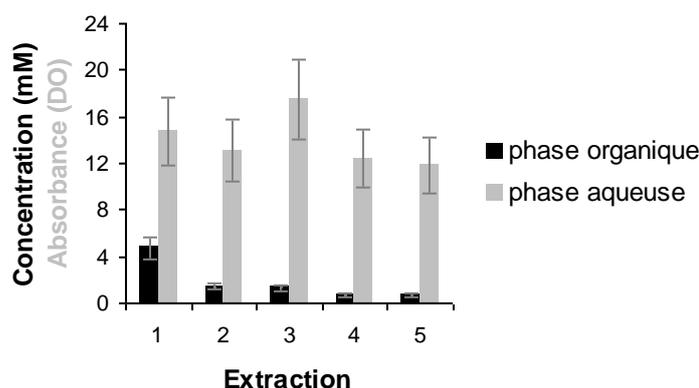


Figure 3.15 : Concentration d'OMC extraite, en présence de CLP, par le cyclohexane en fonction du nombre d'extractions ($\epsilon_{\lambda : 309 \text{ nm}}$ dans cHex : $18413 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$) et absorbance des phases aqueuses correspondantes

Dans ce cas, une quantité beaucoup moins importante d'OMC est éliminée lors de la première extraction. En effet, la concentration relevée dans la phase organique correspondante est de 4,72 mM contre 12,00 mM précédemment. Cette observation démontre une meilleure affinité de l'OMC pour la phase aqueuse par rapport à l'eau pure, ce que nous attribuons à des interactions favorables entre l'actif et les CLP. De plus, dès la seconde extraction, ces concentrations diminuent fortement pour finalement se stabiliser autour de 0,7 mM à partir de la quatrième. Rappelons que ces valeurs sont cent à mille fois supérieures à celles relevées, au même stade, avec un échantillon ne contenant pas de CLP. Ce constat laisse à supposer que ces quantités de principe actif extraites ne correspondent plus à de l'OMC en excès mais plutôt à de l'OMC complexé par les CLP et arraché par le solvant. Ainsi, nous pouvons affirmer que seulement quatre extractions par le cyclohexane sont nécessaires pour obtenir un échantillon propre de complexes OMC/CLP, c'est-à-dire sans traces de principe actif en excès. A partir de là, il est possible d'évaluer la quantité finale d'OMC présente dans la phase aqueuse, soit 2,25 mM, en soustrayant à la quantité initiale d'OMC celles éliminées lors des quatre extractions. Ceci permet d'évaluer un premier taux d'encapsulation de l'ordre de 40%.

Cependant, nous notons des valeurs atypiques d'absorbance mesurées dans la phase aqueuse. L'ensemble des expériences réalisées précédemment (Figure 3.13) donne une valeur moyenne d'absorbance autour de 6 alors que dans ce cas précis elle se situe autour de 12. Nous privilégierons l'hypothèse d'une solubilisation particulièrement efficace (mais non expliquée) plutôt que celle d'une erreur expérimentale.

Dans le but de confirmer le taux d'encapsulation évalué à 40%, nous avons poursuivi en analysant un échantillon obtenu dans les mêmes conditions par thermogravimétrie. Cette technique d'analyse mesure la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Chaque composé ayant sa propre température de dégradation, nous devrions être en mesure de confirmer la présence d'OMC dans l'échantillon puis, de le quantifier massivement par rapport aux CLP et donc de déterminer un taux d'encapsulation. Ces analyses sont tout d'abord effectuées sur des échantillons d'OMC pur, de CLP pures en solution dans le TRIS et sèches, puis sur des complexes OMC/CLP en solution dans le TRIS et lyophilisés (Tableau 3.6).

| Entrée | Echantillon | Température de dégradation (°C) |
|---------------|--|--|
| 1 | OMC | 339 |
| 2 | CLP en solution dans du tampon TRIS | 443 |
| 3 | CLP sèches | 445 |
| 4 | complexe OMC/CLP (solution dans tampon TRIS) | 325 (OMC) et 441 (CLP) |
| 5 | complexe OMC/CLP (lyophilisé) | 328 (OMC) et 440 (CLP) |

Tableau 3.6 : Températures de dégradations des différents échantillons

Les températures de dégradation de l'OMC et des CLP dans le TRIS, respectivement de 339 et 443°C (Entrées 1 et 2) sont suffisamment éloignées pour conduire à l'analyse correcte d'un mélange. Il est également intéressant de constater que la nature des CLP, en solution ou sèches, n'a aucune incidence sur cette température de dégradation (Entrées 2 et 3). Pour ce qui est de l'analyse des complexes OMC/CLP, nous constatons que les échantillons en solution dans le TRIS (Entrée 4) et lyophilisés (Entrée 5) montrent des dégradations thermiques semblables à celles observées pour les échantillons de référence. En rappelant que ces échantillons sont dépourvus d'OMC non solubilisé par les CLP, la preuve quant à la solubilisation de cet actif par les nano-objets est donc apportée.

Par l'analyse thermogravimétrique de l'échantillon lyophilisé, un taux d'encapsulation a également pu être déterminé (Figure 3.16).

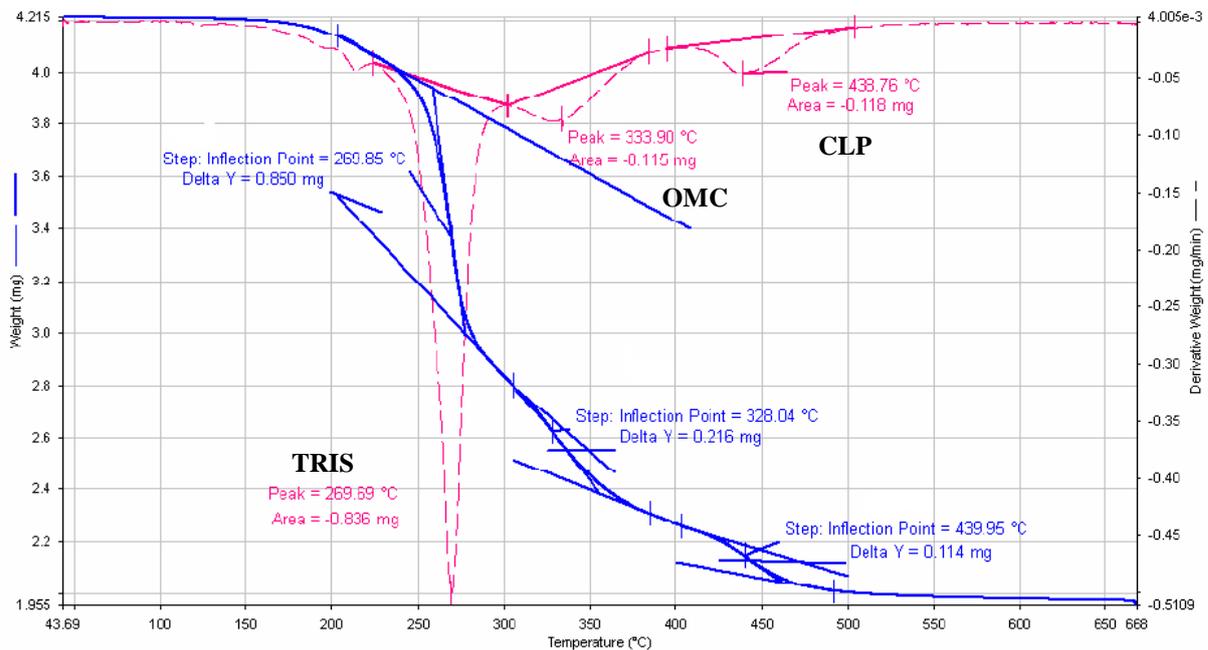


Figure 3.16 : Thermogramme d'un échantillon lyophilisé de complexe OMC/CLP

La courbe bleue de ce thermogramme correspond aux pertes de masse de l'échantillon analysé en fonction de la température. La courbe rouge, quant à elle, représente l'intégrale de la courbe bleue et permet de déterminer plus précisément les valeurs de ces pertes de masse. Ainsi, au point d'inflexion relatif à l'OMC (328°C), nous observons sur la courbe rouge une perte de masse de 0,115 mg. En revanche au point d'inflexion relatif aux CLP (440°C), nous observons une perte de masse de 0,118 mg. Ceci signifie que dans l'échantillon analysé, l'OMC et les CLP sont présents dans des proportions massiques identiques. Ceci conduit à un taux d'encapsulation de l'ordre de 50%, ce qui est très proche de la valeur estimée précédemment (40%).

V. Marquage des CLP au diode

Avec l'idée d'utiliser les CLP en tant que vecteurs de molécules d'intérêts biologiques, nous avons cherché à y greffer du diode, lequel est utilisé en imagerie médicale pour ses propriétés

d'agent de contraste.¹⁵¹ L'éventuel parcours des CLP ainsi marquées pourrait alors être tracé au sein du corps humain. Le second intérêt à posséder des nano-objets marqués, est qu'ils peuvent également être utilisés à vide comme agents de contraste pour détecter et analyser des anomalies au niveau de différents organes ; nous parlons alors de tomographie. Cette application est déjà développée avec d'autres types de nanostructures telles que les micelles ou les liposomes.¹⁵²

Après l'étape de polymérisation des arrangements lipidiques à la surface des nanotubes de carbone, les fonctions diacétyléniques comprises dans le squelette du lipide 11,8-NTA se transforment en enchaînement de type ène-yne (Figure 3.17), laissant une addition de diiode possible.¹⁵³

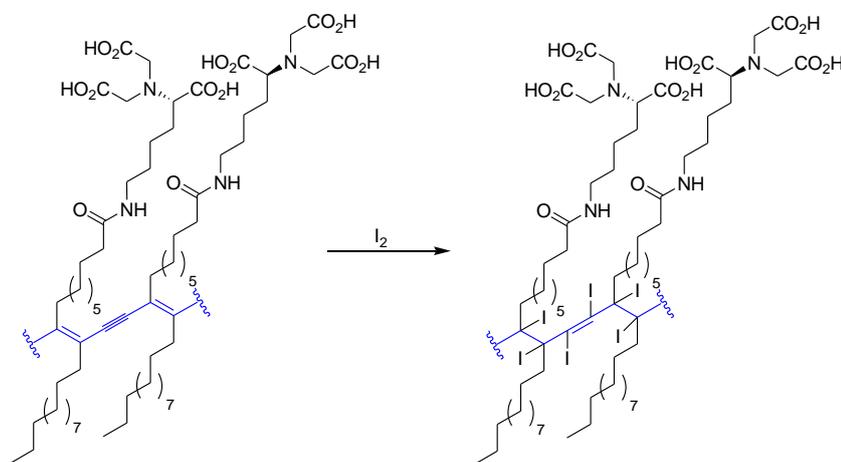


Figure 3.17 : Addition de diiode sur le système ène-yne (représenté en bleu)

Deux échantillons de CLP en solution dans le TRIS sont alors préparés à des concentrations différentes. Après y avoir ajouté la même quantité de diiode, l'excès de ce dernier est éliminé sous vide (sublimation du diiode). Des échantillons témoins d'iodure de sodium et de CLP isolées à plusieurs concentrations sont également préparés. Chacun d'entre eux est analysé en solution à l'aide d'un scanner à rayons X à usage médical (Figure 3.18).

¹⁵¹ A. Rutten, M. Prokop *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **3** 307-316 (2007)

¹⁵² Matsuura N., Rowlands J.A. *Med. Phys.* **35** 4471-4487 (2008)

¹⁵³ Yue D., Yao T., Larock R.C. *J. Org. Chem.* **70** 10292-10296 (2005)

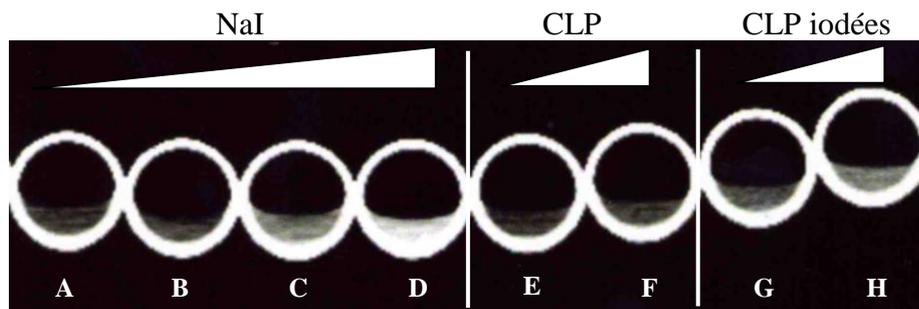


Figure 3.18 : Observation de différentes solutions à l'aide d'un scanner-X à usage médical

Les quatre premiers échantillons (A-D), correspondant aux solutions d'iodure de sodium à des concentrations égales à 0,2 ; 1 ; 5 et 10 mg/ml, montrent une augmentation de la radiocapacité en fonction de la concentration. Les deux suivants (E-F) correspondent quant à eux aux solutions de CLP dans du tampon TRIS à 1 et 2 mg/ml. Ici, la radiocapacité est très faible et *quasi* indétectable. En revanche, dans le cas des solutions de CLP iodées (G-H) dans du tampon TRIS à 1 et 2 mg/ml et respectivement 0,2 et 0,4 mg/ml d'iode (valeurs théoriques en estimant une réaction d'addition totale), un signal est observé. A la concentration de 0,4 mg/ml d'iode, les CLP iodées possèdent même une radiocapacité proche de celle de la solution d'iodure de sodium à une concentration de 5 mg/ml. Cette observation est encourageante pour une application en imagerie-X puisqu'il semblerait que le confinement des atomes d'iode au cœur des CLP conduit à des capacités de contraste plus fortes que celles atteintes par des molécules circulantes isolées, ce qui permettrait de diminuer les doses injectées dans le corps humain. Des études complémentaires sont en cours au laboratoire notamment dans le but d'optimiser la quantité de diiode greffée aux CLP.

VI. Conclusion

Nous avons cherché, dans ce chapitre, à étudier le comportement des CLP, en milieu aqueux, en présence de molécules hydrophobes de toutes sortes. Avec les CLP issues du procédé 1, nous avons donc commencé par démontrer que leur utilisation permettait de solubiliser de façon concentration dépendante une première série de composés extrêmement hydrophobes que sont les fullerènes C_{60} . Ensuite, par la solubilisation de deux protéines, FecA et FpvA, nous avons mis en évidence, par le biais d'une étude par FRET, le fait que le complexe protéine/CLP permet de conserver la protéine sous sa forme active. Après ces trois exemples, nous nous sommes consacrés à l'étude de composés d'intérêts cosmétiques et plus

particulièrement d'un pigment (RED30) et d'un filtre UV (OMC). A cet effet, et également dans le but de valider le procédé 2, nous avons utilisé des CLP issues de ce dernier. L'étude sur le RED30 a servi à valoriser les propriétés des CLP vis-à-vis d'autres arrangements lipidiques, à base de lipide 11,8-NTA, pouvant être générés au cours du procédé 2. Grâce aux différents tests sur l'OMC, nous avons ensuite pu déterminer un taux d'encapsulation très encourageant de l'ordre de 50%. Finalement, nous avons conclu ce chapitre par la présentation d'une étude préliminaire concernant le marquage des CLP par du diiode, laquelle est le premier exemple de fonctionnalisation des CLP. Les résultats obtenus à ce sujet laissent à penser que les CLP ainsi marquées pourraient être utilisées, sous une forme complexée avec une molécule active ou en l'état, comme agent de contraste respectivement pour le traçage de leur parcours dans le corps humain ou pour la détection de structures anatomiques comportant une anomalie.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés à un autre type de composé hydrophobe d'intérêt biologique, l'acide bétulinique. Ce triterpène pentacyclique de la famille des lupanes (Figure 3.19) est un dérivé du bétulinol, composé naturel présent en forte concentration dans l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*).¹⁵⁴ Il est reconnu pour ses activités thérapeutiques variées : anti-malariales, anti-inflammatoires ou encore antivirales (VIH).¹⁵⁵ Plus récemment, il s'est également avéré cytotoxique contre de nombreuses lignées de cellules cancéreuses de l'organisme tout en présentant une faible toxicité pour les cellules saines, faisant de cette molécule un traitement potentiel très prometteur.¹⁵⁶

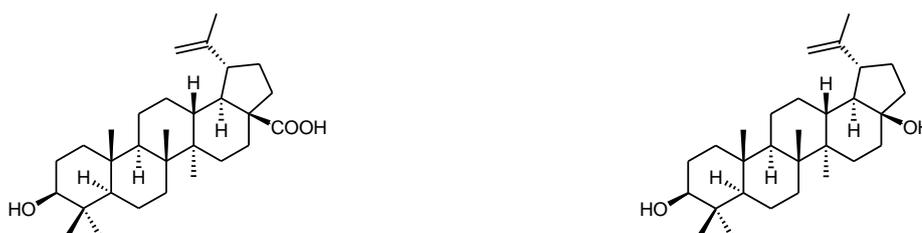


Figure 3.19 : Structures de l'acide bétulinique (gauche) et du bétulinol (droite)

En ultra-soniquant des quantités variables d'acide bétulinique dans du milieu de culture (DMEM + 0,1% BSA, pH 7,0-7,4) en présence ou non de CLP à une concentration de 1 mg/ml, nous avons montré, après analyse par chromatographie liquide à haute performance

¹⁵⁴ O'Connel M.M., Bentley M.D. Campell C.S. *Phytochemistry* **27** 2175-2176 (1988)

¹⁵⁵ Baglin I., Mitaine-Offier A.C., Nour M., Tan K., Cavé C., Lacaille-Dubois M.A. *Mini Rev. Med. Chem.* **3** 159-161 (2003)

¹⁵⁶ Liby K.T., Yore M.M., Sporn M.B. *Nat. Rev. Cancer* **5** 357-369 (2007)

(CLHP), que les nano-objets permettent de solubiliser cette molécule active. Des tests biologiques ont ensuite été effectués sur ces différents échantillons. La sélectivité de l'acide bétulinique pour le récepteur TGR5 est évalué sur des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) par luminescence.¹⁵⁷ Bien que très encourageants, ces tests biologiques ne sont pas, en l'état actuel, suffisamment discriminants en faveur des lots d'acide bétulinique/CLP par rapport aux lots témoins. Des études complémentaires sont en cours au sein du laboratoire afin de résoudre ce problème. Des protocoles similaires y sont également testés avec des solutions de γ -cyclodextrines, afin de comparer les propriétés de solubilisation de ces dernières avec celles des CLP.

¹⁵⁷ Sato H., Genet C., Strehle A., Thomas C., Lobstein A., Wagner A., Mioskowski C., Auwerx J., Saladin R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362** 793–798 (2007)

Chapitre 4

Vers la synthèse de CLP à base de nouveaux lipides

I. Introduction

Alors que le second chapitre de ce manuscrit a été entièrement consacré à l'obtention de CLP à partir d'auto-assemblages de lipide 11,8-NTA photo-polymérisable à la surface de nanotubes de carbone, le troisième a pour sa part présenté les propriétés de ces nano-objets quant à la mise en solution de molécules hydrophobes en milieux aqueux. Dans le but de simplifier la structure du lipide 11,8-NTA puis de diversifier les domaines d'application des CLP, nous avons cherché à modifier sa nature et plus particulièrement la nature de sa tête polaire. Nous présenterons donc dans ce chapitre les différents résultats obtenus à cet effet, en commençant par une première partie axée sur une étude détaillée de la fonction acide carboxylique puis en poursuivant avec une seconde partie sur le développement de têtes polaires anioniques, cationiques ou neutres. Ces nouveaux lipides ont été imaginés en nous inspirant de la diversité structurale des composés capables de former des auto-arrangements (voir Chapitre 1) mais aussi de travaux présentés dans la littérature au sujet de l'utilisation de dérivé d'acide 10,12-pentacosadiynoïque^{158,159} (APCD) pour la formation de vésicules photo-polymérisables. Une fois les différents lipides synthétisés, leur capacité à s'adsorber à la surface de nanotubes de carbone sera étudiée avec des MWNTs du fournisseur n-Tec, à l'exception des lipides monoacides et diacides saturés où des SWNTs du fournisseur MER Corp. seront utilisés. Notons également que l'intérêt de rechercher des alternatives au lipide 11,8-NTA a été doublé, du fait de notre partenariat avec la société Chanel Parfums Beauté, par la nécessité de diminuer le coût de revient des CLP qui peut être considéré comme facteur limitant à l'échelle industrielle. En effet, malgré une synthèse optimisée, celui-ci reste élevé de par le coût élevé des matières premières.

¹⁵⁸ Okada S., Peng S., Spevak W., Charych D. *Acc. Chem. Res.* **31** 229-239 (1998)

¹⁵⁹ Boullanger P., Lafont D., Bouchu M.-N., Jiang L., Liu T., LU W., Guo C.X., Li J. *C. R. Chime* **11** 43-60 (2008)

II. Vers des lipides contenant des fonctions de type acide carboxylique

Dans le but de rechercher un substitut au lipide 11,8-NTA, nous commencerons par présenter nos résultats sur l'étude de la fonction acide carboxylique. Désireux de conserver le motif diacétylénique dans le but de privilégier une étape de polymérisation photo-induite, nous nous sommes limités à effectuer les transformations structurales au niveau de la tête polaire. Ainsi, de nouveaux lipides contenant des motifs mono et diacides ont été synthétisés (pour rappel, la tête NTA est un triacide) puis leur comportement a été analysé en présence de nanotubes de carbone. Le but de cette première étude est tout d'abord de démontrer la viabilité de ces motifs sur des lipides saturés puis sur des lipides photo-polymérisables. Connaissant l'importance de la notion de balance hydrophile/hydrophobe, déjà observée avec le lipide 11,8-NTA, sur les propriétés d'adsorption du lipide, différentes longueurs de chaînes grasses ont été testées.

II.1. Lipides de type monoacide

a – Lipides saturés

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des lipides saturés de type monoacide, aux longueurs de chaîne comprises entre 9 et 23 atomes de carbone, tous commerciaux. En nous basant sur les conditions énoncées dans le procédé 1, plusieurs solutions de lipide à une concentration de 1 mg/ml dans du tampon TRIS, en présence ou non de 1% massique de SDS, sont préparées. A 1 ml de ces solutions sont ajoutés 1 mg de nanotubes. Les différents échantillons sont ensuite soniqués trente minutes au bain à ultra-sons puis, pour ceux contenant du SDS, dialysés sept fois contre du tampon TRIS. Chacun d'entre eux est finalement observé en MET sans purification supplémentaire (Tableau 4.1).

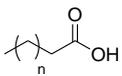
| Entrée | Lipide monoacide | Striations à la surface des nanotubes (avec SDS) | Striations à la surface des nanotubes (sans SDS) |
|--------|--|--|--|
| 1 | n = 7 | / | aucune |
| 2 | n = 9 | / | aucune |
| 3 | n = 11 | aucune | régulières |
| 4 | n = 13 | irrégulières | régulières |
| 5 |  n = 15 | irrégulières | / |
| 6 | n = 17 | irrégulières | / |
| 7 | n = 19 | aucune | / |
| 8 | n = 21 | aucune | / |

Tableau 4.1 : Adsorption de lipides monoacides saturés à la surface de SWNTs MER Corp.

Cette analyse microscopique montre qu'en présence de détergent, des arrangements irréguliers sont observés pour les lipides dont la chaîne grasse est comprise entre 15 et 19 carbones (Entrées 4-6). En l'absence de SDS, ce sont les lipides aux longueurs de chaîne comprises entre 13 et 15 carbones (Entrées 3 et 4) qui s'adsorbent à la surface des nanotubes. Bien que l'étude n'ait pas été poursuivie avec des lipides plus long en l'absence de détergent, il semble que les zones d'efficacité, mises ici en évidence, sont semblables, que du SDS soit utilisé ou non. Elles correspondent à une balance hydrophile/hydrophobe optimale où le caractère hydrophile des lipides, fixé par le motif monoacide, est contrebalancé par le caractère hydrophobe de la chaîne grasse. Dans les cas où celle-ci est trop courte ou trop longue, les lipides ne s'adsorbent pas à la surface des nanotubes.

Une étude effectuée sur les clichés MET du lipide présentant les meilleurs résultats (Entrée 4) a permis de déterminer la largeur moyenne d'une striation. Celle-ci, égale à $4,7 \pm 0,1$ nm, est proche de deux fois la longueur théorique de ce lipide (4,2 nm) mais ne diffère que très légèrement de celle observée dans le cas d'arrangements issus du SDS seul ($4,4 \pm 0,2$ nm). L'écart entre la largeur de ces striations de SDS et deux fois la longueur théorique de ce détergent (3,4 nm) peut s'expliquer par de fortes répulsions de charges au niveau des parties hydrophiles des arrangements, disposées tête bêche. Il n'est donc pas possible de confirmer l'origine des striations. Cependant, en tenant compte du fait que le SDS ne résiste pas à l'étape de dialyse (voir Chapitre 2 **II.4.b**), nous en déduisons que, dans tous les cas, ces striations sont uniquement dues au lipide.

b – Lipides photo-polymérisables

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de composés photo-polymérisables dont les longueurs de chaînes sont comprises entre 17 et 24 atomes de carbone. Pour cela, les travaux de S. Rickling ont été pris en compte. Les conditions d'adsorption et d'analyse sont les mêmes que celles appliquées aux monoacides précédents (Tableau 4.2).

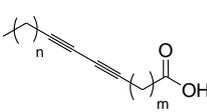
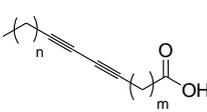
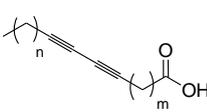
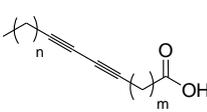
| Entrée | Lipide n,m-monoacide | Striations à la surface des nanotubes (avec SDS) | Striations à la surface des nanotubes (sans SDS) |
|--------|--|--|--|
| 1 |  n,m = 4,8 | aucune | aucune |
| 2 |  n,m = 6,8 | aucune | aucune |
| 3 |  n,m = 7,8 | aucune | aucune |
| 4 |  n,m = 11,8 | aucune | aucune |

Tableau 4.2 : Adsorption de lipides monoacides photo-polymérisables à la surface de SWNTs MER Corp.

Quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée, aucune striation n'est visible, en présence ou non de SDS. Ces observations sont plutôt logiques comparées à celles effectuées avec leurs analogues saturés, où il est difficile de noter la présence de striations régulières à partir des lipides dont la chaîne grasse comporte 17 atomes de carbone, ce qui correspond à la longueur de chaîne du plus court lipide photo-polymérisable (Entrée 1). Le caractère hydrophile de la tête polaire portée par une seule fonction acide carboxylique n'est donc pas suffisant, dans la gamme étudiée, pour obtenir une balance hydrophile/hydrophobe optimale synonyme d'adsorption efficace. Aucune conclusion ne peut cependant être tirée quant à l'insertion du motif diacétylénique dans la composition des différents lipides.

II.2. Lipides de type diacide

a – Lipides saturés

L'étude est ensuite poursuivie avec un motif diacide. Celui-ci peut être obtenu de façon simple à partir du malonate de diméthyle. Les synthèses de lipides saturés, avec des longueurs de chaîne comprises entre 10 et 20 atomes de carbone, ont été réalisées afin de démontrer l'efficacité de cette nouvelle tête polaire. Ces synthèses en deux étapes consistent en l'alkylation du malonate de diméthyle par différents bromo-alcanes **10** puis en l'hydrolyse des intermédiaires **11** formés pour donner les lipides de type diacide **12** désirés (Schéma 4.1). Les rendements globaux de ces synthèses sont compris entre 19 et 53%.

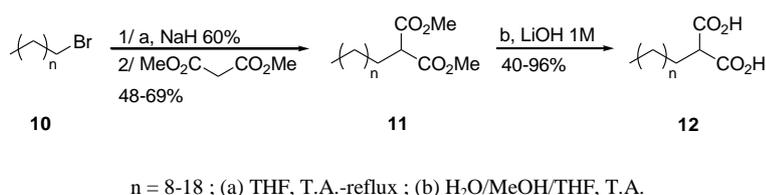


Schéma 4.1 : Schéma de synthèse des lipides diacides saturés

Une fois les lipides synthétisés, leur comportement vis-à-vis de SWNTs MER Corp. est observé par MET (Tableau 4.3). Les différents échantillons sont préparés en suivant les mêmes protocoles qu'au paragraphe II.1. puis observés en présence et en l'absence de SDS.

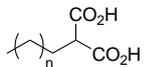
| Entrée | Lipide diacide | Référence | Striations à la surface des nanotubes (avec SDS) | Striations à la surface des nanotubes (sans SDS) |
|--------|--|------------|--|--|
| 1 | n = 8 | 12a | / | aucune |
| 2 | n = 10 | 12b | / | aucune |
| 3 |  n = 12 | 12c | aucune | aucune |
| 4 | n = 14 | 12d | irrégulières | régulières |
| 5 | n = 16 | 12e | régulières | régulières |
| 6 | n = 18 | 12f | irrégulières | régulières |

Tableau 4.3 : Adsorption de lipides diacides saturés à la surface de SWNTs MER Corp.

Ici, la formation plus ou moins régulière de striations à la surface des nanotubes est observée avec les lipides aux longueurs de chaîne comprises entre 16 et 20 carbones (Entrées 4-6) aussi bien avec que sans SDS. Ce résultat permet de conclure positivement sur l'efficacité de la fonction diacide pour des lipides saturés. De plus, la notion de balance hydrophile/hydrophobe est encore une fois mise en évidence. En effet, pour les lipides à chaînes plus courtes (Entrées 1-3), aucune striation n'est visible et ce pour les mêmes raisons que celles expliquées pour les lipides monoacides saturés. Il est intéressant de constater qu'en ajoutant une fonction acide dans la tête polaire des lipides, donc en augmentant leur caractère hydrophile, la balance hydrophile/hydrophobe efficace se déplace logiquement vers des lipides contenant des chaînes grasses plus longues donc au caractère hydrophobe plus élevé. En effet, cette balance est efficace à partir de 16 atomes de carbone dans le cas des diacides alors qu'elle l'est à partir de 11 atomes de carbone dans le cas des monoacides (Tableau 4.1, Entrée 3).

b – Lipides photo-polymérisables

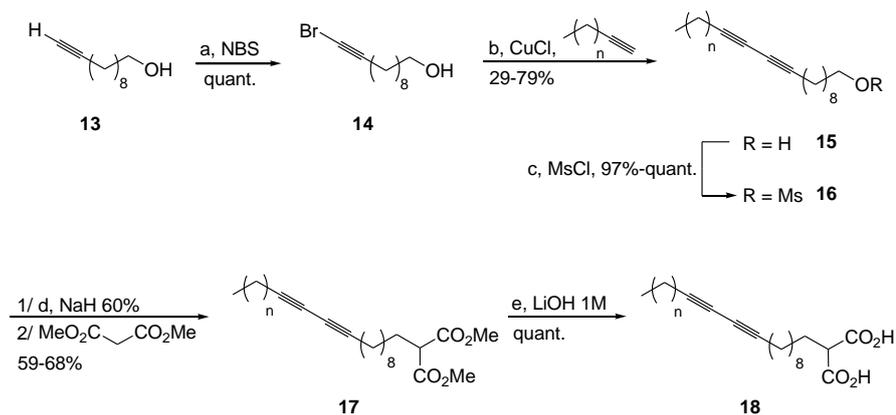
Les lipides diacides saturés ayant montré des propriétés d'adsorption à la surface des nanotubes de carbone, nous avons poursuivi notre étude avec des lipides insaturés photo-polymérisables dont les longueurs de chaînes se situent entre 18 et 25 atomes de carbone. Pour obtenir ces lipides, deux voies de synthèse ont été développées.

La voie 1 (Schéma 4.2) a pour étape clé la formation du motif diacétylénique par le biais d'un couplage entre un alcyne vrai et un alcyne terminal bromé.¹⁶⁰ Ce dernier a été préféré à son analogue iodé, utilisé initialement,¹⁶¹ en raison de conditions de synthèse plus douces. La

¹⁶⁰ Villemin D., Cadiot P., Kuétegan M. *Synthesis* **3** 230-231 (1984)

¹⁶¹ Chodkiewicz W. *Ann. Chim. Paris* **2** 819-869 (1957)

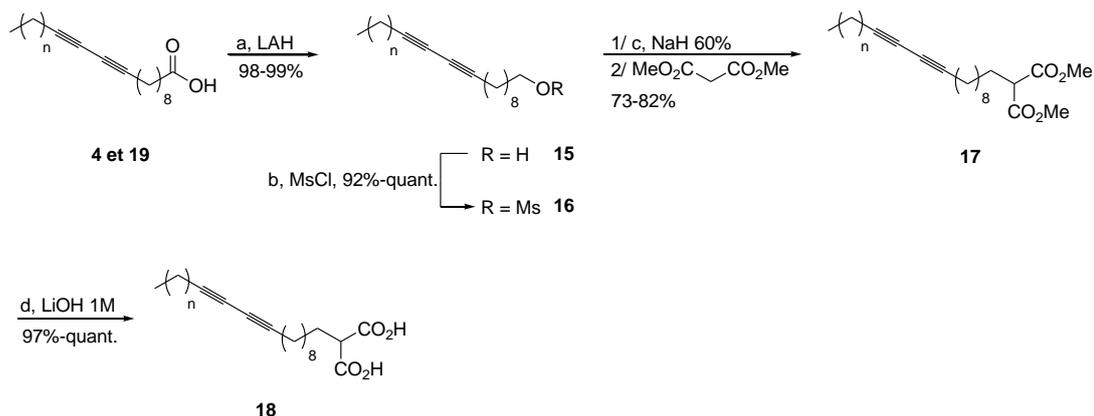
première des cinq étapes de cette voie consiste en la bromation du 10-undécyn-1-ol **13**. Après couplage de l'intermédiaire formé **14** avec différents alcynes vrais, les alcools primaires résultants **15** sont activés par le chlorure de mésyle puis additionnés sur le malonate de diméthyle. Ces derniers intermédiaires **17** sont hydrolysés pour donner les lipides diacides photo-polymérisables **18** désirés. Les rendements globaux de cette voie de synthèse sont de 45% pour le lipide 4,9-diacide **18a** et de 20% pour le lipide 7,9-diacide **18b**.



n = 4 et 7 ; (a) AgNO_3 , acétone, T.A. ; (b) Hydroxylamine, MeOH/EtNH₂, T.A. ; (c) Et₃N, THF, T.A. ; (d) TBAI, THF, T.A.-reflux ; (e) H₂O/MeOH/THF, T.A.

Schéma 4.2 : Synthèse de lipides diacides photo-polymérisables (Voie 1)

La voie 2 (Schéma 4.3), en quatre étapes, a quant à elle été mise au point pour les synthèses de lipides à partir d'acides-diynes commerciaux. Elle consiste à réduire ceux-ci en leurs alcools correspondants **15**, lesquels sont ensuite activés par le chlorure de mésyle. Une étape de couplage avec le malonate de diméthyle puis l'hydrolyse de ces derniers intermédiaires **17** permettent d'obtenir les composés **18** désirés avec des rendements globaux relativement proches de 64% pour le lipide 9,9-diacide **18c** et de 71% pour le lipide 11,9-diacide **18d**.



n = 9 et 11 ; (a) THF, T.A ; (b) Et₃N, THF, T.A. ; (c) TBAI, THF, T.A.-reflux ; (d) H₂O/MeOH/THF, T.A.

Schéma 4.3 : Synthèse de lipides diacides photo-polymérisables (Voie 2)

Pour ce groupe de lipides, les tests d'adsorption sont effectués selon les mêmes protocoles que ceux précédemment cités mais avec des MWNTs n-Tec, aussi bien avec que sans SDS (Tableau 4.4).

| Entrée | Lipide n,m-diacide | Référence | Striations à la surface des nanotubes (avec SDS) | Striations à la surface des nanotubes (sans SDS) |
|--------|--|------------|--|--|
| 1 |  n,m = 4,9 | 18a | aucune | régulières |
| 2 |  n,m = 7,9 | 18b | aucune | régulières |
| 3 |  n,m = 9,9 | 18c | aucune | irrégulières |
| 4 |  n,m = 11,9 | 18d | régulières | régulières |

Tableau 4.4 : Adsorption de lipides diacides photo-polymérisables à la surface de MWNTs n-Tec

Contrairement aux expériences précédentes, les résultats de cette analyse microscopique diffèrent selon que du SDS est utilisé ou non. En effet, avec SDS et après dialyse, seul le lipide le plus long montre des striations régulières à la surface des MWNTs (Entrée 4). En revanche, sans détergent ni dialyse, des auto-arrangements héli-micellaires sont observés pour chacun d'entre eux. (Entrées 1-4). Ces résultats sont très encourageants puisque, contrairement aux lipides monoacides photo-polymérisables (Tableau 4.2), dont les longueurs de chaîne sont identiques, des striations régulières sont observées. Il fallait donc augmenter le caractère hydrophile de la tête polaire.

Une étude complémentaire par MET des échantillons de MWNTs couverts de lipide 11,9-diacide **18d**, avec et sans SDS, a été effectuée dans le but d'apporter des informations supplémentaires quant à la nature des striations (Figure 4.1).

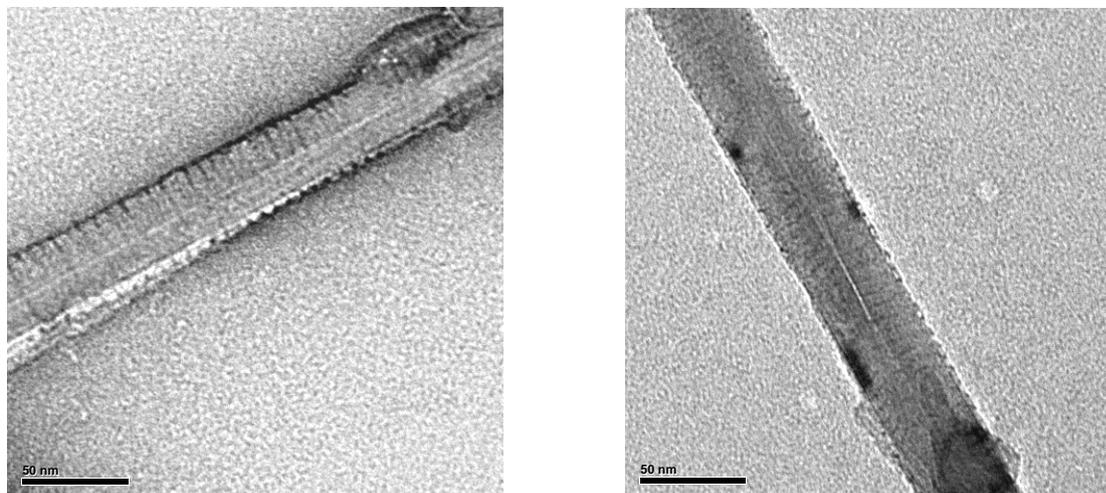


Figure 4.1 : MWNT couvert de lipide 11,9-diacide **18d** avec (gauche) et sans (droite) SDS

Sur ce cliché, nous constatons que, quelles que soient les conditions expérimentales suivies, avec ou sans SDS, la largeur des striations observées est égale à $7,0 \pm 0,1$ nm ce qui correspond bien à deux fois sa longueur théorique (7,0 nm) et ce qui est suffisamment différent de celle observée dans le cas d'arrangements de SDS seul ($4,4 \pm 0,2$ nm) pour conclure que ces auto-arrangements sont bien issus du composé **18d**.

Les résultats d'adsorption obtenus avec ces lipides diacides sont encourageants, mais, d'un point de vue synthétique aucun d'entre eux ne peut être considéré comme une alternative intéressante à l'utilisation du lipide 11,8-NTA (synthèses plus longues et rendements globaux plus faibles ; voir chapitre 2 **I.1.** pour la synthèse du lipide 11,8-NTA). Cependant, un troisième paramètre peut être pris en compte dans cette étude : le poids moléculaire du lipide. En nous limitant au lipide 11,9-diacide **18d**, qui présente les meilleurs résultats, une diminution importante de son poids moléculaire, qui passe de 618,86 g/mol (11,8-NTA) à 446,67 g/mol, est à noter. Cette modification peut avoir une conséquence favorable sur les propriétés d'encapsulation des CLP. En effet, nous avons vu que le taux d'encapsulation se détermine en fonction du rapport massique encapsulé/encapsulant. Ainsi, en diminuant le poids moléculaire du lipide dont sont constituées les CLP *via* des modifications au niveau de

leur partie hydrophile, il devient possible, en considérant que les interactions encapsulé-encapsulant restent inchangées, d'augmenter ce taux.

III. Vers d'autres types de lipides

Dans le but de simplifier au maximum le procédé d'obtention des CLP, nos efforts se sont ensuite tournés vers le développement d'autres types de lipides dotés de têtes polaires variées, ne portant pas de fonctions acide carboxylique, faciles à synthétiser et susceptibles de s'adsorber à la surface des nanotubes de carbone dans l'eau. En plus d'être photopolymérisables de part la présence d'un motif diacétylénique dans leur partie hydrophobe, tous ces lipides seront des dérivés de l'APCD. Dans ce paragraphe, seront tout d'abord présentées les synthèses de différents lipides de types anioniques, cationiques puis neutres. Une fois synthétisés, les propriétés d'adsorption de chacun de ces nouveaux lipides seront déterminées de façon systématique aussi bien dans le TRIS que dans l'eau.

III.1. Synthèse des nouveaux lipides

a – Lipides anioniques

Jusqu'à présent, la totalité des études présentées dans ce manuscrit ont traité de lipides anioniques comportant une ou plusieurs fonctions acide carboxylique. Cependant, il a été montré dans la littérature que le pKa de la fonction acide d'un acide gras, augmente lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente.^{162,163} De ce fait, il est possible que ces derniers ne soient pas chargés dans l'eau, ce qui explique leur manque de solubilité dans ce milieu. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au développement d'un lipide naturellement anionique comportant une tête sulfonate et dont la structure se rapproche de celle du SDS. Ce motif sulfonate a également été mis en avant lors d'études sur la formation de liposomes polymérisables¹⁶⁴ ou non.¹⁶⁵ Pour l'obtenir, une voie de synthèse en deux étapes a été envisagée. La première étape consiste en la réduction de l'APCD **4** en son alcool correspondant **15d**, lequel est ensuite mis en réaction avec le complexe triméthylamine – trioxyde de soufre pour donner le lipide 11,9-sulfonate **19** désiré (Schéma 4.4). Le rendement global de cette synthèse, égal à 74%, dépend uniquement de la seconde étape, la première étant *quasi* quantitative.

¹⁶² McLean D.S., Vercoe D., Stack K.R., Richardson D. *Appita J.* **58** 362-366 (2005)

¹⁶³ Kanicky J.R., Shah D.O. *Langmuir* **19** 2034-2038 (2003)

¹⁶⁴ Bruehl R.E., Dasgupta F., Katsumoto T.R., Tan J.H., Bertozzi C.R., Spevak W., Ahn D.J., Rosen S.D., Nagy J.O. *Biochemistry* **40** 5964-5974 (2001)

¹⁶⁵ Pütz G., Schmider W., Nitschke R., Kurz G., Blum H.E. *J. Lipid Res.* **46** 2325-2338 (2005)

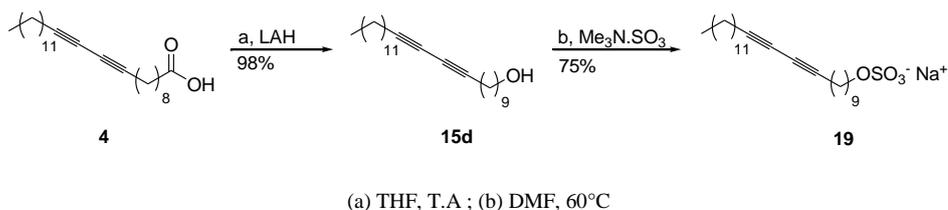
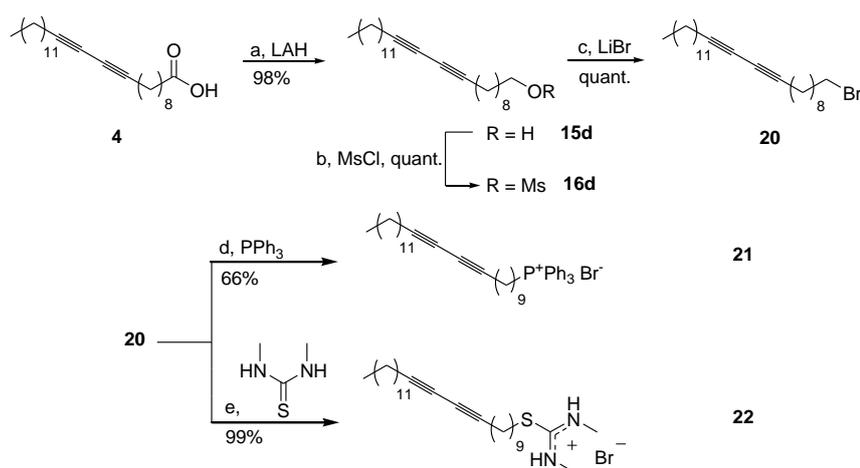


Schéma 4.4 : Voie de synthèses du lipide 11,9-sulfonate **19**

b – Lipides cationiques

La deuxième famille de composés à laquelle nous nous sommes intéressés est celle des lipides cationiques. Comme pour les lipides anioniques, elle se décompose en deux catégories : celle des composés naturellement chargés et celle des composés qui le deviennent en fonction du pH du milieu de solubilisation utilisé. Pour représenter la première catégorie, nous sommes focalisés sur la synthèse de lipides phosphonium et isothiuronium.¹⁶⁶ Celle-ci consiste à réduire l'APCD **4** en son alcool **15d** correspondant, lequel est activé par le chlorure de mésyle avant d'être bromé. Ces trois premières étapes permettent d'obtenir l'intermédiaire désiré avec un rendement global de 91 %. Ce dernier intermédiaire **20** est ensuite couplé avec les différentes parties polaires à savoir phosphonium et isothiuronium pour donner respectivement les lipides **21** et **22** avec des rendements globaux respectifs de 65% et 97% (Schéma 4.5).



(a) THF, T.A. ; (b) Et₃N, THF, T.A. ; (c) MeCN, reflux-T.A. ; (d) MeCN, reflux ; (e) THF, reflux

Schéma 4.5 : Voie de synthèse des lipides cationiques **21** et **22**

¹⁶⁶ Zhang G., Jin W., Fukushima T, Kosaka A., Ishii N., Aida T. *J. Am. Chem. Soc.* **129** 719-722 (2007)

Pour la seconde catégorie, sensible au pH, notre choix s'est porté sur un lipide déjà décrit dans la littérature et comportant une fonction amine primaire.¹⁶⁷ En ce qui concerne sa synthèse, celle-ci, beaucoup plus rapide (deux étapes) que celle des deux lipides cationiques précédents, repose sur la formation d'une liaison peptidique entre la chaîne grasse du lipide et sa tête polaire, comme cela est déjà le cas pour la synthèse du lipide 11,8-NTA. Ainsi, après avoir activé l'APCD par la NHS, l'intermédiaire **5** obtenu est mis en réaction avec l'éthylène-diamine pour donner le lipide 11,8-amine **23** avec un rendement global de 65% (Schéma 4.6).

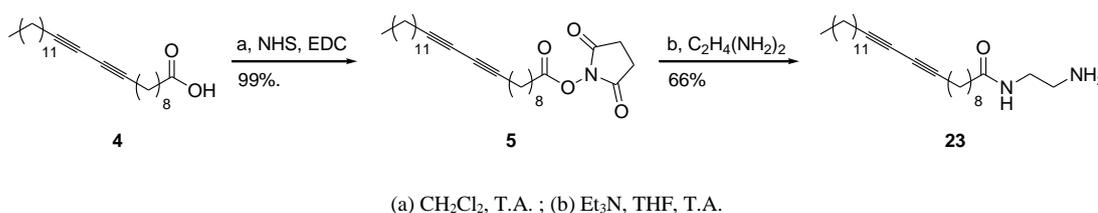


Schéma 4.6 : Voie de synthèse du lipide 11,8-amine **23**

c – Lipides neutres

La dernière famille de composés que nous avons étudiée a été celle des lipides neutres. Dans cette famille, nous nous sommes limités à l'utilisation de la fonction alcool en la déclinant sous plusieurs formes. A cet effet, un alcool, un diol, un triol et un PEG ont été synthétisés. En considérant le fait que la partie hydrophobe est constante, le nombre de fonctions alcool comprises dans la tête polaire peut jouer un rôle important au niveau de la balance hydrophile/hydrophobe du lipide et donc au niveau de l'étape d'adsorption à la surface des nanotubes. Notons que sur ces quatre lipides, les lipides alcool¹⁶⁷ et diol¹⁶⁸ sont déjà présentés dans la littérature. De plus, le motif PEG rappelle notamment les travaux de la littérature sur les micelles de polymères (Chapitre 1). Ce motif est également fréquemment ajouté aux lipides entrant dans la composition d'autres nanostructures pour en augmenter la stabilité en milieu aqueux et les rendre moins sensibles aux différentes attaques du système immunitaire.^{169,170}

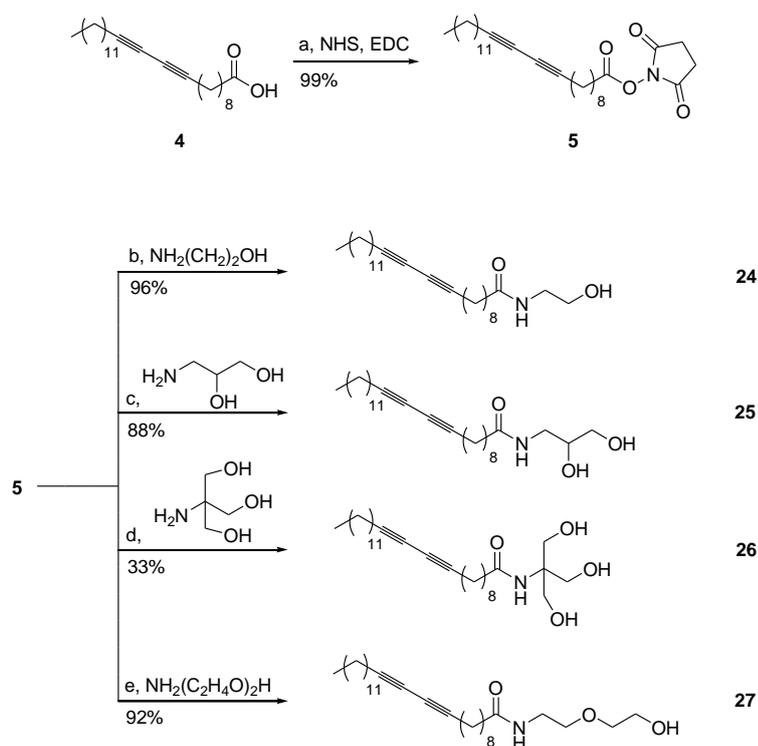
¹⁶⁷ Lee S.B., Koepsel R., Stolz D.B., Warriner H.E., Russell A.J. *J. Am. Chem. Soc.* **126** 13400-13405 (2004)

¹⁶⁸ Johnson S.J., Tillmann R.W., Saul T.A., Liu B.L., Kenney P.M., Daulton J.S., Gaub H.E., Ribic H.O. *Langmuir* **11** 1257-1260 (1995)

¹⁶⁹ Gref R, Minamitake Y, Peracchia M.T, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. *Science* **263** 1600-1603 (1994)

¹⁷⁰ Diaz-Lopez R., Tsapis N., Libong D., Chaminade P., Connan C., Chehimi M.M., Berti R., Taulier N., Urbach W., Nicolas V, Fattal E. *Biomaterials* **30** 1462-1472 (2009)

La synthèse de ces différents lipides a été faite en deux étapes (Schéma 4.7). La première, commune à chacun d'entre eux, consiste à activer l'APCD par la NHS. La seconde correspond au couplage peptidique de l'intermédiaire **5** formé avec les différentes amines. Les rendements globaux, sans optimisation, compris entre 33 et 96 %, dépendent uniquement de la deuxième étape puisque l'activation de l'acide est *quasi* quantitative.



(a) CH₂Cl₂, T.A. ; (b) Et₃N, THF, T.A. ; (c) Et₃N, THF, T.A. ; (d) Et₃N, DMF, T.A. ; (e) Et₃N, THF, T.A.

Schéma 4.7 : Synthèses des lipides neutres 24-27

III.2. Tests d'adsorption de ces lipides à la surface de nanotubes de carbone

Une fois les lipides synthétisés, la capacité de chacun d'entre eux à s'adsorber à la surface de nanotubes de carbone est étudiée de façon systématique. Notons que les nanotubes utilisés à cet effet sont des MWNTs du fournisseur n-Tec et que cette étude est également conduite sur le lipide 11,9-diacide **18d**. Les conditions expérimentales suivies à cet effet consistent à mettre en solution les lipides dans le TRIS (pH 8) ou l'eau (pH 5,5) à une concentration de 5 mg/ml en supposant qu'à cette concentration, la CMC de chacun des lipides est atteinte. Les nanotubes sont ensuite ajoutés à chaque échantillon en respectant un rapport massique

lipide/nanotubes de 1/4. Après avoir été soniqués trente minutes au bain à ultra-sons, les différents échantillons sont observés en MET sans purification supplémentaire (Tableau 4.5).

| Entrée | Lipide | Référence | Striations à la surface des nanotubes (TRIS) | Striations à la surface des nanotubes (eau) |
|--------|------------------|------------|--|---|
| 1 | 11,9-diacide | 18d | régulières | aucune |
| 2 | 11,9-sulfonate | 19 | régulières | régulières |
| 3 | 11,9-phosphonium | 21 | aucune | régulières |
| 4 | 11,9-thiuronium | 22 | aucune | régulières |
| 5 | 11,8-amine | 23 | régulières | régulières |
| 6 | 11,8-alcool | 24 | régulières | régulières |
| 7 | 11,8-diol | 25 | régulières | régulières |
| 8 | 11,8-triol | 26 | régulières | régulières |
| 9 | 11,8-PEG | 27 | régulières | régulières |

Tableau 4.5 : Adsorption des nouveaux lipides photo-polymérisables à la surface de MWNTs n-Tec

Pour chacun des lipides de type anionique (Entrées 1 et 2), des striations régulières sont observées lorsque le milieu de solubilisation utilisé est le TRIS. En revanche, ceci n'est plus vrai dans l'eau, où seul le lipide 11,9-sulfonate **19**, naturellement ionique, s'adsorbe correctement à la surface des MWNTs (Figure 4.3, gauche). Ce résultat est dû à la nécessité d'employer des solutions à caractère basique pour déprotonner et donc solubiliser les lipides contenant un motif acide carboxylique. L'utilisation d'une tête polaire sulfonate s'avère donc être un choix judicieux dans l'optique d'augmenter la gamme de solubilité des CLP en fonction du pH. Pour ce qui est des lipides de type cationique (Entrées 3-5), seul le lipide 11,8-amine **23**, initialement neutre, s'adsorbe sur les MWNTs aussi bien dans le TRIS que dans l'eau (Figure 4.3, milieu) alors que les trois autres ne présentent de bons résultats que dans l'eau. En effet, en considérant le pKa d'une amine primaire (~11), il est logique que le lipide 11,8-amine **23** se trouve sous sa forme protonné dans le TRIS (pH 8) et par conséquent dans l'eau (eau distillée pH 5,5). En revanche, aucune explication ne peut être donnée, à ce jour, pour comprendre le fait que les deux lipides naturellement chargés ne forment pas d'auto-arrangements hémi-micellaires dans le TRIS. Enfin, en ce qui concerne les lipides de type neutre constitués d'un motif contenant une ou plusieurs fonctions alcools (Entrées 6-9), la totalité d'entre eux s'adsorbe efficacement aussi bien dans le TRIS que dans l'eau (Figure 4.2, droite).

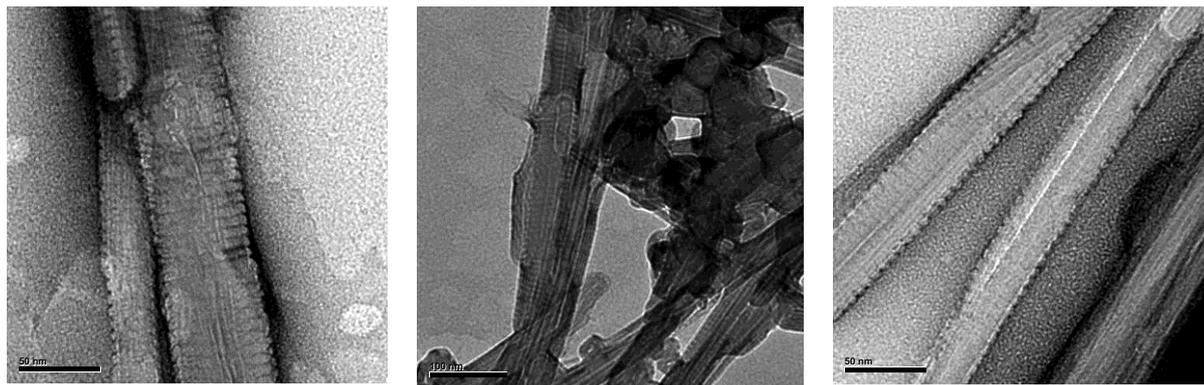


Figure 4.2 : Images MET de MWNTs n-Tec couverts de nouveaux lipides photo-polymérisables : 11,9-sulfonate **19** (gauche) ; 11,8-amine **23** (milieu) ; 11,8-alcool **24** (droite)

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons apporté plusieurs alternatives au lipide 11,8-NTA. Dans un premier temps, une étude sur l'importance du nombre de fonctions acide carboxylique contenues dans la partie hydrophile, nous a conduits à l'élaboration d'un nouveau lipide, le 11,9-diacide **18d**, dont les propriétés d'adsorption à la surface de nanotubes de carbone se sont avérées similaires à celle du lipide 11,8-NTA. Cependant, sa synthèse en quatre étapes avec un rendement global de 71% ainsi que l'obligation d'utiliser une solution aqueuse tamponnée à pH basique n'en font pas une alternative de premier choix. Nous avons donc poursuivi par le développement de nouveaux lipides, tous dérivés de l'APCD et comportant des têtes polaires variées de type anionique, cationique et neutre, susceptibles d'être solubles dans l'eau. Par des voies de synthèses relativement simples comprises entre deux et quatre étapes, 8 lipides ont été obtenus. Le comportement de tous ces lipides a ensuite été étudié en présence de nanotubes de carbone aussi bien dans une solution aqueuse basique (TRIS pH 8) que dans l'eau. La totalité de ces lipides a montré des résultats d'adsorption très encourageants selon les conditions. Néanmoins, en combinant tous les critères favorables à la production en grosse quantité de CLP pour un usage dans le domaine cosmétique à savoir le coût des matières premières (nous nous limiterons au coût de la partie hydrophile, la partie hydrophobe étant constante), la voie de synthèse et le poids moléculaire, et en ne tenant compte que des lipides capables de s'adsorber à la surface de nanotubes de carbone dans l'eau (Tableau 4.6), il semblerait que les lipides 11,8-amine **23** et 11,8-alcool **24** soient favorisés (Entrées 5 et 6). Rappelons que, pour tous les lipides dont la synthèse est basée sur le couplage peptidique de l'APCD, les deux étapes nécessaires à l'obtention des différents lipides peuvent se faire dans

le même pot, rendant ces derniers encore plus attractifs d'un point de vue industriel. Néanmoins, cela n'empêche pas pour autant d'envisager l'exploitation des autres lipides à des fins différentes. Notons également que tous les prix donnés sont les prix catalogues, et que les rendements des différentes synthèses n'ont pas fait l'objet d'études d'optimisation. Ces deux paramètres peuvent donc encore être améliorés.

| Entrée | Lipide | Référence | Poids moléculaire (g/mol) | Coût de la partie hydrophile en € (pour 1 kg) | Synthèse (nombre d'étapes / rendement) |
|--------|---------------------|-----------|---------------------------|---|--|
| 1 | 11,8-NTA | 6 | 618,86 | 65K | 2 / 90% |
| 2 | 11,9-sulfonate | 19 | 462,67 | 400 | 2 / 74% |
| 3 | 11,9-phosphonium | 21 | 685,82 | 78 | 4 / 65% |
| 4 | 11,9-isothiouronium | 22 | 527,70 | 30 | 4 / 97% |
| 5 | 11,8-amine | 23 | 416,69 | 30 | 2 / 65% |
| 6 | 11,8-alcool | 24 | 417,68 | 37 | 2 / 95% |
| 7 | 11,8-diol | 25 | 501,71 | 1K | 2 / 87% |
| 8 | 11,8-triol | 26 | 477,73 | 76 | 2 / 33% |
| 9 | 11,8-PEG | 27 | 461,73 | 200 | 2 / 91% |

Tableau 4.6 : Tableau récapitulatif

Malheureusement, le projet n'a pu être poursuivi jusqu'à l'obtention de nouvelles CLP. Bien que les auto-arrangements observés y soient favorables, aucune certitude ne peut être apportée quant à l'étape de polymérisation de ces différents lipides. Celle-ci étant topochemique, la distance séparant les motifs diacétyléniques de deux lipides voisins est très importante et peut changer selon la nature de la tête polaire à cause d'encombrements stériques ou autres effets de charges. Notons tout de même que les lipides 11,9-diacide **18d** et 11,8-PEG **27** font actuellement l'objet de nouveaux projets au sein du laboratoire.

Conclusion générale

Que ce soit dans les domaines pharmaceutiques ou cosmétiques, la solubilisation de molécules hydrophobes en milieu aqueux représente un enjeu considérable. Plusieurs systèmes (micelles de polymères ou liposomes) ou techniques (émulsion) sont très exploités à ce jour dans la formulation de médicaments ou de produits cosmétiques. Dans cette optique, ce travail de thèse a été axé sur la conception d'un nouveau système, des constructions lipidiques polymérisées (CLP), puis sur l'étude de leur comportement en présence de molécules hydrophobes en milieu aqueux.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons présenté trois procédés élaborés dans le but de produire des CLP (Tableau 1).

| Procédé | Adsorption | | | SDS | Purification ^a | Polymérisation ^a |
|---------|-----------------|--------------------|--------------------|-----|---------------------------|-----------------------------|
| | Conc. en lipide | Conc. en nanotubes | Type de nanotubes | | | |
| 1 | 1 mg/ml | 1 mg/ml | SWNTs MER Corp. | 1 % | dialyse + centrifugation | UV (12 W, 254 nm, 1h) |
| 2 | 5 mg/ml | 5 mg/ml | MWNTs n-Tec | / | dialyse | UV (12 W, 254 nm, 1h) |
| 3 | 5 mg/ml | 20 mg/ml | MWNTs n-Tec | / | ultra-centrifugation | UV (48 W, 254 nm, 4h) |

| Procédé | Extraction | Récupération | Résultats | |
|---------|------------------|---------------------------------|-----------|------------------------|
| | | | Rendement | Taille moyenne des CLP |
| 1 | électrophorèse | précipitation à l'acide, lyoph. | 20% | 10 nm |
| 2 | ultra-sonication | précipitation à l'acide, lyoph | 75% | 22 nm |
| 3 | ultra-sonication | précipitation à l'acide, lyoph | 10% | 25 nm |

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour les trois procédés développés au cours de cette thèse (^a ces étapes sont inversées lors des procédés 2 et 3)

Chacun d'entre eux repose sur deux étapes clés qui sont l'adsorption d'un lipide photopolymérisable, le 11,8-NTA, à la surface de nanotubes de carbone, et l'extraction des auto-arrangements hémi-micellaires formés. A cet effet, plusieurs conditions et technologies ont

été testées : les versions optimisées de ces trois procédés sont reportées dans le tableau récapitulatif précédent. Notons tout de même que la principale innovation apportée au cours de ce projet a été l'utilisation des ultra-sons lors de l'étape d'extraction en lieu et place de l'électrophorèse, utilisée dans le procédé initial.

Les deux premiers procédés ont permis la synthèse de lots de CLP de composition différente. En effet, le procédé 1 a fourni, dans un premier temps, des CLP de grande pureté mais dans de faibles quantités. Pour palier ce problème, nous avons ensuite élaboré le procédé 2 qui pour sa part a permis d'obtenir des quantités plus importantes de nano-objets (de l'ordre du gramme) mais avec un degré de pureté moindre du fait d'une étape de purification moins efficace. Enfin, le procédé 3 a quant à lui été mis au point dans le but de combiner les points positifs des deux procédés précédents et est toujours en cours de développement au sein du laboratoire.

Le comportement des CLP issues des procédés 1 et 2 vis-à-vis de molécules hydrophobes en milieu aqueux a ensuite été étudié dans une seconde partie. Parmi elles se trouvent les C₆₀, intéressants pour leur géométrie et leur composition identique à celle des nanotubes de carbone ainsi que deux protéines membranaires (FecA et FpvA). Chacune de ces molécules nous a permis de conclure sur la capacité des CLP à solubiliser des molécules hydrophobes en milieu aqueux et de façon concentration dépendante. D'autres informations ont également été apportées selon le composé solubilisé. Avec les C₆₀, nous avons montré que la structure des CLP pouvait se détendre pour envelopper des cristaux de fullerènes dont la taille est supérieure à celle de leur cavité. Par le biais des deux protéines, nous avons démontré, grâce à une étude de FRET, que leur solubilisation par ces nouveaux nano-objets ne les dénaturait pas et qu'elles conservaient leurs propriétés. Enfin, les résultats préliminaires obtenus avec un autre type de molécule hydrophobe, l'acide bétulinique, ont prouvé que ce dernier, une fois solubilisé, conservait ses propriétés biologiques *in vivo*. Cependant, cette étude est toujours en cours pour justifier l'intérêt d'utiliser des CLP par rapport à d'autres systèmes de solubilisation tels que les cyclodextrines.

Nous nous sommes ensuite intéressés à deux composés d'intérêts cosmétiques à savoir un pigment (le RED30) et un filtre UV (l'OMC). Nous avons commencé par effectuer un test de solubilisation du RED30 afin de comparer les propriétés de solubilisation des CLP par rapport à celle du lipide 11,8-NTA, sous forme de micelles ou non. Puis, par le biais d'une étude avec l'OMC, nous avons été en mesure de déterminer un taux d'encapsulation de l'ordre de 50%, faisant des CLP un bon système de solubilisation.

Finalement, nous avons mis en évidence la première fonctionnalisation des CLP par du diiode dans le but d'une utilisation en tant qu'agent de contraste. Les premiers résultats ont été encourageants et sont à l'origine d'une étude plus approfondie dans le but d'augmenter les concentrations de diiode greffées aux CLP.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons cherché à modifier la nature du lipide à l'origine des CLP dans le but de diminuer leur coût de production final, de simplifier leurs conditions d'utilisation, et de diversifier leurs domaines d'application. Pour cela, nous avons tout d'abord effectué une étude sur l'importance du nombre de fonctions acide carboxylique contenues dans la partie polaire du lipide en développant des lipides saturés et photo-polymérisables à base de monoacides puis de diacides. Après avoir démontré que ces structures s'adsorbent à la surface de nanotubes de carbone, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nouveaux types de lipides photo-polymérisables, tous dérivés de l'APCD, et dont les têtes polaires peuvent être anioniques, cationiques ou neutres. Le plus gros avantage de ces nouveaux lipides est pour la plupart d'entre eux leur coût de revient qui est nettement inférieur à celui du 11,8-NTA ainsi que leur bonne propriété d'adsorption dans l'eau. Des études complémentaires quant à leur capacité à fournir des CLP sont prévues.

Suite aux différents résultats obtenus au cours de ce projet, d'autres applications ont été envisagées pour les CLP. En effet, deux nouveaux exemples de fonctionnalisation de ces dernières sont en cours au sein du laboratoire. Le premier consiste à insérer un motif alcyne en bout de chaîne grasse (dans la cavité des CLP) pour permettre le couplage de celui-ci avec des motifs azides. Le second correspond, quant à lui, à la fonctionnalisation de la partie polaire des CLP par insertion d'une sonde fluorescente. De plus, de part la fonctionnalisation non-covalente de nanotubes de carbone par des lipides au caractère ionique varié tels que ceux présentés dans le chapitre 4, il devient possible d'apporter des solutions quant à la solubilisation de ces mêmes nanotubes dans différents milieux. Ceci a pour conséquence de pouvoir envisager, avec des motifs polymérisables au niveau des parties hydrophiles, d'envisager l'utilisation de nanotubes de carbone recouverts d'arrangements lipidiques en tant que renforcement de matériaux en permettant la dispersion homogène de ces objets dans la matrice polymérique du matériau tout en conservant les propriétés mécaniques des nanotubes.

Partie expérimentale

Solvants et réactifs

Les réactions ont été effectuées sous argon désoxygéné et sec (Argon 4.5), en utilisant une agitation magnétique. Pour toutes les expériences nécessitant des conditions anhydres, la verrerie ainsi que le barreau aimanté ont été flambés au décapeur thermique sous vide. Tous les réactifs, ainsi que les nanotubes de carbone ont été utilisés, sauf indication contraire, sans purification préalable. Pour ce qui est des nanotubes, les SWNTs utilisés proviennent du fournisseur MER Corporation, les MWNTs proviennent du fournisseur n-Tec.

Pour les manipulations nécessitant des conditions anhydres, les solvants employés ont été préalablement séchés ou distillés :

L'éther diéthylique et le tétrahydrofurane ont été distillés sur sodium et benzophénone sous atmosphère d'argon.

Le dichlorométhane a été lavé trois fois à l'eau osmosée, séché sur chlorure de calcium, et distillé sur hydrure de calcium sous atmosphère d'argon.

L'acétonitrile a été distillé sur hydrure de calcium sous atmosphère d'argon.

Le benzène, le toluène et la triéthylamine étaient conservés sous atmosphère d'argon et sur fil de sodium.

Le diméthylsulfoxyde, le *N,N*-diméthylformamide, le méthanol, l'éthanol et le chloroforme étaient stockés sous atmosphère d'argon sur tamis moléculaire 3 Angström, préalablement activé par chauffage à 200 °C sous vide pendant 12 heures.

L'eau utilisée pour les traitements a été purifiée par osmose inverse.

Matériel et méthodes d'analyse

Les chromatographies sur gel de silice consistent en des colonnes de gel de silice 60 Merck (réf. : 9835) de granulométrie 40 à 63 μm et ont été réalisées à pression atmosphérique.

Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de gel de silice 60 F254 Merck (réf. : 5715), d'épaisseur 0,25 mm. La révélation des plaques a été réalisée par traitement avec un révélateur (vanilline, anisaldéhyde, le 2,6-dichlorophénolindophénolate de sodium (DCIP) et sulfate de cérium) suivi d'un chauffage à 200 °C. Pour chacun des produits isolés, le rapport frontal (Rf) est indiqué, suivi de la composition de l'éluant et de la nature du révélateur utilisé.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés soit sur un spectromètre Bruker Avance 200, soit sur un spectromètre Bruker Avance 300, soit sur un spectromètre Bruker AvanceIII 400 à transformée de Fourier. Les spectromètres sont équipés soit d'une sonde $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, soit d'une sonde large bande à détection inverse et gradient-z 5 mm. Les fréquences d'irradiation sont respectivement de 200, 300 et 400 MHz pour le noyau ^1H et de 50, 75, 100 pour le noyau ^{13}C . Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplages J en Hertz (Hz). Les multiplicités des signaux sont indiquées à l'aide des abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), td (triplet dédoublé), m (multiplet).

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés sur un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer 2000 FT-IR. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées à l'IFR85 de l'Université de Strasbourg.

Les étapes de sonication ont été effectuées avec un bain à ultra-sons Bandelin Sonorex, RK100H à une puissance de 80 W.

Les étapes d'ultra-sonication ont été effectuées à l'aide d'un doigt à soniquer Bioblock Scientific, VibraCell (mode pulse 9,9s on – 5s off ; sonde 72412).

Les étapes de dialyse ont été effectuées en utilisant des membranes de dialyse Por®Dialysis (cutoff : 25000 MW) contre du TRIS et sous agitation magnétique. De manière générale, le TRIS (TRIS 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8) est préparé en solubilisant 24,29 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane et 17,56 g de chlorure de sodium dans 2 l d'eau distillée puis en ajustant le pH de la solution à pH 8 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée.

Les étapes de centrifugation ont été effectuées avec une centrifugeuse Br4i JOUAN dans un rotor fixe AB1.14 à 3000×g ou un rotor mobile S40 à 14000×g ainsi qu'avec une ultracentrifugeuse Kontron, Centrikon T-2060 dans un rotor mobile TST.28-38 à 90000×g.

Les étapes d'irradiation ont été effectuées à l'aide d'une lampe UV (12 W, 254 nm, Fischer Bioblock) ou d'une enceinte UV (48 W, 254 nm, Cross-Linker Bio-Link 254, Fischer Bioblock).

Les observations en MET ont été effectuées avec un microscope Philips CM 120 dont la tension d'accélération des électrons est de 100 kV. 10 µl de solution ont été déposés sur une grille en cuivre/rhodium 300 mesh recouvertes de carbone, laquelle est préalablement ionisée sous vide (10^{-1} torr) pendant 30 sec, puis incubés pendant 1 min. Le dépôt est ensuite coloré négativement en éliminant la goutte de solution sur la grille à l'aide d'un papier absorbant et en remplaçant par 10 µl d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle (2%). Après 2 min d'incubation, l'acétate d'uranyle est éliminé par un papier absorbant et la grille est séchée à l'air avant analyse.

Les mesures granulométriques par diffraction dynamique de la lumière ont été effectuées sur des échantillons en solution dans le TRIS avec un appareil Nano-ZS Malvern.

Les analyses de spectrophotométrie UV-visible ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio (Varian) entre 200 et 800 nm et dans des cuves en quartz.

Résultats expérimentaux

Choix des nanotubes

A 0,9 ml d'une solution de 1 mg de lipide 11,8-NTA dans le TRIS sont ajoutés 1 mg de nanotubes de carbone et 0,1 ml d'une solution de SDS à 10%. Le milieu est soniqué 30 min au bain à ultra-sons puis observé en MET.

Procédé 1 de synthèse des CLP

A une solution de 8 mg de lipide 11,8-NTA dans 8 ml d'une solution tampon aqueuse de TRIS contenant 1% massique de SDS sont ajoutés 8 mg de SWNTs MER Corp. Le milieu est soniqué 30 min dans un bain à ultra-sons. Après sept dialyses de 12h contre du tampon TRIS, la solution est centrifugée 10 min à 14000×g puis le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon TRIS puis à nouveau centrifugé 10 min à 14000×g. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon TRIS puis irradié 1h sous une lampe UV (12 W, 254 nm). La suspension homogène est déposée sur un gel d'agarose à 0,25% dans une solution tampon de TRIS-glycine (TRIS 25 mM, glycine 185 mM, pH 8) contenant 1% massique de SDS puis un courant de 64 V et 30 mA est appliqué pendant 90 min. Une portion du gel est ensuite incubée une nuit dans une solution aqueuse de chlorure de nickel (II) à 1% afin de révéler les CLP. La partie de gel non-incubé contenant les CLP est électroéluée avec un courant de 64 mV et de 30 mA pendant 60 min en utilisant comme électrolyte la même solution tampon de TRIS-glycine. Un courant inverse est ensuite appliqué pendant 30 sec dans le but de détacher les CLP "collées" sur la membrane. La solution de CLP obtenue est dialysée 7 fois 12h contre du tampon TRIS puis acidifiée par 3 gouttes d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée jusqu'à obtention d'un précipité (pH < 1). Celui-ci est filtré puis lyophilisé pour donner 1,6 mg de CLP sous la forme d'un solide (Rdt global : 20%).

Procédé 2 de synthèse des CLP

A une solution de 500 mg de lipide 11,8-NTA dans 100 mL d'une solution tampon aqueuse de TRIS sont ajoutés 500 mg de MWNTs. Le milieu est soniqué 30 min au bain à ultra-sons, dialysé 8 fois 12h contre 2 l de tampon TRIS puis irradié 1h sous une lampe UV (12 W, 254 nm). 50 ml de cette préparation sont ultra-soniqués 2h dans un bain de glace, à une puissance de 240 W à l'aide d'un doigt à ultra-sons et en présence de 50 ml d'Et₂O. La phase

organique est évaporée puis la phase aqueuse est ultra-centrifugée 1h à 90000×g. Le surnageant est isolé puis ultra-centrifugé une seconde fois 1h à 90000×g. Le surnageant est de nouveau isolé et acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée au goutte à goutte tant que le phénomène de précipitation est observé (pH < 1). Après une étape de centrifugation de 10 min à 3000×g le précipité est séparé du surnageant, lavé à l'eau (30 ml), centrifugé 10 min à 3000×g (ce cycle de lavage est répété 3 fois) puis séché au lyophilisateur pour donner 0,190 g de produit désiré sous la forme d'un solide (Rdt : 76%).

Etude sur le rapport lipide/nanotubes (Procédé 3)

1 ; 3 ; 5 et 10 mg de lipide 11,8-NTA sont solubilisés dans 1 ml de TRIS. Les différents échantillons sont irradiés 5h40 dans une enceinte UV (48 W ; 254 nm) puis analysés en spectrophotométrie UV-visible à 353 nm. Cette analyse permet de calculer un coefficient d'extinction molaire de $0,5793 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ ($R^2 : 0,988$).

Procédé 3 de synthèse des CLP

A une solution de 500 mg de lipide 11,8-NTA dans 100 ml d'une solution tampon aqueuse de TRIS sont ajoutés 2 g de MWNTs (n-Tec). Le milieu est soniqué 30 min dans un bain à ultrasons, irradié 4h dans une enceinte UV (48W, 254 nm), puis purifié par 3 cycles d'ultra-centrifugation à 90000×g en remplaçant, à chaque fois, le surnageant par le même volume d'une solution tampon aqueuse de TRIS. 2 ml de cette solution de nanotubes couverts d'anneaux sont ultra-soniqués 30 min, à une puissance de 100 W à l'aide d'un doigt à ultrasons en présence de 2 ml d'éther diisopropylique. La phase organique est évaporée puis le milieu est centrifugé 10 min à 14000×g. La phase aqueuse est isolée des nanotubes restés dans le culot puis est acidifiée par 2 gouttes d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée jusqu'à la formation d'un précipité (pH < 1), lequel est extrait trois fois avec 2 ml de chloroforme. Les phases organiques combinées sont concentrées et séchées sous vide pur donner 0,5 mg de CLP sous la forme d'un solide (Rdt global : 10%).

Solubilisation des fullerènes C₆₀

0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 3 mg de CLP telles qu'obtenues au procédé 1 sont solubilisés dans 2 ml de TRIS. A 1 ml de chaque solution sont ajoutés 3 mg de fullerènes C₆₀. Les milieux sont

soniqués 4h au bain à ultra-sons puis centrifugé 10 min à 14000×g. Les surnageants contenant les complexes C₆₀/CLP sont isolés.

Solubilisation de FecA

Des solutions de FecA (0,1 mg/ml) et de CLP telles qu'obtenues au procédé 1 à des concentrations de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 et 1,2 mg/ml dans 50 µl de tampon TRIS (TRIS 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) contenant 1% d'octyl-POE sont laissées 1h à température ambiante. Un excès de Biobeads SM2 est ajouté pour absorber l'octyl-POE. Après une nuit à 4°C plus de Biobeads SM2 sont ajoutés en deux portions. Après 5h à température ambiante, les Biobeads SM2 sont éliminer et la matière non solubilisée est centrifugée 15 min à 14000×g. La concentration en FecA présente dans le surnageant est déterminer par un tes Biuret BCA en utilisant comme standard de l'albumine sérique bovine.

Solubilisation de FpvA

56 µl d'une solution de référence de FpvA (0,36 mg/ml) dans du tampon TRIS (TRIS 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) contenant 1% d'octyl-POE est préparée. 56 µl d'une solution de FpvA(0,36 mg/ml)/CLP (1,34 mg/ml) dans du tampon TRIS (TRIS 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) contenant 1% d'octyl-POE est laissée 1h à température ambiante. Un excès de Biobeads SM2 est ajouté pour absorber l'octyl-POE. Après une nuit à 4°C plus de Biobeads SM2 sont ajoutés en deux portions. Après 5h à température ambiante, les Biobeads SM2 sont éliminer et la matière non solubilisée est centrifugée 15 min à 14000×g. Le surnageant contenant les complexes FpvA/CLP en solution est conservé.

Les solutions de référence et complexe FpvA/CLP sont diluées avec du tampon TRIS (20 mM, pH 8) contenant 1% d'octyl-POE pour atteindre un volume finale de 1 ml. Les spectres de fluorescence des deux solutions diluées sont enregistrés entre 310 et 450 nm (excitation à 290 nm).

1 ml de pyoverdine.gadolinium (300mM) est ajouté à chaque solution diluée mentionnée ci-dessus. Après 5 min à température ambiante, le signal de FRET est mesuré par fluorescence entre 310 et 450 nm (excitation à 290 nm).

Solubilisation du RED30

5 mg de CLP telles qu'obtenues au procédé 2.1 sont solubilisés dans 5 ml de TRIS. A 1 ml de cette solution sont ajoutés 3 mg de RED30. Le milieu est soniqué 8h au bain à ultra-sons puis centrifugé 10 min à 14000×g. Le surnageant contenant les complexes RED30/CLP sont isolés.

Solubilisation d'OMC

5 mg de CLP telles qu'obtenues au procédé 2.1 sont solubilisés dans 5 ml de TRIS. A cette solution sont ajoutés 15 µl d'OMC. Le milieu est soniqué 5 min au bain à ultra-sons puis l'excès d'OMC non solubilisé est extrait 4 fois avec 5 ml de cyclohexane. La dernière phase aqueuse contenant les complexes OMC/CLP est isolée.

Solubilisation d'acide bétulinique

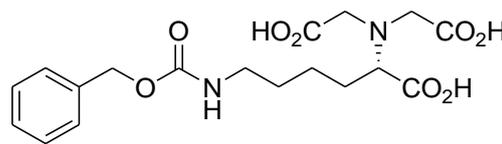
5 mg de CLP telles qu'obtenues au procédé 2.2 sont solubilisés dans 5 ml de milieu de culture (DMEM + 0,1% BSA, pH 7,0-7,4). A 1,5 ml de cette solution sont ajoutés 0,75 ; 1,5 et 4,5 mg d'acide bétulinique. Les différents échantillons sont ultra-soniqués 15 min puis filtrés sur coton. Le filtrat est isolé.

La concentration d'acide bétulinique dans les différents échantillons est déterminée par CLHP (colonne : Zorbac 300SB C18 ; méthode : H₂O(+ TFA 0,1%)/MeCN 20:80 ; débit : 1 ml/min). Une droite d'étalonnage est tracée en analysant par CLHP des échantillons de solution d'acide bétulinique dans le MeOH dans une gamme de concentration allant de 0,25 à 3 mg/ml. La pente de cette droite, permettant de convertir les aires observées sur les spectres en concentration (g/l), est de $5,33 \times 10^{-7}$ ($R^2 : 0,9980$).

***N*-benzyloxycarbonyl *N,N'*-bis(carboxymethyl)-
L-lysine (**2**)**

C₁₈H₂₄N₂O₈

M = 396,40 g/mol



A 75 ml d'une solution de 19,8 g d'acide bromoacétique (142,7 mmol, 4 eq) dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2M refroidie à 0°C sont ajoutés au goutte à goutte 10 g de *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine (35,7 mmol, 1 eq) dans 25 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2M. Après 2h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 12h puis refroidi à 0°C et acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique concentrée jusqu'à formation d'un précipité (pH < 1). Celui-ci est filtré puis lyophilisé pour donner 9,5 g du produit désiré **2** sous la forme d'un solide blanc (Rdt = 67%).

Rf : 0,10 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; DCIP)

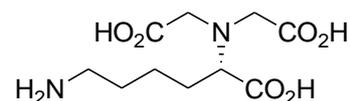
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,34 (m, 5H), 7,21 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 5,0 (s, 2H), 3,46-3,40 (m, 4H), 3,32 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 2,96 (td, *J*₁ = 6,1 Hz, *J*₂ = 5,2 Hz, 2H), 1,70-1,20 (m, 6H)

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 175,4 ; 174,7 ; 157,5 ; 138,7 ; 134,4 ; 129,7 ; 129,1 ; 66,5 ; 54,8 ; 41,5 ; 30,7 ; 30,5 ; 24,4

***N,N'*-bis(carboxyméthyle)-L-lysine hydratée (**3**)**

C₁₀H₁₈N₂O₆

M = 262,26 g/mol



A une solution de 4,0 g de **2** (10,1 mmol, 1 eq) dans 150 ml de MeOH sont ajoutés 8 ml d'acide formique puis 0,3 g de palladium sur charbon activé (10 %) en plusieurs fois. Le milieu réactionnel est purgé quatre fois avec de l'hydrogène et agité 12h à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène. Le précipité obtenu est filtré sur cellite, lavé 2 fois avec 50 ml de MeOH, repris dans 150 ml d'eau distillée et filtré à nouveau pour éliminer le catalyseur. La phase aqueuse est lyophilisée pour donner 2,0 g du produit désiré **3** sous la forme d'un solide blanc (Rdt = 76%).

Rf : 0,11 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; DCIP)

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 4,17 (s, 4H), 4,14 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,24 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,30-2,05 (m, 2H), 2,05-1,85 (m, 2H), 1,95-1,70 (m, 2H)

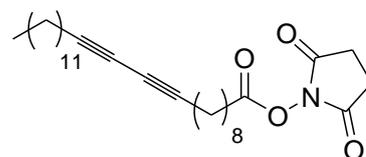
RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) δ 172,4 ; 170,7 ; 67,9 ; 55,4 ; 39,5 ; 26,9 ; 26,5 ; 23,4

SM (ESI) m/z : 263 [M+H]⁺

Ester 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque (5)

C₂₉H₄₅NO₄

M = 471,68 g/mol



A 120 ml d'une solution de 2,00 g d'acide 10,12-pentacosadiynoïque (5,34 mmol, 1 eq) dans CH₂Cl₂ sont ajoutés 0,80 g de *N*-hydroxysuccinimide (6,94 mmol, 1,3 eq) puis 1,33 g d'hydrochlorure de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (6,94 mmol, 1,3 eq). Après 4h d'agitation à température ambiante, 60 ml d'eau sont ajoutés puis le milieu réactionnel est extrait 3 fois avec 30 ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques combinées sont lavées 2 fois avec 100 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 2,48 g du produit désiré **5** sous la forme d'un solide blanc (Rdt = 99%).

Rf : 0,48 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 2,83 (s, 4H), 2,60 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,74 (td, *J*₁ = 7,2 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 2H), 1,60-1,20 (m, 30H), 0,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H)

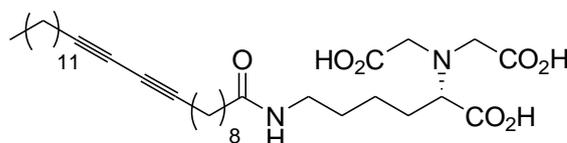
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168,9 ; 168,3 ; 76,4 ; 65,0 ; 64,9 ; 31,6 ; 30,5 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,8 ; 28,5 ; 28,4 ; 28,3 ; 28,0 ; 27,9 ; 25,2 ; 24,2 ; 22,3 ; 18,8 ; 13,8

SM (ESI) m/z : 472 [M+H]⁺

11,8-NTA (6)

C₃₅H₅₈N₂O₇

M = 618,86 g/mol



A 20 ml d'une solution de 2,48 g de **5** (5,26 mmol, 1 eq) dans la DMF sont ajoutées une solution de 1,38 g de **3** (5,26 mmol, 1 eq) dans 20 ml de DMF et quelques gouttes d'eau puis 5,10 ml de triéthylamine (36,81 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 19h à température ambiante, concentré à l'aide d'un Hickman, repris dans 20 ml l'eau, acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à formation d'un précipité (pH < 1). Celui-ci est purifié par 3 cycles de centrifugation pendant 15 min à 3000×g, élimination du surnageant et lavage avec 20 ml d'eau. Enfin, le précipité est lyophilisé pour donner 2,94 g du produit désiré **6** sous la forme d'un solide blanc (Rdt = 90%).

Rf : 0 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ 3,23 (s, 2H), 3,21 (s, 2H), 3,02 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 2,79 (s, 2H), 1,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,78 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 1,43 (s, 1H), 1,30-0,80 (m, 38H), 0,50 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ 176,4 ; 176,3 ; 176,2 ; 174,6 ; 79,1 ; 67,1 ; 66,6 ; 56,3 ; 48,0 ; 40,4 ; 37,7 ; 33,3 ; 30,9 ; 29,7 ; 26,6 ; 25,1 ; 24,0 ; 20,3 ; 15,2

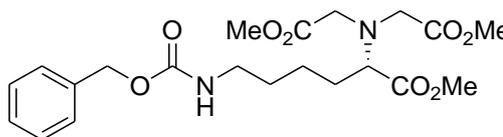
IR : 3289,0 ; 2926,3 ; 2854,3 ; 1731,9 ; 1646,0 ; 1557,9 ; 1465,8 ; 1426,6 ; 1377,4 ; 1253,9

SM (ESI) *m/z* : 617 [M-H]⁺

***N*-benzyloxycarbonyl *N,N'*-bis(méthyléthanoate)-
L-lysine méthyl (**8**)**

C₂₁H₃₀N₂O₈

M = 438,48 g/mol



A une suspension contenant 1,50 g de lysine (4,53 mmol, 1 eq) dans 10 ml de MeCN sont ajoutés 3,16 ml de DIPEA (18,14 mmol, 4 eq) puis 1,29 ml de bromoacétate de méthyle (13,60 mmol, 3 eq). Le milieu réactionnel est porté à reflux, agité 44h à reflux et amené à température ambiante. 10 ml d'une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés et le milieu est extrait trois fois avec 10 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées avec 30 ml d'une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/AE 9:1) pour donner 1,92 g de produit désiré **8** sous la forme d'une huile orange (Rdt = 97%).

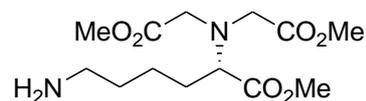
Rf : 0,60 (CH₂Cl₂/AE 9:1 ; DCIP)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,35-7,29 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,92 (s, 1H), 3,69 (s, 9H), 3,62 (s, 4H), 3,41 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,18 (m, 2H), 1,72-1,34 (m, 6H)

***N,N'*-bis(carboxyméthyle)-L-lysine méthyle (**9**)**

C₁₃H₂₄N₂O₆

M = 304,34 g/mol



A 12 ml d'une solution de 1,92 g de **8** (438 mmol, 1 eq) dans MeOH sont ajoutés 0,48 ml (d'acide formique puis 0,40 g de palladium sur charbon activé (10 %) en plusieurs fois. Le milieu réactionnel est purgé 4 fois avec de l'hydrogène et agité 19h à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène. Le précipité obtenu est filtré sur cellite, lavé 2 fois avec 10 ml de MeOH et le filtrat est concentré. Le produit brut est repris dans une solution aqueuse

saturée en bicarbonate de potassium et extrait 3 fois avec 5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 1,32 g de produit désiré **9** (Rdt : 99%).

Rf : 0,17 (CH₂Cl₂/AE 9:1 ; DCIP)

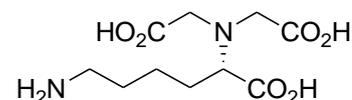
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,68 (s, 9H), 3,64 (s, 4H), 3,41 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 2,68 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,72-1,32 (m, 6H)

SM (ESI) *m/z* : 617 [M+H]⁺

***N,N'*-bis(carboxyméthyle)-L-lysine hydratée (**3**)**

C₁₀H₁₈N₂O₆

M = 262,26 g/mol

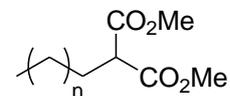


A 4 ml d'une solution de 100 mg de **9** (0,33 mmol, 1 eq) dans un mélange MeOH/THF est ajoutée au goutte à goutte 1 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 1M (1 mmol, 3 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF 1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 2 jours à température ambiante puis 5 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec 5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 15 ml d'eau puis avec 15 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner 84 mg de produit désiré **3** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 98%).

Rf : 0,13 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; DCIP)

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 4,16 (s, 4H), 4,13 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,23 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,30-2,05 (m, 2H), 2,05-1,85 (m, 2H), 1,95-1,70 (m, 2H)

Procédure général de synthèse des intermédiaires malonates saturés (11**)¹⁷¹**



A une suspension d'hydrure de sodium (60%) (1,3 eq) dans le THF est ajouté au goutte à goutte le malonate de diméthyle (1,4 eq). Le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante avant d'ajouter une solution de bromoalcane (1 eq) dans le THF. Le milieu réactionnel est ensuite agité 1h à température ambiante puis 5h à reflux. De l'eau est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de

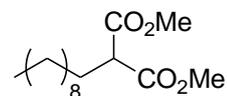
¹⁷¹ Ma S., Xu B., Ni B. *J. Org. Chem.* **25** 8532-8543 (2000)

magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 1:0 puis 98:2) pour donner le produit désiré **11**.

2-Décylmalonate de diméthyle (11a)

$C_{15}H_{28}O_4$

$M = 272,39$ g/mol



Rdt : 52%

Rf : 0,44 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)

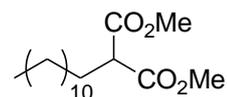
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,72 (s, 6H), 3,34 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,29-1,23 (m, 16H), 0,86 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H)

SM (ESI) m/z : 273 $[M+H]^+$

2-Dodécylmalonate de diméthyle (11b)

$C_{17}H_{32}O_4$

$M = 300,44$ g/mol



Rdt : 55%

Rf : 0,53 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)

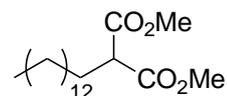
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,73 (s, 6H), 3,35 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H), 1,89 (m, 2H), 1,40-1,20 (m, 20H), 0,88 (t, $J = 10,26$ Hz, 3H)

SM (ESI) m/z : 301 $[M+H]^+$

2-Tétradécylmalonate de diméthyle (11c)

$C_{19}H_{36}O_4$

$M = 328,49$ g/mol



Rdt : 52%

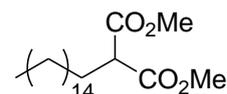
Rf : 0,38 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,73 (s, 6H), 3,35 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 1,89 (m, 2H), 1,35-1,20 (m, 24H), 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H)

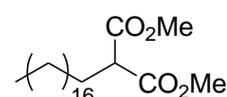
SM (ESI) m/z : 329 $[M+H]^+$

2-Hexadécylmalonate de diméthyle (11d)C₂₁H₄₀O₄

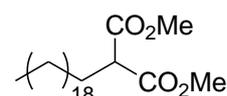
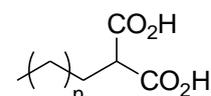
M = 356,55 g/mol

**Rdt** : 48%**Rf** : 0,48 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,72 (s, 6H), 3,34 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,34-1,20 (m, 28H), 0,86 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)**RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169,9 ; 52,3 ; 51,7 ; 31,9 ; 29,6 ; 28,5 ; 29,3 ; 29,3 ; 29,2 ; 28,8 ; 27,3 ; 22,7 ; 14,1**SM** (ESI) *m/z* : 357 [M+H]⁺**2-Octadécylmalonate de diméthyle (11e)**C₂₃H₄₄O₄

M = 384,60 g/mol

**Rdt** : 48%**Rf** : 0,47 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,74 (s, 6H), 3,36 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 1,89 (m, 2H), 1,35-1,25 (m, 32H), 0,89 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)**2-Eicosylmalonate de diméthyle (11f)**C₂₅H₄₈O₄

M = 412,66 g/mol

**Rdt** : 69%**Rf** : 0,56 (cHex/AE 85:15 ; anisaldéhyde)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,71 (s, 6H), 3,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,30-1,20 (m, 36H), 0,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H)**SM** (ESI) *m/z* : 413 [M+H]⁺**Procédure général de synthèse des lipides diacides saturés (12)**

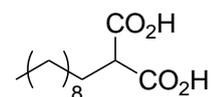
A une solution de malonate **11** (1 eq) dans un mélange MeOH/THF est ajoutée au goutte à goutte une solution d'hydroxyde de lithium 1M (3 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF

1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 3 jours à température ambiante puis une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques combinées sont lavées à l'eau puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner le produit désiré **12**.

2-Décyl diacide (12a)

C₁₃H₂₄O₄

M = 244,33 g/mol



Rdt : 96% (solide blanc)

Rf : 0,36 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; cérium)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,65 (s, 2H), 3,15 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 1,72 (m, 2H), 1,34-1,05 (m, 16H), 0,72 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H)

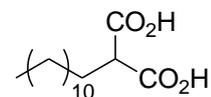
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 172,1 ; 51,6 ; 48,8 ; 48,5 ; 48,2 ; 47,9 ; 31,6 ; 29,2 ; 29,0 ; 28,7 ; 28,6 ; 27,1 ; 22,3 ; 13,6

SM (ESI) *m/z* : 199 [M-CO₂H]⁺

2-Dodécyl diacide (12b)

C₁₅H₂₈O₄

M = 272,38 g/mol



Rdt : 80% (solide blanc)

Rf : 0,34 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; cérium)

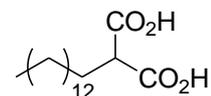
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,14 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 1,71 (m, 2H), 1,25-1,00 (m, 20H), 0,72 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H)

SM (ESI) *m/z* : 227 [M-CO₂H]⁺

2-Tétradécyl diacide (12c)

C₁₇H₃₂O₄

M = 300,44 g/mol



Rdt : 87% (solide blanc)

Rf : 0,24 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; cérium)

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ 3,29 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 1,84 (m, 2H), 1,35-1,27 (m, 24H), 0,91 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H)

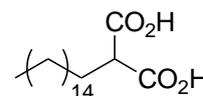
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 172,1 ; 51,6 ; 48,8 ; 48,5 ; 48,2 ; 47,9 ; 31,6 ; 29,2 ; 29,0 ; 28,7 ; 28,6 ; 27,1 ; 22,3 ; 13,6

SM (ESI) m/z : 255 $[M-CO_2H]^+$

2-Hexadécyl diacide (12d)

$C_{19}H_{36}O_4$

$M = 328,49$ g/mol



Rdt : 87% (solide blanc)

Rf : 0,37 ($CH_2Cl_2/MeOH/acide\ acétique\ 90:5:5$; cérium)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4,61 (s, 2H), 3,18 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,30-1,05 (m, 28H), 0,75 (t, $J = 6,0$ Hz, 3H)

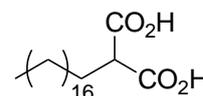
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172,1 ; 51,6 ; 49,2 ; 48,9 ; 48,6 ; 48,3 ; 48,0 ; 31,7 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,6 ; 27,1 ; 22,4 ; 13,7

SM (ESI) m/z : 283 $[M-CO_2H]^+$

2-Octadécyl diacide (12e)

$C_{21}H_{40}O_4$

$M = 356,55$ g/mol



Rdt : 40% (solide blanc)

Rf : 0,53 ($CH_2Cl_2/MeOH/acide\ acétique\ 90:5:5$; cérium)

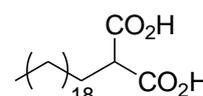
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,30-1,00 (m, 32H), 0,76 (t, $J = 6,1$ Hz, 3H)

SM (ESI) m/z : 311 $[M-CO_2H]^+$

2-Eicosyl diacide (12f)

$C_{23}H_{44}O_4$

$M = 384,60$ g/mol



Rdt : 77% (solide blanc)

Rf : 0,42 ($CH_2Cl_2/MeOH/acide\ acétique\ 90:5:5$; cérium)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,22 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,30-1,10 (m, 36H), 0,80 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H)

SM (ESI) m/z : 339 $[M-CO_2H]^+$

9-Bromo-10-undécyn-1-ol (14)C₁₁H₁₉OBr

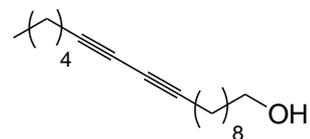
M = 247,18 g/mol



A 3 ml d'une solution de 100 mg de 10-undécyn-1-ol (0,59 mmol, 1 eq) dans l'acétone sont ajoutés 116 mg de *N*-bromosuccinimide (0,65 mmol, 1,1 eq) puis 1 mg de nitrate d'argent (0,06 mmol, 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité 20h à température ambiante, concentré, repris dans 10 ml de pentane puis lavé deux fois avec 10 ml d'eau. Les phases aqueuses combinées sont extraites 2 fois avec 20 ml d'un mélange pentane/Et₂O 1:1. Les phases organiques combinées sont séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 166 mg de produit désiré **14** sous la forme d'une huile incolore (Rdt : quantitatif).

Rf : 0,5 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,62 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,18 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,56-1,44 (m, 4H), 1,44-1,28 (m, 10H)**RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 80,4 ; 63,0 ; 37,4 ; 32,7 ; 29,3 ; 29,3 ; 28,9 ; 28,7 ; 28,2 ; 25,7 ; 19,6**IR** : 3338,7 ; 2929,5 ; 2855,3 ; 1779,4 ; 1718,9 ; 1464,8 ; 1430,1 ; 1057,3**SM** (ESI) *m/z* : 264 [M+NH₃]⁺**10,12-Octadécadiyn-1-ol (15a)**C₁₈H₃₀O

M = 262,44 g/mol



A 2 ml d'une solution de 0,24 ml d'heptyne (1,78 mmol, 1,3 eq) dans un mélange MeOH/éthylamine 10:9 sont ajoutés le chlorure de cuivre et l'hydrochlorure d'hydroxylamine en quantité catalytique puis 340 mg de **14** (1,38 mmol, 1 eq) au goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité 6h à température ambiante. 2 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés puis le milieu est extrait 3 fois avec 4 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées 2 fois avec 10 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 283 mg de produit désiré **15a** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : 79%).

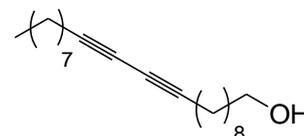
Rf : 0,38 (cHex/AE 3:1 ; vaniline)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,60 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,21 (t, *J* = 6,7 Hz, 4H), 1,62-1,37 (m, 6H), 1,37-1,17 (m, 14H), 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 65,2 ; 62,8 ; 32,7 ; 30,9 ; 29,3 ; 29,3 ; 28,9 ; 28,7 ; 28,2 ; 27,9 ; 25,6 ; 22,1 ; 19,1 ; 13,8
IR : 3312,4 ; 2930,1 ; 2857,0 ; 1658,9 ; 1465,6 ; 1427,3 ; 1057,2

10,12-Uncosadiyn-1-ol (15b)

C₂₁H₃₆O

M = 304,52 g/mol



A 0,2 ml d'une solution de 32 µl de décynes (0,18 mmol, 1,1 eq) dans un mélange MeOH/éthylamine 10:9 sont ajoutés le chlorure de cuivre et l'hydrochlorure d'hydroxylamine en quantité catalytique puis 40 mg de **14** (0,16 mmol, 1 eq) au goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité 2h30 à température ambiante. 0,5 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N sont ajoutés puis le milieu est extrait 3 fois avec 1 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées 2 fois avec 3 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 10:1 jusqu'à 3:1) pour donner 14 mg de produit désiré **15b** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 29%).

Rf : 0,40 (cHex/AE 3:1 ; vaniline)

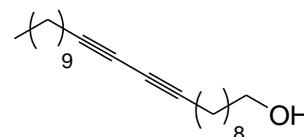
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,64 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H), 1,62-1,42 (m, 6H), 1,42-1,19 (m, 20H), 0,88 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H)

SM (ESI) *m/z* : 322 [M+H₂O]⁺

10,12-Tricosadiyn-1-ol (15c)

C₂₃H₄₀O

M = 332,57 g/mol



A une suspension contenant 59 mg de tétrahydruure d'aluminium et de lithium (1,56 mmol, 1,8 eq) dans 3 ml de THF est ajoutée au goutte à goutte une solution de 300 mg d'acide 10,12-tricosadiynoïque (0,87 mmol, 1 eq) dans 3 ml de THF. Le milieu réactionnel est agité 2h30 à température ambiante. 0,06 ml d'eau, 0,06 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 15% puis 0,18 ml d'eau sont ajoutés dans cet ordre et le milieu est filtré et rincé avec 6 ml d'AE. La phase organique est lavée avec 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium puis 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchée sur du

sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner 285 mg du produit désiré **15c** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 99%).

Rf : 0,41 (cHex/AE 6:2 ; DCIP)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,64 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,59-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 26H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H)

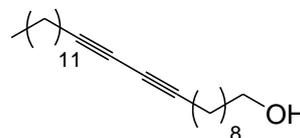
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 63,1 ; 32,8 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,3 ; 25,7 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

SM (ESI) *m/z* : 333 [M+H]⁺

10,12-Pentacosadiyn-1-ol (**15d**)

C₂₅H₄₄O

M = 360,63 g/mol



A une suspension contenant 0,18 g de tétrahydrure d'aluminium et de lithium (4,80 mmol, 1,8 eq) dans 10 ml de THF est ajoutée au goutte à goutte une solution de 1,00 g d'acide 10,12-pentacosadiynoïque (2,67 mmol, 1 eq) dans 10 ml de THF. Le milieu réactionnel est agité 2h30 à température ambiante. 0,2 ml d'eau, 0,2 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 15% puis 0,6 ml d'eau sont ajoutés dans cet ordre et le milieu est filtré et rincé avec 20 ml d'AE. La phase organique est lavée avec 30 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium puis 30 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner 940 mg du produit désiré **15d** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 98%).

Rf : 0,44 (cHex/AE 6:2 ; DCIP)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,64 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,24 (t, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,60-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 30H), 0,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)

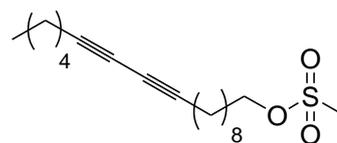
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 63,1 ; 32,8 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,4 ; 25,7 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

IR : 3338,9 ; 2919,4 ; 2850,7 ; 1466,5

SM (ESI) *m/z* : 361 [M+H]⁺

Mésylate du 10,12-octadécadiyn-1-ol (16a)C₁₉H₃₂SO₃

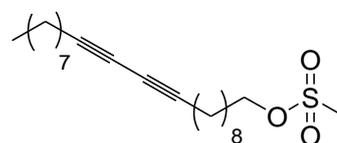
M = 340,53 g/mol



A 1 ml d'une solution de 26 mg de **15a** (0,10 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés au goutte à goutte 9 µl de chlorure de mésyle (0,12 mmol, 1.2 eq) et 18 µl de triéthylamine (0,13 mmol, 1.3 eq). Le milieu réactionnel est agité 1h à température ambiante. 1 ml d'une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium est ajouté puis le milieu est extrait trois fois avec 1,5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 5 ml d'eau, 5 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner 33 mg de produit désiré **16a** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : 97%).

Rf : 0,40 (cHex/AE 3:1 ; vaniline)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,22 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,75 (td, *J*₁ = 6,7 Hz, *J*₂ = 6,6 Hz, 2H) 1,60-1,42 (m, 4H), 1,42-1,20 (m, 14H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H)**IR** : 2932,5 ; 2858,4 ; 1466,5 ; 1357,5 ; 1171,1**Mésylate du 10,12-uncosadiyn-1-ol (16b)**C₂₂H₃₈SO₃

M = 474,76 g/mol



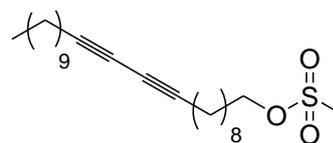
A 1 ml d'une solution de 14 mg de **15b** (0,05 mmol, 1 eq) dans 1 ml de THF sont ajoutés au goutte à goutte 4 µl de chlorure de mésyle (0,06 mmol, 1.2 eq) et 8 µl de triéthylamine (0,06 mmol, 1.3 eq). Le milieu réactionnel est agité 1h à température ambiante. 1 ml d'une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium est ajouté puis le milieu est extrait 3 fois avec 1,5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 5 ml d'eau, 5 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner 18 mg de produit désiré **16b** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : quantitatif).

Rf : 0,45 (cHex/AE 3:1 ; vaniline)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,22 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,74 (td, *J*₁ = 6,5 Hz, *J*₂ = 6,5 Hz, 2H) 1,51 (td, *J*₁ = 6,2 Hz, *J*₂ = 6,9 Hz, 4H), 1,42-1,20 (m, 20H), 0,87 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H)

Mésyltate du 10,12-tricosadiyn-1-ol (**16c**)

C₂₄H₄₂SO₃

M = 410,66 g/mol



A 1 ml d'une solution de 50 mg de **15c** (0,15 mmol, 1eq) dans le THF sont ajoutés au goutte à goutte 14 µl de chlorure de mésyle (0,18 mmol, 1,2 eq) puis 27 µl de triéthylamine (0,20 mmol, 1,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 30 min à température ambiante. 2 ml d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de potassium sont ajoutés puis le milieu est extrait 3 fois avec 2 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 10 ml d'eau puis 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner 57 mg du produit désiré **16c** sous la forme d'un solide jaune pale (Rdt : 92%).

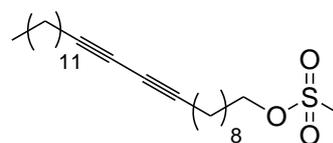
Rf : 0,41 (cHex/AE 6:2 ; vaniline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,23 (m, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,25 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 1,50-1,20 (m, *J* = Hz, 28H), 0,90 (m, 3H)

Mésyltate du 10,12-pentacosadiyn-1-ol (**16d**)

C₂₆H₄₆SO₃

M = 438,72 g/mol



A 10 ml d'une solution de 624 mg de **15d** (2,28 mmol, 1eq) dans le THF sont ajoutés au goutte à goutte 212 µl de chlorure de mésyle (2,74 mmol, 1,2 eq) puis 728 µl de triéthylamine (5,26 mmol, 2,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante. 10 ml d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de potassium sont ajoutés puis le milieu est extrait 3 fois avec 10 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées avec 30 ml d'eau puis 30 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner 990 mg du produit désiré **16d** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : quantitatif).

Rf = 0,40 (cHex/AE 6:2 ; DCIP)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,21 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,99 (s, 3H), 2,23 (t, *J* = 6,8Hz, 4H), 1,74 (td, *J*₁ = 6,8 Hz, *J*₂ = 6,4Hz, 2H), 1,51 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 28H), 0,87 (t, *J* = Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 142,6 ; 142,4 ; 109,4 ; 109,2 ; 77,6 ; 70,1 ; 65,3 ; 65,2 ; 37,3 ; 31,9 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,7 ; 28,3 ; 28,3 ; 25,4 ; 22,6 ; 19,2 ; 14,1

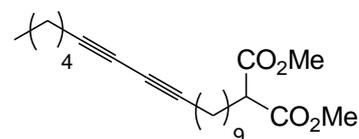
IR : 2919,2 ; 2851,0 ; 1471,3 ; 1335,9 ; 1165,1

SM (ESI) m/z : 439 $[M+H]^+$

4,9-malonate (17a)

$C_{23}H_{36}O_4$

$M = 376,54$ g/mol



A une suspension de 5 mg d'hydruure de sodium (60%) (0,11 mmol, 1,2 eq) dans 0,7 ml de THF est ajouté au goutte à goutte 14 μ l de malonate de diméthyle (1,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 1h à température ambiante avant d'ajouter une solution de 32 mg de **16a** (0,09 mmol, 1 eq) dans 0,5 ml de THF puis TBAI en quantité catalytique. Le milieu réactionnel est ensuite agité 17h à reflux puis amené à température ambiante. 2 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 2 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées avec 5 ml d'eau puis avec 5 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 8:2) pour donner 21 mg de produit désiré **17a** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : 59%).

Rf : 0,54 (cHex/AE 6:2 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,74 (s, 6H), 3,35 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 2,23 (t, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,91 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 16H), 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H)

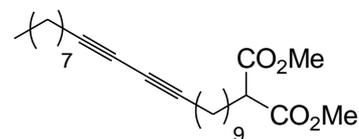
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169,9 ; 65,2 ; 52,4 ; 51,7 ; 31,0 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,8 ; 28,3 ; 28,0 ; 27,3 ; 22,1 ; 19,2 ; 13,9

IR : 2931,8 ; 2857,7 ; 1757,7 ; 1739,1 ; 1458,4 ; 1436,2 ; 1246,7 ; 1156,3

7,9-malonate (17b)

$C_{26}H_{42}O_4$

$M = 418,62$ g/mol



A une suspension contenant de 2 mg d'hydruure de sodium (60%) (0,06 mmol, 1,2 eq) dans 0,4 ml de THF est ajouté au goutte à goutte 7 μ l de malonate de diméthyle (1,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 1h30 à température ambiante avant d'ajouter une solution de 18 mg de **16b** (0,05 mmol, 1 eq) dans 0,5 ml de THF puis TBAI en quantité catalytique. Le milieu réactionnel est ensuite agité 16h à reflux puis amené à température ambiante. 2 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 2 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont

lavées avec 5 ml d'eau puis avec 5 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 8:2) pour donner 13 mg de produit désiré **17b** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : 68%).

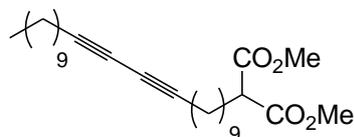
Rf : 0,64 (cHex/AE 6:2 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,73 (s, 6H), 3,35 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 2,23 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,90 (m, 2H), 1,54-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 22H), 0,89 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H)

9,9-malonate (17c)

C₂₈H₄₆O₄

M = 474,76 g/mol



A une suspension contenant 7 mg d'hydrure de sodium (60%) (0,17 mmol, 1,2 eq) dans 1 ml de THF est ajouté au goutte à goutte 21 µl de malonate de diméthyle (0,18 mmol, 1,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 1h à température ambiante avant d'ajouter une solution de 57 mg de **16c** (0,14 mmol, 1 eq) dans 0,5 ml de THF puis une quantité catalytique de TBAI. Le milieu réactionnel est ensuite agité 18h à reflux puis amené à température ambiante. 2 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 3 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 10 ml d'eau puis 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 8:2) pour donner 45 mg du produit désiré **17c** sous la forme d'un liquide jaune (Rdt : 73%).

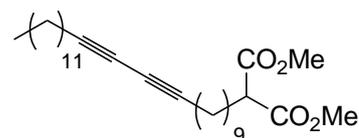
Rf = 0,57 (cHex/AE 3:1 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,72 (s, 6H), 3,34 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 2,23 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,87 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 26H), 0,87 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 170,6 ; 169,9 ; 109,3 ; 65,2 ; 52,4 ; 51,7 ; 32,4 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,8 ; 28,3 ; 27,3 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

11,9-malonate (17d)C₃₀H₅₀O₄

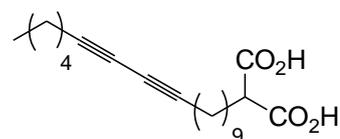
M = 474,76 g/mol



A une suspension contenant 0,10 g d'hydrure de sodium (60%) (2,51 mmol, 1,1 eq) dans 25 ml de THF est ajouté au goutte à goutte 0,31 ml de malonate de diméthyle (2,74 mmol, 1,2 eq). Le milieu réactionnel est agité 30 min à température ambiante avant d'ajouter une solution de 1,00 g de **16d** (2,28 mmol, 1 eq) dans 12 ml de THF puis une quantité catalytique de TBAI. Le milieu réactionnel est ensuite agité 20 minutes à température ambiante puis 25h à reflux puis amené à température ambiante. 20 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 30 ml d'Et₂O. Les phases organiques combinées sont lavées avec 90 ml d'eau puis 90 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (cHex/AE 9:1) pour donner 0,90 g du produit désiré **17d** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 82%).

Rf = 0,63 (cHex/AE 3:1 ; cérium)**RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,73 (s, 6H), 3,35 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,89 (m, 2H), 1,60-1,45 (m, 4H), 1,45-1,23 (m, 30H), 0,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H)**RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169,9 ; 52,4 ; 51,7 ; 31,9 ; 30,0 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,8 ; 28,3 ; 28,0 ; 27,3 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1**IR** : 2918,0 ; 2848,4 ; 1742,1 ; 1464,6 ; 1435,4 ; 1166,1**SM** (ESI) *m/z* : 497 [M+Na]⁺**4,9-diacide (18a)**C₂₁H₃₂O₄

M = 348,48 g/mol



A 4 ml d'une solution de 130 mg de **17a** (0,36 mmol, 1 eq) dans un mélange MeOH/THF est ajoutée au goutte à goutte 1 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 1M (1,00 mmol, 2,8 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF 1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 18h à température ambiante. 4 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec 5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 10 ml d'eau puis avec 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner 123 mg de produit désiré **18a** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : quantitatif).

Rf : 0,33 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; anisaldéhyde)

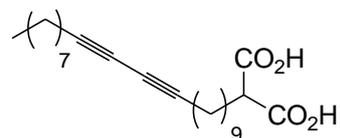
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,35 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,14 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,85 (m, 2H), 1,43 (td, *J*₁ = 6,8 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, 4H), 1,37-1,15 (m, 16H), 0,80 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)

SM (ESI) *m/z* : 303 [M-CO₂H]⁺

7,9-diacide (18b)

C₂₄H₃₈O₄

M = 390,56 g/mol



A 0,4 ml d'une solution de 13 mg de **17b** (0,03 mmol, 1 eq) dans un mélange MeOH/THF est ajoutée au goutte à goutte 0,1 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 1M (0,10 mmol, 3,3 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF 1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 40h à température ambiante. 1 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec 1 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 3 ml d'eau puis avec 3 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de sodium, filtrées et concentrées pour donner 15 mg de produit désiré **18b** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : quantitatif).

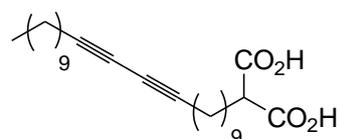
Rf : 0,31 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; anisaldéhyde)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,43 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 2,24 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,93 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,45-1,25 (m, 22H), 0,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)

9,9-diacide (18c)

C₂₆H₄₂O₄

M = 418,62 g/mol



A une solution de 45 mg de **17c** (0,10 mmol, 1 eq) dans 1,2 ml d'un mélange MeOH/ THF est ajoutée au goutte à goutte 0,3 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 1M (0,30 mmol, 3 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF 1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 20h à température ambiante. 2 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec 2 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 5 ml d'eau puis 5 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 41 mg du produit désiré **18c** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 97%).

Rf = 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; anisaldéhyde)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,34 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,14 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,84 (m, 2H), 1,41 (td, *J*₁ = 6,8 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, 4H), 1,35-1,10 (m, 26H), 0,78 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)

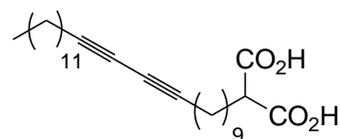
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 174,3 ; 51,3 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,3 ; 27,1 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

SM (ESI) *m/z* : 373 [M-CO₂H]⁺

11,9-diacide (18d)

C₂₈H₄₆O₄

M = 446,67 g/mol



A une solution de 130 mg de **17d** (0,27 mmol, 1 eq) dans 4 ml d'un mélange MeOH/ THF est ajoutée au goutte à goutte 1 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 1M (1,00 mmol, 3,7 eq) dans l'eau (rapport H₂O/MeOH/THF 1:1:3). Le milieu réactionnel est agité 28h à température ambiante. 4 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N est ajoutée et le milieu est extrait 3 fois avec 8 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 20 ml d'eau puis 20 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 120 mg du produit désiré **18d** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : quantitatif).

Rf = 0,44 (CH₂Cl₂/MeOH/acide acétique 90:5:5 ; anisaldéhyde)

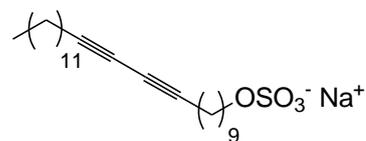
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,40 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,87 (m, 2H), 1,46 (td, *J*₁ = 6,8 Hz, *J*₂ = 6,8 Hz, 4H), 1,40-1,10 (m, 30H), 0,82 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H)

SM (ESI) *m/z* : 401 [M-CO₂H]⁺

11,9-sulfonate (19)

C₂₅H₄₃SO₄Na

M = 462,67 g/mol



A 1 ml d'une solution de 77 mg de Me₃N.SO₃ (0,55 mmol, 4 eq) dans la DMF est ajouté 50 mg (0,14 mmol, 1 eq) de l'alcool **15d**. Le milieu réactionnel est agité 15h à 60°C puis ramené à température ambiante. 10 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 10% sont ajoutés puis le milieu est extrait 3 fois avec 1 ml de chloroforme. Les phases organiques combinées sont lavées avec 50 ml d'eau, séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et concentrée pour donner 48 mg du produit désiré **19** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 75%).

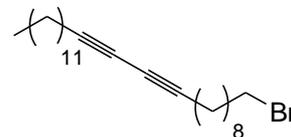
Rf = 0,02 (cHex/AE 6:4 ; cérium)

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 3,99 (t, J = 9,2 Hz, 2H), 2,24 (t, J = 8,0 Hz, 4H), 1,66-1,62 (m, 2H), 1,58-1,20 (m, 32H), 0,90 (t, J = 7,2 Hz, 3H)

1-Bromo-10,12-pentacosadiyne (20)

C₂₅H₄₃Br

M = 423,52 g/mol



A une suspension contenant 50 mg d'alcool **15d** (0,11 mmol, 1 eq) dans 1 ml de MeCN sont ajoutés 69 mg de bromure de lithium (0,80 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est porté à reflux puis agité 4h à reflux, ramené à température ambiante, agité 16h à température ambiante et concentré. Le produit brut est repris dans 2 ml de chloroforme, filtré sur coton, rincé 3 fois avec 2 ml de chloroforme et concentré pour donner 46 mg du produit désiré **20** sous la forme d'une huile jaune (Rdt : quantitatif).

Rf = 0,87 (cHex/AE 6:2 ; cérium)

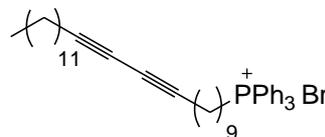
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,40 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,24 (t, J = 6,8 Hz, 4H), 1,85 (td, J₁ = 6,8 Hz, J₂ = 7,2 Hz, 2H), 1,51 (td, J₁ = 6,8 Hz, J₂ = 7,2 Hz, 4H), 1,45-1,20 (m, 28H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 77,6 ; 77,4 ; 65,3 ; 65,2 ; 33,9 ; 32,8 ; 31,9 ; 30,0 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,9 ; 28,7 ; 28,7 ; 28,4 ; 28,3 ; 28,3 ; 28,1 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

11,9-phosphonium (21)¹⁷²

C₄₃H₅₈PBr

M = 685,82 g/mol



A 2 ml d'une solution de 90 mg de **20** (0,21 mmol, 1 eq) dans MeCN sont ajoutés 90 mg (0,34 mmol, 1,6 eq) de triphénylphosphine. Le milieu réactionnel est porté à reflux, agité 4 jours à reflux, ramené à température ambiante puis concentré. Le produit brut est lavé 5 fois à avec 2 ml d'hexane puis purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 puis 9:1) pour donner 96 mg du produit désiré **21** sous la forme d'une huile jaune (Rdt : 66%).

¹⁷² Chow S., Fletcher M.T., Lambert L.K., Gallagher O.P., Moore C.J., Cribb B.W., Allsopp P.G., Kitching W. J. *Org. Chem.* **70** 1808-1827 (2005)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,0-7,6 (m, 15H), 3,85 (m, 2H), 2,21 (td, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, 4H), 1,70-1,55 (m, 6H), 1,55-1,40 (m, 4H), 1,40-1,10 (m, 24H), 0,87 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H)

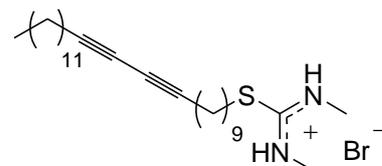
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 134,9 ; 133,8 ; 133,7 ; 130,5 ; 130,4 ; 119,0 ; 118,1 ; 65,2 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,7 ; 28,3 ; 28,2 ; 19,1 ; 14,1

RMN ³¹P (100 MHz, CDCl₃) δ 24,6

11,9-isothiuronium (**22**)¹⁷³

C₂₈H₅₁SN₂Br

M = 527,70 g/mol



A 5 ml d'une solution de 0,10 g de **20** (0,24 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés 1,23 g (11,81 mmol, 50 eq) de 1,3-diméthyl thiourée. Le milieu réactionnel est porté à reflux, agité 24h à reflux, ramené à température ambiante puis concentré. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 puis 9:1) pour donner 0,16 g du produit désiré **22** sous la forme d'une huile jaune (Rdt = 99%).

Rf = 0,36 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 ; cérium)

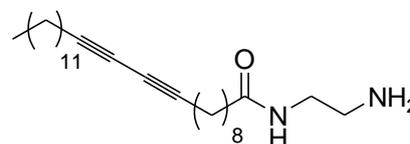
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,10 (s, 1H), 8,89 (s, 1H), 3,24 (s, 2H), 3,09 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 2,24 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H), 1,80-1,60 (m, 2H), 1,45-1,20 (m, 30H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167,9 ; 142,6 ; 77,6 ; 33,0 ; 32,5 ; 32,1 ; 31,9 ; 30,8 ; 30,0 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,3 ; 28,1 ; 22,7 ; 19,5 ; 19,2 ; 14,1

11,8-amine (**23**)

C₂₇H₄₈N₂O

M = 416,69 g/mol



A 1 ml d'une solution de 100 mg de diyne **5** (0,21 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés 57 µl d'éthylène diamine (0,85 mmol, 4 eq) puis 0,2 ml de triéthylamine (1,48 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante puis filtré sur fritté. 10 ml d'eau sont ajoutés au filtrat et le milieu est extrait 3 fois avec 15 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 50 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et

¹⁷³ Zhang G., Jin W., Fukushima T, Kosaka A., Ishii N., Aida T. *J. Am. Chem. Soc.* **129** 719-722 (2007)

concentrées pour donner 58 mg du produit désiré **23** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 66%).

Rf = 0,03 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,09 (s, 1H), 3,31 (td, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz 2H), 2,85 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,25-2,10 (m, 6H), 1,68-1,54 (m, 2H), 1,54-1,40 (m, 4H), 1,40-1,15 (m, 26H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H)

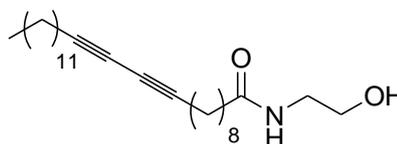
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 173,5 ; 77,6 ; 77,4 ; 65,3 ; 65,3 ; 41,5 ; 41,3 ; 36,8 ; 31,9 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,7 ; 28,3 ; 28,3 ; 25,7 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

SM (ESI) m/z : 417 [M+H]⁺

11,8-alcool (**24**)

C₂₇H₄₂NO₂

M = 417,68 g/mol



A 1 ml d'une solution de 100 mg de diyne **5** (0,21 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés 13 µl d'ainoéthanol (0,21 mmol, 1 eq) puis 0,2 ml de triéthylamine (1,48 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 20h à température ambiante puis filtré sur fritté. 10 ml d'eau sont ajoutés au filtrat et le milieu est extrait 3 fois avec 15 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 50 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 85 mg du produit désiré **24** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 96%).

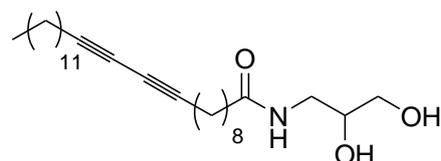
Rf = 0,07 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,95 (s, 1H), 3,72 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,42 (m, 2H), 2,23 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,20 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,63 (m, 2H) 1,50 (m, 4H), 1,40-1,20 (m, 26H), 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 174,5 ; 77,7 ; 77,4 ; 65,3 ; 65,2 ; 62,6 ; 42,5 ; 36,6 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,7 ; 28,3 ; 28,3 ; 25,6 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

11,8-diol (25)C₂₈H₄₉NO₃

M = 447,70 g/mol



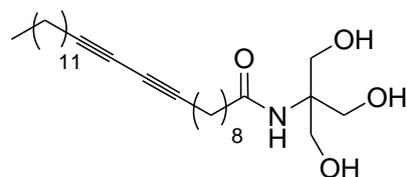
A 1 ml d'une solution de 100 mg de **5** (0,21 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés 19 mg de \pm 1-amino-2,3-propanediol (0,21 mmol, 1 eq) puis 0,2 ml de triéthylamine (1,48 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 20h à température ambiante. 2 ml d'eau sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 2 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées avec 5 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 83 mg du produit désiré **25** sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 88%).

Rf = 0,03 (cHex/AE 6:4 ; cérium)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,62 (s, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,83 (m, 2H), 3,66 (m, 2H), 2,23 (t, J = 8,4 Hz, 6H), 1,41-1,23 (m, 6H) 1,23-1,03 (m, 26H), 0,59 (t, J = 7,5 Hz, 3H)

SM (ESI) m/z : 448 [M+H]⁺**11,8-triol (26)**C₂₉H₅₁NO₄

M = 477,73 g/mol



A 2 ml d'une solution de 100 mg de **5** (0,21 mmol, 1 eq) dans la DMF sont ajoutés 26 mg de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (0,21 mmol, 1 eq) puis 0,4 ml de triéthylamine (2,97 mmol, 14 eq). Le milieu réactionnel est agité 15h à température ambiante. 4 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium sont ajoutés et le milieu est extrait 3 fois avec 6 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées trois fois avec 10 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) pour donner 33 mg du produit désiré **26** sous la forme d'une huile jaune (Rdt : 33%).

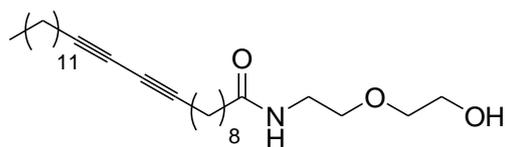
Rf = 0,03 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,50 (s, 1H), 4,72 (s, 3H), 3,60 (s, 6H), 2,24 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 1,63-1,58 (m, 2H), 1,57-1,45 (m, 4H), 1,45-1,20 (m, 26H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 175,2 ; 77,6 ; 77,4 ; 65,3 ; 65,2 ; 61,8 ; 37,0 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,3 ; 25,7 ; 22,7 ; 19,2 ; 14,1

11,8-PEG (27)C₂₉H₅₁NO₃

M = 461,73 g/mol



A 1 ml d'une solution de 100 mg de diyne **5** (0,21 mmol, 1 eq) dans le THF sont ajoutés 21 μ l de 2(2-aminoéthoxy) éthanol (0,21 mmol, 1 eq) puis 0,2 ml de triéthylamine (1,48 mmol, 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante puis filtré sur coton. 5 ml d'eau sont ajoutés au filtrat et le milieu est extrait 3 fois avec 5 ml d'AE. Les phases organiques combinées sont lavées 2 fois avec 20 ml d'eau, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et concentrées pour donner 90 mg du produit désiré sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 92%).

Rf = 0,03 (cHex/AE 6:4 ; vaniline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,05 (s, 1H), 3,74 (t, *J* = 4,1 Hz, 2H), 3,59-3,54 (m, 4H), 3,48-3,42 (m, 2H), 2,42 (s, 1H), 2,22 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H), 2,16 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 1,70-1,55 (m, 2H), 1,55-1,43 (m, 4H), 1,43-1,20 (m, 26H), 0,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 173,4 ; 77,6 ; 72,2 ; 70,0 ; 61,7 ; 39,1 ; 36,7 ; 31,9 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,7 ; 28,3 ; 28,3 ; 25,6 ; 22,6 ; 19,1 ; 14,1