

Thèse

"Synthèse de nano-objets lipidiques et leur fonctionnalisation interne par réaction « click »"

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Organique

Par

Emmanuel CONTAL

Ingénieur ENSCM

Soutenue le 8 juin 2010 devant la commission d'examen :

Prof. Nicolas GIUSEPPONE (Université de Strasbourg)

Prof. Chantal LARPENT (Université de Versailles)

Dr. Anne-Marie CAMINADE (Université de Toulouse)

Dr. Andrey KLYMCHENKO (Université de Strasbourg)

Dr. Alain WAGNER (Université de Strasbourg)

Dr. Charles MIOSKOWSKI (Université de Strasbourg) (décédé)

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Membre invité

Directeur de thèse

Directeur de thèse

A mes parents,

A ma famille,

A Sylvie,

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire des Systèmes Chimiques Fonctionnels sous les directions successives du Dr Charles Mioskowski puis du Dr Alain Wagner. Je tiens à rendre hommage au Dr Mioskowski et à le remercier vivement pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet innovant. Je tiens également à remercier le Dr Wagner pour ses conseils et ses remarques pertinentes durant mes deux dernières années de thèse et notamment lors de la correction de ce manuscrit et des publications. Je tiens à remercier le Dr Stéphane Meunier pour avoir suivi ces travaux durant les deux premières années, quand il était au laboratoire.

Je souhaite également remercier les Laboratoires GlaxoSmithKline, pour avoir co-financé avec le CNRS et la région Alsace mes travaux de thèse. Je tiens notamment à remercier le Dr Nicolas Faucher, qui a toujours pris le temps de suivre ce projet, bien que ce dernier ait complètement dévié au cours de ces quelques années.

Je désire témoigner ma profonde gratitude aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux : Prof. Nicolas Giuseppone, Prof. Chantal Larpent et Dr Anne-Marie Caminade.

Ensuite, je tiens à remercier le Dr Andrey Klymchenko du Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de l'Université de Strasbourg, qui m'a initié à la fluorescence, pour ses nombreux et très utiles conseils pendant ma thèse ainsi que pour sa forte implication dans mon sujet. Son expertise, sa gentillesse et sa disponibilité m'ont beaucoup appris, tant sur le plan scientifique que relationnel. Je voudrais également remercier le Prof. Yves Mély pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux au sein de son laboratoire.

J'aimerais remercier tous les experts analytiques qui m'ont apporté leur aide au cours de ces trois années : M. Cyril Antheaume du service RMN, M. Patrick Wehrung et Mme Pascale Buisine du service de spectrométrie de masse. Je tiens à remercier également le Dr

Patrick Schultz et Christine Ruhlmann pour ma formation et leur aide en microscopie et le Dr Pascal Marie pour m'avoir expliqué et permis de mesurer les CMC.

J'aimerais également remercier Liliane, Nathalie et Marianne pour leur aide précieuse dès qu'un problème, administratif ou non, survenait.

Enfin, j'aimerais adresser un immense merci à toutes les personnes qui m'ont entourées et aidées durant ces trois années au laboratoire et notamment à la fin. Parmi elles, je tiens à remercier Géraldine, Alexandre, Aurélia, Laure et Rachid. Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai passé d'agréables moments et de nombreux fous rires, que ce soit au laboratoire ou en dehors : Ghys, Jojo le macho, Hélène (plus connue sous le nom de Miss Platine !!!), Cédric, Mat, Samira, Michel, Manue... Un merci particulier à Antoine, mon fils spirituel, qui a du me supporter, moi et ma musique pourrie, pendant plus de deux ans. Ca n'a pas dû être facile tous les jours, avec mes pétages de plomb réguliers, mais tu as tenu le coup ! Un grand merci aussi à tous ceux qui sont partis du laboratoire : Damien, Cédric, Jérémy, sans oublier notre italien préféré le gros Pacu, Christelle, Géraldine, Cynthia et Belèn.

Finalement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux personnes qui me sont les plus chères.

Tout d'abord, un énorme merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenu et sans qui je ne serais jamais arrivé jusque là. Ils n'ont pas toujours compris ce que je faisais, mais m'ont toujours encouragé. Je ne les remercierai jamais assez.

Un immense merci également à Christophe et Céline pour leur soutien permanent, et plus particulièrement à Strasbourg, pardon Nordhouse...

Enfin, un immense merci à Sylvie pour tout ce qu'elle a apporté dans ma vie. Son soutien inconditionnel, ses encouragements m'ont permis de franchir tous les obstacles. Elle m'a supporté tous les jours, 24 heures sur 24, pendant la rédaction et a toujours pris du temps pour moi, malgré son propre travail. Je n'ose parler de ces bons petits plats quotidiens, qui ont provoqué quelques kilos. Ce qui est certain, c'est qu'il s'agit de kilos d'amour...

Sommaire

Abréviations	13
Introduction générale	15
<u>Chapitre I : De la formation à la fonctionnalisation de nanoparticules organiques</u>	17
<i>I – 1 : Introduction sur les nanosciences</i>	19
<i>I – 2 : Exemples de nanoparticules fluorescentes</i>	21
I – 2 – 1 : Les auto-arrangements lipidiques	21
I – 2 – 1 – 1 : Généralités sur les lipides	21
I – 2 – 1 – 2 : Formation des auto-arrangements lipidiques	22
I – 2 – 1 – 3 : Les micelles de lipide	24
I – 2 – 1 – 3 – a : Formation des micelles	24
I – 2 – 1 – 3 – b : Application des micelles	24
I – 2 – 1 – 4 : Les liposomes	25
I – 2 – 1 – 4 – a : Formation des liposomes	25
I – 2 – 1 – 3 – b : Fonctionnalisation des liposomes	27
I – 2 – 2 : Les micelles de polymère	28
I – 2 – 2 – 1 : Formation des micelles de polymère	28
I – 2 – 2 – 2 : Fonctionnalisation des micelles de polymère	29
I – 2 – 3 : Les nanoparticules de polymère	31
I – 2 – 3 – 1 : Formation des nanoparticules de polymère	31
I – 2 – 3 – 2 : Greffage et encapsulation au sein des nanoparticules de polymère	32
I – 2 – 4 : Les dendrimères	33

I – 2 – 4 – 1 : Synthèse des dendrimères	34
I – 2 – 4 – 2 : Insertion de fluorophores au sein des dendrimères	35
<i>I – 3 : Antécédent au laboratoire : Les Constructions Lipidiques Photo-polymérisées (CLP)</i>	36
I – 3 – 1 : Auto-arrangements lipidiques à l'interface solide-liquide	37
I – 3 – 2 : Description et formation des CLP	38
I – 3 – 2 – 1 : Premières observations d'auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone	38
I – 3 – 2 – 2 : Premier procédé d'extraction des CLP	41
I – 3 – 2 – 3 : Deuxième procédé d'extraction des CLP	43
I – 3 – 2 – 4 : Troisième procédé d'extraction des CLP	44
I – 3 – 2 – 5 : Utilisation des CLP dans notre projet	45
<i>Références bibliographiques Chapitre I</i>	47
<u>Chapitre II : Synthèse des lipides et évaluation de leur solubilité en milieu aqueux</u>	51
<i>II – 1 : Rétrosynthèses des différents lipides</i>	54
II – 1 – 1 : Lipides possédant une tête polaire NTA	54
II – 1 – 2 : Lipides possédant une tête polaire malonate	55
<i>II – 2 : Synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA</i>	57
II – 2 – 1 : Synthèse des têtes polaires NTA	57
II – 2 – 2 : Synthèse du lipide 11,8-NTA	58
II – 2 – 3 : Synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA	59
II – 2 – 3 – 1 : Synthèse de l'intermédiaire 10	59
II – 2 – 3 – 2 : Synthèse de l'intermédiaire I-2	60
II – 2 – 3 – 3 : Synthèse de l'intermédiaire I-1	61
II – 2 – 3 – 4 : Synthèse de l'intermédiaire I-3	63

III – 2 – 3 : Observation par MET des auto-assemblages lipidiques à la surface des nanotubes de carbone	93
III – 2 – 4 : Etude de la stabilité des suspensions de nanotubes de carbone obtenues	96
III – 2 – 5 : Conclusions et choix des nanotubes pour le procédé de formation des CLP	97
III – 3 : Formation et caractérisation des micelles	99
III – 3 – 1 : Choix du milieu aqueux	99
III – 3 – 2 : Photo-polymérisation des lipides malonate 4 et 5	100
III – 3 – 3 : Analyses des micelles et des micelles polymérisées	102
III – 3 – 3 – 1 : Analyses par DLS	102
III – 3 – 3 – 2 : Analyses par MET	105
III – 3 – 4 : Etude de la CMC des micelles	105
III – 3 – 4 – 1 : Définition de la CMC	105
III – 3 – 4 – 2 : Présentation de la méthode de détermination de la CMC	106
III – 3 – 4 – 3 : Etude des micelles non polymérisées	108
III – 3 – 4 – 4 : Etude des micelles polymérisées	110
III – 4 : Mise au point du procédé de formation de CLP avec les lipides possédant une tête polaire malonate	111
III – 4 – 1 : Adsorption du lipide 4 sur les nanotubes de carbone	112
III – 4 – 2 : Photo-polymérisation de l'échantillon	114
III – 4 – 3 : Purification des nanotubes de carbone couverts de lipide 4	114
III – 4 – 4 : Extraction des CLP	116
III – 4 – 5 : Isolement des CLP	119
III – 4 – 6 : Formation des CLP-alcyne	121
III – 5 : Conclusion	122
Références bibliographiques Chapitre III	124

<u>Chapitre IV : Fonctionnalisation interne des micelles par réaction</u>	129
<u>« click » à l'aide d'une sonde fluorescente</u>	
IV – 1 : Mise au point de la réaction « click »	131
IV – 1 – 1 : Définition de la fluorescence	131
IV – 1 – 2 : Choix de la sonde fluorescente	132
IV – 1 – 3 : Etude de la fluorescence du dansyl-N ₃ 39	134
IV – 1 – 4 : Essais préliminaires de réactions « click »	136
<i>IV – 2 : Essais de réactions « click » avec les micelles polymérisées</i>	137
IV – 2 – 1 : Essais de réactions « click » avec le lipide 5	137
IV – 2 – 2 : Etude de fluorescence du dansyl-lipide 44	139
IV – 2 – 3 : Traitement des réactions « click » avec les micelles polymérisées	141
<i>IV – 3 : Stabilité des micelles lors de la réaction</i>	143
IV – 3 – 1 : Stabilité des micelles polymérisées dans le mélange solution Tris/ <i>tert</i> - butanol	143
IV – 3 – 2 : Stabilité des micelles polymérisées sous irradiation micro-ondes et lors de l'extraction en solvant organique	144
IV – 3 – 3 : Stabilité des micelles polymérisées lors de la fonctionnalisation	145
<i>IV – 4 : Optimisation des réactions « click » avec les micelles polymérisées de lipide 5</i>	146
IV – 4 – 1 : Etude des conditions micro-ondes	146
IV – 4 – 2 : Etude de la concentration	147
IV – 4 – 3 : Etude de l'influence de la quantité d'azoture	149
<i>IV – 5 : Etude approfondie de la fonctionnalisation interne des micelles</i>	150
IV – 5 – 1 : Caractérisation par électrophorèse	151
IV – 5 – 2 : Analyses de la fonctionnalisation des micelles par fluorescence	154
<i>IV – 6 : Comparaison entre la fonctionnalisation des micelles par le dansyl-N₃ et la solubilisation du dansyl-N₃ par les micelles</i>	157
IV – 6 – 1 : Etude de solubilisation du dansyl-N ₃ .	157
IV – 6 – 2 : Comparaison avec la fonctionnalisation covalente	159

<i>Conclusion</i>	160
<i>Références bibliographiques Chapitre IV</i>	161
<u>Chapitre V : Diverses applications de la réaction « click » au cœur de nano-objets lipidiques</u>	163
<i>V – 1 : Double greffage interne des micelles</i>	165
V – 1 – 1 : Présentations du FRET et de la notion d’inhibition de fluorescence	166
V – 1 – 2 : Inhibition de fluorescence en solution	170
V – 1 – 3 : Inhibition de fluorescence dans les micelles	173
V – 1 – 3 – 1 : Réaction « click » avec l’azoture de dansyl dans les micelles non polymérisées	173
V – 1 – 3 – 2 : Double fonctionnalisation séquentielle des micelles	174
V – 1 – 4 : Inhibition de fluorescence dans les micelles polymérisées	176
V – 1 – 5 : Etude des échanges inter-micelles par inhibition de fluorescence	178
V – 1 – 6 : Conclusion	179
<i>V – 2 : Fonctionnalisation interne des micelles par des nanoparticules d’or</i>	180
V – 2 – 1 : Synthèse des nanoparticules d’or	180
V – 2 – 2 : Fonctionnalisation des micelles lipidiques	181
<i>V – 3 : Fonctionnalisation interne des CLP avec le dansyl</i>	183
V – 3 – 1 : Formation des CLP	183
V – 3 – 2 : Greffage du dansyl au cœur des CLP	185
<i>Références bibliographiques du Chapitre V</i>	188
<u>Conclusions et perspectives</u>	191
<u>Partie expérimentale</u>	197
<u>Annexe</u>	237

Abréviations

aq	aqueux(se)
AE	acétate d'éthyle
CCM	chromatographie sur couche mince
CLP	constructions lipidiques photo-polymérisées
CMC	concentration micellaire critique
CVD	décomposition chimique en phase vapeur
d	doublet
DCM	dichlorométhane
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DWNTs	nanotubes de carbone double-parois
éq.	équivalent
<i>et coll.</i>	et collaborateurs
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster
GUV	vésicules unilamellaires géantes
M	Molarité
Me	groupement méthyle
MET	microscopie électronique à transmission
mg ou mL	milligramme ou millilitre
MLV	vésicules multi-lamellaires
mmol	millimole
MWNTs	nanotubes de carbone multi-parois
NTA	acide nitrilotriacétique
μL	microlitre
Rdt	rendement
R _f	Rapport frontal d'élution
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDS	dodécylsulfate de sodium
SWNTs	nanotubes de carbone mono-paroi
T	température
TA	température ambiante

TES	groupement triéthysilyle
Tf	groupement triflate
TMC	température micellaire critique
TMS	groupement triméthysilyle
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Introduction générale

Comme de nombreux tensio-actifs, les lipides synthétiques, une fois placés au-delà de leur concentration micellaire critique, s'auto-arrangent sous forme de micelles. Lorsque des nanotubes de carbone sont ajoutés à ces micelles, les lipides s'adsorbent spontanément à la surface des nanotubes pour former des auto-assemblages représentés sous forme d'hémi-micelles cylindriques. Les constructions lipidiques sont alors stabilisées lors d'une étape de polymérisation pour fournir des assemblages nanotubes de carbone/construction lipidique photo-polymérisée (NTC/CLP). Une solution aqueuse de nano-objets est obtenue après extraction de ces auto-arrangements des nanotubes de carbone. Leur forme idéalisée est représentée Figure 1. De par leur caractère amphiphile, ces nano-objets s'apparentent à des micelles. En effet, ils possèdent une surface hydrophile et un cœur hydrophobe.

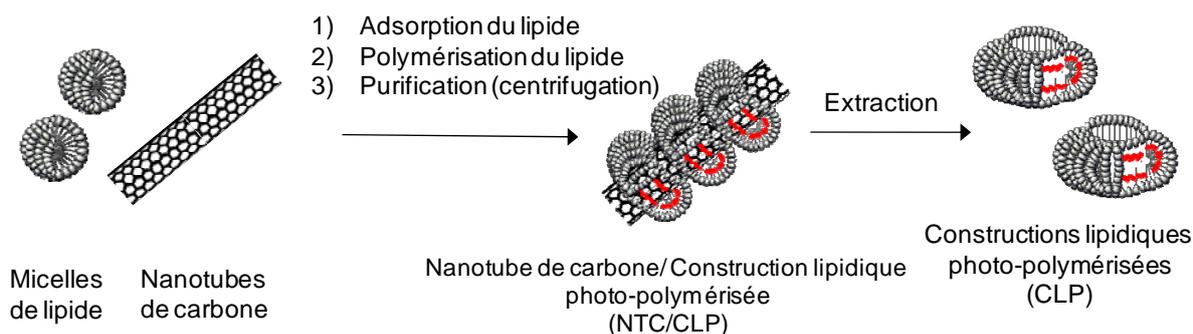


Figure 1 : Formation des CLP

Les lipides synthétiques utilisés pour la formation des CLP possèdent une tête polaire et une longue chaîne carbonée leur conférant leur propriété d'amphiphile (Figure 2). De plus, ils présentent un motif diacétylène polymérisable sous irradiation UV (254 nm) au centre de la chaîne carbonée.

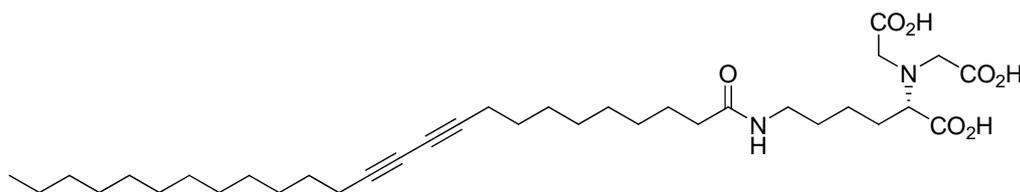


Figure 2 : Lipide précédemment utilisé (appelé lipide 11,8-NTA)

Ces CLP ont été utilisées précédemment pour la solubilisation de composés hydrophobes en milieu aqueux. L'objectif de ces travaux de thèse est de synthétiser des micelles polymérisées et des CLP dont la post-fonctionnalisation au sein du cœur hydrophobe sera possible grâce à l'utilisation de lipides fonctionnalisables (Figure 3). Ce manuscrit se décompose ainsi en cinq chapitres. Le premier présentera l'état de l'art sur la synthèse de nanoparticules organiques et leur fonctionnalisation, de même que l'auto-assemblage de lipides à la surface des nanotubes de carbone. Dans un deuxième chapitre, les synthèses des différents lipides envisagés seront exposées. Puis, dans un troisième chapitre, les formations et caractérisations des nano-objets lipidiques que sont les micelles polymérisées et les CLP seront développées. Le quatrième chapitre sera alors consacré à la fonctionnalisation interne des micelles non polymérisées et polymérisées à l'aide d'une sonde fluorescente par réaction « click » (Figure 3). Enfin, dans un cinquième chapitre, quelques applications de cette fonctionnalisation interne seront abordées.

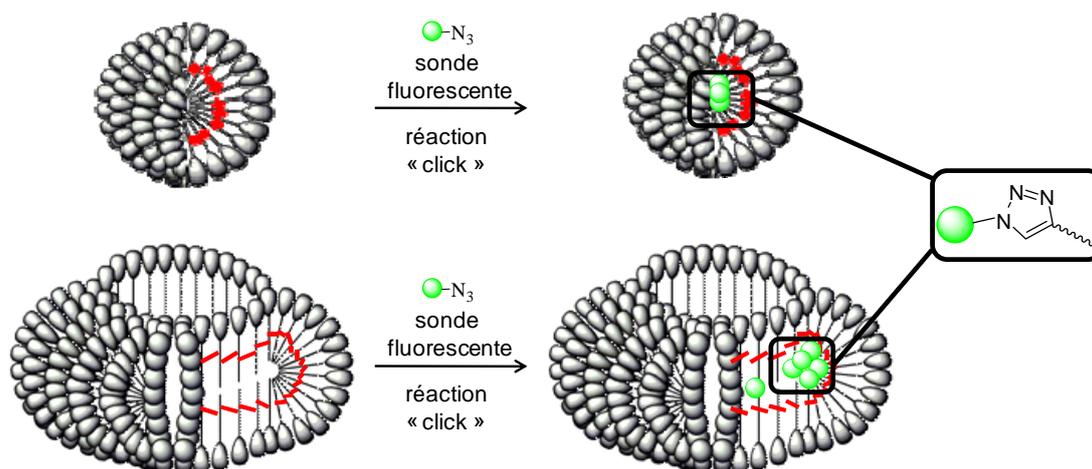


Figure 3 : Fonctionnalisation interne de micelles polymérisées et de CLP

Chapitre 1

-

*De la formation à la
fonctionnalisation
de nanoparticules organiques*

I – 1 : Introduction sur les nanosciences

Depuis les années 1980 est apparue une nouvelle et prometteuse discipline scientifique, les nanosciences. Leur essor est grandissant depuis le début des années 1990 (2300 publications en 1990, 18000 en 2000 et 10900 en 2009, analyse Sci Finder) et une cinquantaine de périodiques se consacre pleinement à ce domaine (ACS Nano, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Nano Letters...).

De très nombreux domaines sont concernés par les « nanos » mais l'application la plus importante à ce jour reste la nanoélectronique et son immersion dans l'informatique. Une part conséquente est également consacrée à la biologie et à la médecine avec pour exemples, l'encapsulation et la vectorisation de principes actifs.^{1,2,3,4,5,6} D'autres thématiques sont également étudiées comme par exemple le renforcement des matériaux par incorporation de nanoparticules⁷ ou encore la synthèse organique avec la formation et l'utilisation de nano-réacteurs.⁸

Afin de créer un système nanométrique, deux techniques différentes existent.^{9,10,11,12} La première, appelée « top-down », consiste à miniaturiser un dispositif existant. Cette méthode a été utilisée notamment en électronique afin de réduire la taille des composants. La seconde, dite « bottom-up », est à l'opposé l'assemblage atome par atome, ou molécule par molécule, permettant ainsi l'obtention d'architectures nanométriques aux fonctionnalités contrôlées.

Parmi les différents domaines des nanosciences, nous nous intéressons plus particulièrement à la synthèse et l'utilisation de nanoparticules organiques et notamment aux ***nanoparticules fluorescentes***. En effet, ces dernières peuvent trouver de nombreuses applications, notamment dans l'analyse ou le diagnostic médical. Leurs applications sont variées et elles peuvent être utilisées pour estimer la taille et l'importance des tumeurs,¹³ mais aussi pour déterminer l'activité des protéines kinases,¹⁴ ou encore pour l'imagerie apoptotique.¹⁵ Pour cela, le fluorophore ou l'agent de contraste, est encapsulé ou greffé de manière covalente aux nanoparticules par liaison chimique.

L'échelle des dimensions

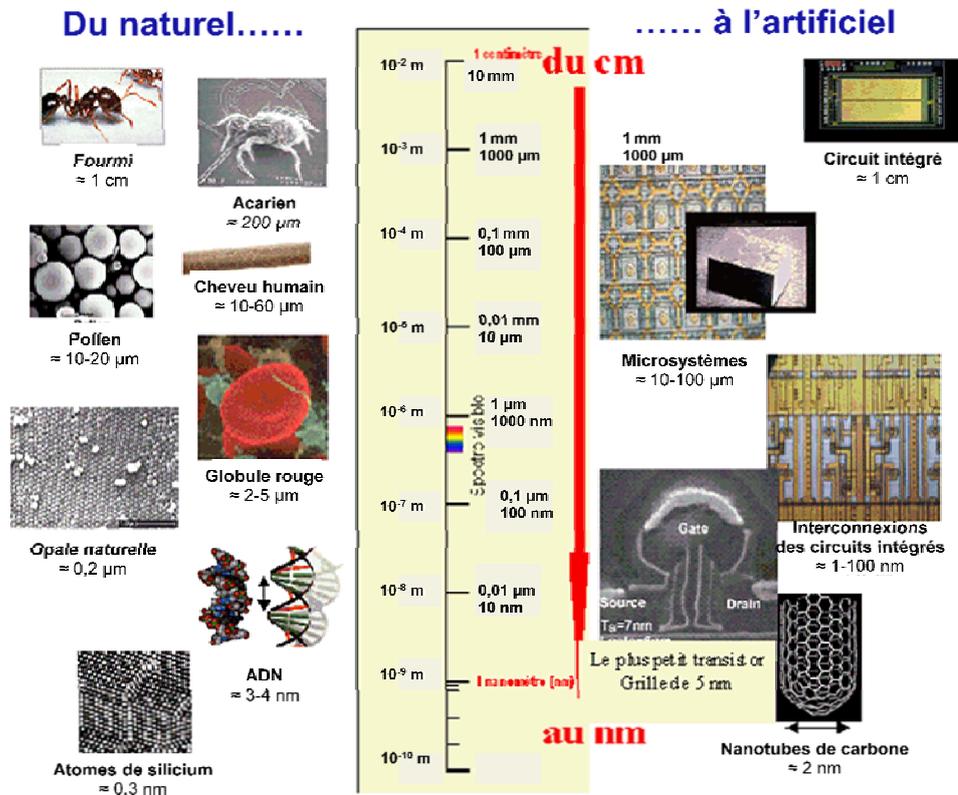


Figure I – 1 : Echelle de taille d'objets naturels et artificiels¹⁶

De ce fait, dans la suite de ce chapitre, plusieurs systèmes nanométriques seront développés permettant soit l'encapsulation soit le greffage covalent d'un composé fluorescent aux nanoparticules. On peut notamment citer parmi ces systèmes, des édifices lipidiques comme les micelles ou les liposomes, les micelles de polymère, les nanoparticules de polymère ou encore les dendrimères. Par la suite, un bref état de l'art sur l'auto-assemblage de lipides à l'interface solide-liquide sera présenté avant d'aborder plus précisément la formation de ces auto-assemblages lipidiques à la surface de nanotubes de carbone développés au sein de notre laboratoire.

I – 2 : Exemples de nanoparticules fluorescentes

I – 2 – 1 : Les auto-arrangements lipidiques

I – 2 – 1 – 1 : Généralités sur les lipides

Les lipides sont des composés naturels amphiphiles possédant une tête polaire et une chaîne carbonée. Les principales classes de lipides sont : les acides gras, les acylglycérols ou glycérides, les phospholipides divisés en deux sous-classes : les phosphoacylglycérols et les sphingolipides ou encore les stérols. (Figure I – 2).

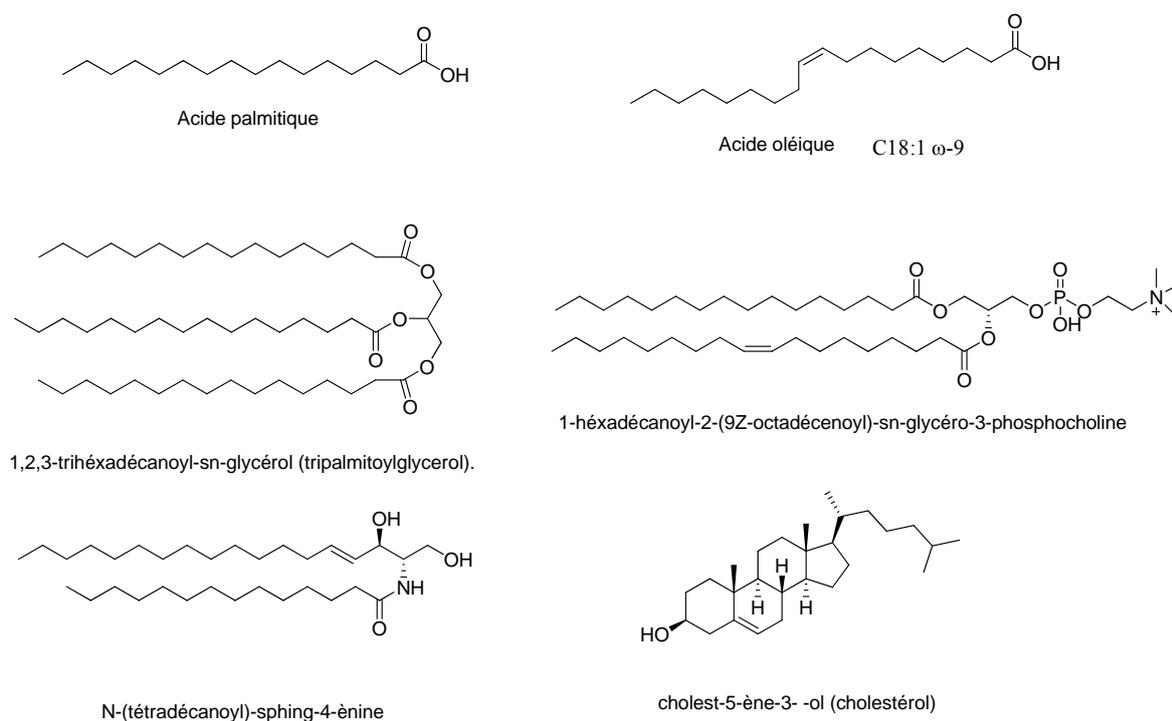


Figure I – 2 : Structures de différents lipides

En ce qui concerne les acides gras, le nom de l'acide provient du composé naturel dont était issu majoritairement cet acide. Par exemple, l'acide palmitique est le constituant principal de l'huile de palme, de même pour l'acide arachidique qui provient de l'huile d'arachide. La nomenclature dite physiologique permet quant à elle d'indiquer rapidement la nature du lipide. Elle est de forme générale : Cx:y ω -z, où x indique le nombre de carbones de la chaîne lipidique, y le nombre d'insaturations et ω -z la position de la première insaturation en partant du côté opposé à l'acide. La Figure I – 2 donne l'exemple de l'acide oléique.

Les acylglycérols proviennent de la condensation de un ou plusieurs acides gras sur le glycérol. Les termes usuels monoglycéride, diglycéride ou triglycéride correspondent au nombre de substituants sur le glycérol.

Par extension, sont appelés lipides de synthèse des molécules synthétiques possédant une longue chaîne carbonée et une tête polaire.

I – 2 – 1 – 2 : Formation des auto-arrangements lipidiques

Les lipides, qui sont généralement des composés amphiphiles, ont la particularité de pouvoir s'auto-organiser en milieu aqueux pour former différentes structures. De nombreux facteurs comme la température, la concentration ou le pH peuvent jouer un rôle sur cet assemblage.¹⁷ Un paramètre primordial est la géométrie même du lipide dont la nature va fortement influencer l'auto-assemblage observé. Israelachvili a proposé la définition d'un paramètre d'assemblage critique P afin de faciliter l'interprétation de ce phénomène.¹⁸ Ce paramètre P dépend :

- de la contribution hydrophobe qui conduit à l'agrégation des chaînes lipophiles
- d'un terme de surface prenant en compte l'équilibre des têtes polaires. Celles-ci tendent à la fois à se rapprocher afin de limiter les interactions entre la phase aqueuse et le domaine hydrophobe constitué des chaînes hydrophobes mais aussi à se repousser du fait des interactions électrostatiques répulsives
- d'un terme d'empilement exprimant l'exclusion de l'eau de la partie lipophile, et de la géométrie des agrégats engendrés par la tête hydrophile

Ce paramètre d'assemblage critique P se calcule selon la formule suivante :^{19,20,21}

$$P = v/(a_0 * l_c)$$

- v est le volume de la chaîne hydrophobe et calculé par :

$$v = 0,027 * (N_C + N_{Me}) \text{ (nm}^3\text{)}$$

où N_C est le nombre de carbones, N_{Me} le nombre de méthyles et 0,027 correspond au volume d'un méthyle en nm^3 .

- l_c est la longueur de la chaîne hydrophobe calculée par :

$$l_c = 0,15 + 0,127 * N_C \text{ (nm)}$$

où 0,15 correspond au rayon du méthyle terminal en nm et 0,127 est la longueur de la liaison carbone-carbone en nm

- a_0 est la surface de la tête polaire. Il est relativement difficile de calculer précisément la valeur de cette surface car elle dépend de nombreux paramètres comme le pH, la force ionique ou encore la concentration du lipide.

La valeur de ce paramètre P indique alors la nature de l'auto-assemblage (Figure I – 3):

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

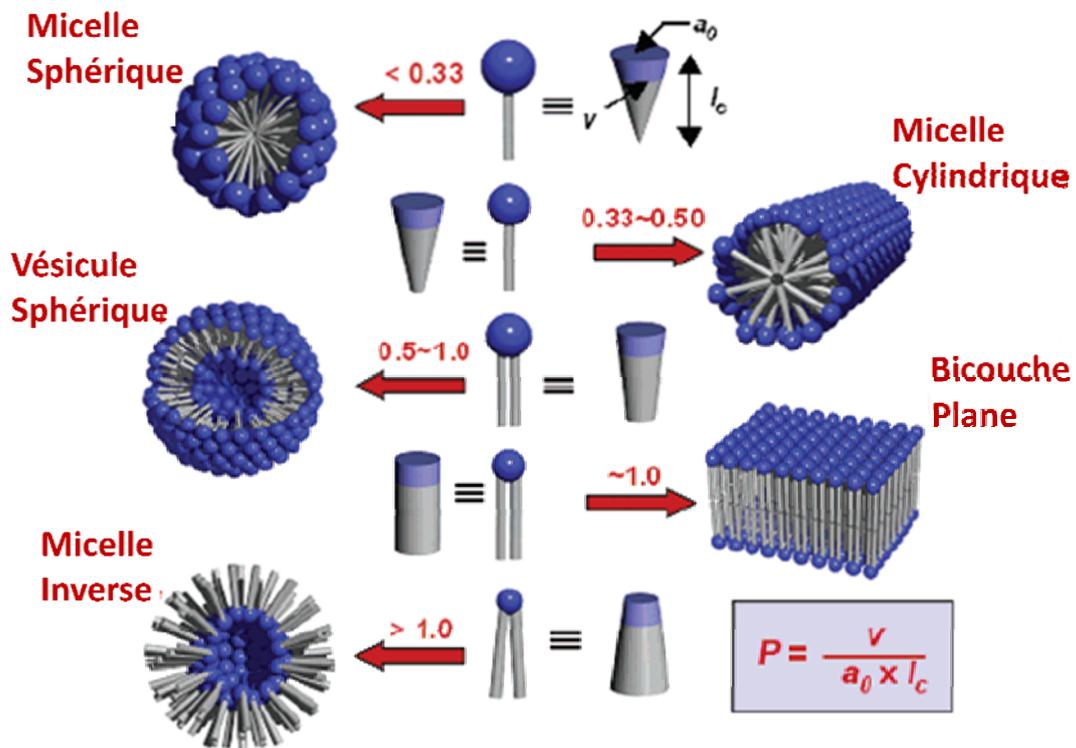


Figure I – 3 : Influence du paramètre P sur la nature de l'auto-assemblage formé

A partir de cette valeur P , les structures micellaires peuvent donc être prédites. Pour le cas du dodécylsulfate de sodium (SDS), le paramètre d'empilement critique P est de 0,36 ($v=0,35 \text{ nm}^3$, $a_0=0,6 \text{ nm}^2$, $l_c=1,7 \text{ nm}$). La structure de l'arrangement correspond à des micelles qui sont à la frontière entre des micelles sphériques et des micelles cylindriques. Les phospholipides appartenant aux membranes cellulaires forment des bicouches lipidiques. En effet, si l'on prend comme exemple la phosphatidylcholine, le paramètre P est de 0,74 ($v=0,84 \text{ nm}^3$, $a_0=0,63 \text{ nm}^2$, $l_c=1,8 \text{ nm}$) ce qui correspond bien à des bicouches sphériques.

I – 2 – 1 – 3 : Les micelles de lipide

I – 2 – 1 – 3 – a : Formation des micelles

La formation des micelles dépend de leur concentration et de la température. En effet, en dessous d'une certaine concentration, appelée Concentration Micellaire Critique (CMC), les chaînes lipidiques se désunissent. De même, la Température Micellaire Critique (TMC), ou température de Krafft, est la température à partir de laquelle les lipides s'auto-assemblent en micelles. Elles peuvent se former si la concentration est supérieure à la concentration micellaire critique et si la température est supérieure à la température micellaire critique. Les micelles peuvent être sphériques, cylindriques ou inverses. D'une façon générale, la taille des micelles varie de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres pour les micelles cylindriques. Les micelles inverses ont la propriété d'être solubles dans les milieux lipophiles alors que les micelles directes sont solubles en milieu aqueux. Le terme générique de micelles est employé pour les micelles directes sphériques et sera donc utilisé dans la suite du manuscrit pour ce type d'arrangement.

I – 2 – 1 – 3 – b : Application des micelles

Grâce à leur structure possédant un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile, les micelles permettent l'encapsulation de composés hydrophobes en milieu aqueux. Ces derniers, insolubles dans l'eau, interagissent avec les chaînes lipidiques afin de minimiser l'énergie libre du système, et peuvent donc ainsi être solubilisés par la micelle. La majeure partie des applications d'encapsulation par les micelles concerne les principes actifs.²²

L'objectif est alors d'éviter la précipitation du composé et ainsi d'améliorer la biodisponibilité du composé dans l'organisme.

Le greffage covalent sur de tels objets s'effectue sur la surface, à savoir sur la partie hydrophile.^{23,24} Parmi les réactions permettant de réaliser le greffage, la plus connue est le couplage peptidique entre une fonction acide généralement activée présente à la surface de la micelle et la fonction amine du composé à greffer ou d'un bras espaceur. Afin de conserver les propriétés intrinsèques de la micelle, seule une faible partie de ses fonctions réactives est utilisée pour la fonctionnalisation. Parmi les applications les plus courantes, la surface peut être fonctionnalisée par des molécules permettant la vectorisation de la micelle au sein de l'organisme afin de libérer le principe actif dans une région ciblée. Il est également possible de former des micelles fluorescentes par auto-organisation de lipide fluorescent pré-fonctionnalisé soit incorporé lors de la formation des micelles évitant ainsi l'étape de post-fonctionnalisation.²⁵

I – 2 – 1 – 4 : Les liposomes

Les liposomes, découverts en 1965 par Bangham,²⁶ et les vésicules sont des nano-objets sphériques constitués d'une ou de plusieurs bicouches et possédant une cavité aqueuse. Le terme de liposome est généralement réservé aux particules formées à partir de lipides et plus particulièrement de phospholipides, alors que les vésicules sont généralement formées de polymères. Comme nous l'avons vu précédemment, le paramètre d'empilement critique P nécessaire à la formation de ces espèces se situe entre 0,5 et 1.

I – 2 – 1 – 4 – a : Formation des liposomes

Les liposomes et vésicules sont préparés par différentes techniques selon la taille et les caractéristiques souhaitées.^{27,28} La voie la plus aisée est la méthode d'hydratation d'un film mince qui conduit à la formation de vésicules multilamellaires (MLV pour Multilamellar Large Vesicles). Cette méthode consiste à évaporer une solution organique contenant le lipide et à resuspendre le résidu dans une solution aqueuse. La seconde méthode d'obtention de vésicules multilamellaires consiste à ajouter une solution organique de lipide dans une solution aqueuse sous forte agitation, puis à éliminer le solvant organique par évaporation.

Une fois filtrée, la solution contient des particules dont la taille est comprise entre 1 et 5 μm et qui sont composées de nombreuses couches concentriques. Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV pour Small Unilamellar Vesicles) sont généralement obtenues par sonication des vésicules multilamellaires et sont les assemblages les plus étudiés. Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUV pour Large Unilamellar Vesicles) sont principalement formées par des cycles répétés de congélation/décongélation des vésicules multilamellaires, le but étant de fragiliser les membranes et de favoriser la recombinaison en vésicules unilamellaires. Enfin, les vésicules géantes (GUV pour Giant Unilamellar Vesicles) sont quant à elles synthétisées par électroformation. Cette méthode consiste à placer une électrode à proximité d'un film mince et à déclencher un courant alternatif.

Les liposomes ou vésicules peuvent être classés ainsi en quatre catégories selon leur taille et leur structure :²⁹

- **Les vésicules multilamellaires** (MLV pour Multilamellar Large Vesicles) dont la taille varie entre 500 nm et 5000 nm et constituées de plusieurs bicouches lipidiques concentriques
- **Les vésicules unilamellaires de petite taille** (SUV pour Small Unilamellar Vesicles) dont la taille est d'environ 100 nm et formées d'une seule bicouche lipidique
- **Les vésicules unilamellaires de grande taille** (LUV pour Large Unilamellar Vesicles) dont la taille est comprise entre 200 nm et 800 nm
- **Les vésicules unilamellaires géantes** (GUV pour Giant Unilamellar Vesicles) dont la taille est supérieure à 1000nm.

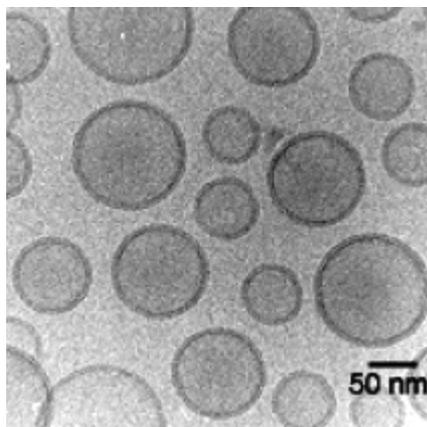
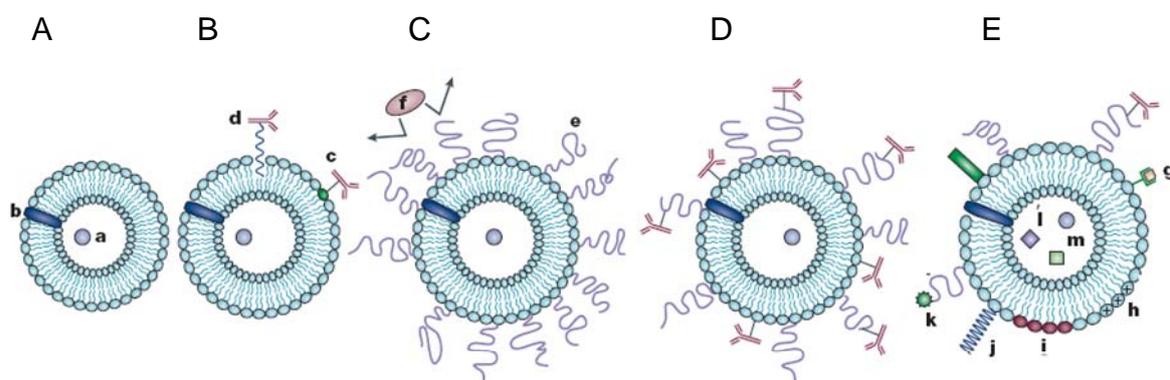


Figure I – 4 : Clichés de microscopie électronique à transmission de SUV

I – 2 – 1 – 4 – b : Fonctionnalisation des liposomes

La fonctionnalisation est généralement utilisée afin de former des liposomes complexes dont les applications sont de plus en plus spécifiques. Les applications des liposomes sont centrées principalement sur la solubilisation de principes actifs. Alors que l'encapsulation de composés peut avoir lieu soit dans la membrane hydrophobe soit dans la cavité hydrophile,³⁰ la fonctionnalisation des liposomes par greffage covalent concerne quant à elle la surface hydrophile.^{31,32}



A) et B) liposomes de 1^{ère} génération. C) et D) liposomes de 2^{ème} génération. E) liposome 3^{ème} génération. a) Principe actif encapsulé dans la phase aqueuse interne ou b) incorporé dans la membrane lipidique. c) anticorps fixé de manière covalente sur la surface ou d) incorporé dans la membrane. e) polymère protecteur pour les liposomes à circulation lente, tel que les PEG. f) protéine risquant de dégrader le liposome. g) incorporation d'une sonde de diagnostic ou h) de lipides chargés positivement ou i) de polymère sensible à des stimuli ou j) de peptides permettant la pénétration cellulaire ou k) de composés viraux. l) sonde d'imagerie de microscopie. m) particule magnétique

Figure I – 5 : Fonctionnalisation des liposomes fournissant différentes générations de liposomes

Les liposomes sont classés en différentes catégories³³ :

- Les liposomes de première génération sont des liposomes classiques (Figure I – 5A) ou possédant un agent de ciblage greffé de manière covalente à leur surface (Figure I – 5B). Ils peuvent contenir soit des composés hydrophobes dans leur bicouche lipidique, soit des composés hydrophiles dans leur cavité interne.
- Les liposomes de seconde génération (Figure I – 5C et D) possèdent les mêmes caractéristiques que les liposomes de 1^{ère} génération, avec en plus une surface permettant une protection du liposome vis-à-vis d'agressions extérieures et donc une circulation prolongée dans le corps humain. Généralement cette surface est constituée de motifs polyéthylène glycol.

- Les liposomes de troisième génération (Figure I – 5E) quant à eux présentent en plus, des agents de diagnostique, de complexation ou d'imagerie. Ces liposomes possèdent de nombreuses fonctions qui peuvent être introduites après formation par modification chimique de la surface externe. Les trois réactions principales mises en jeu dans ce type de greffage sont les couplages peptidiques, les réactions entre les pyridyldithiols et les thiols formant des liaisons disulfures, et les réactions entre des maleimides et des thiols formant des liaisons thioéthers.

I – 2 - 2 : Les micelles de polymère

Les micelles de polymère désignent des solutions colloïdales composées de polymères amphiphiles possédant des domaines hydrophiles et hydrophobes bien distincts.^{34,35}

I – 2 – 2 – 1 : Formation des micelles de polymère

En solution aqueuse, les polymères amphiphiles s'auto-organisent pour former des arrangements supramoléculaires possédant un cœur (« core » en anglais) hydrophobe et une coque (« shell » en anglais) hydrophile. La taille des particules est variable et est comprise entre 10 nm et 100 nm. Comme pour les micelles de lipide, la formation de ces édifices se réalise si leur concentration en solution est supérieure à leur CMC. Cependant, leur CMC est généralement plus faible que celle des micelles de lipide.

Afin d'améliorer la stabilité et la polydispersité des micelles de polymère, une réticulation est généralement réalisée. Après formation des micelles, la réticulation peut avoir lieu soit dans le cœur³⁶ soit dans la partie hydrophile (Figure I – 6).³⁷

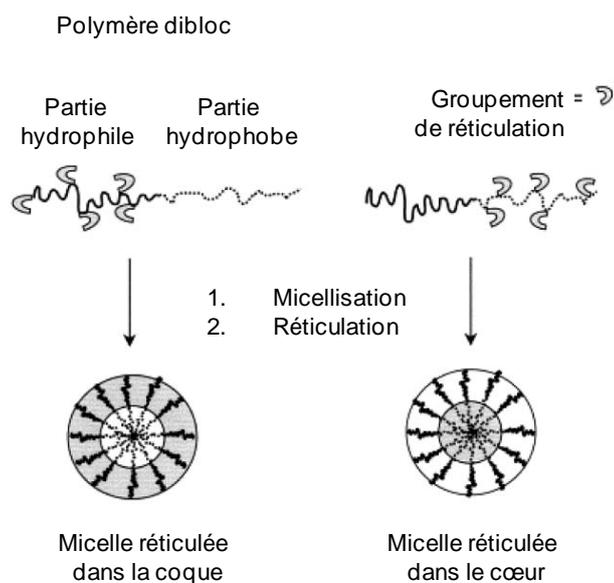


Figure I – 6 : Formation de micelles de polymère et réticulation³⁷

Après formation et réticulation de la micelle, la fonctionnalisation de cette dernière peut alors s'effectuer.

I – 2 – 2 – 2 : Fonctionnalisation des micelles de polymère

La littérature portant sur la fonctionnalisation de micelles de polymère est abondante.³⁸ Cependant, peu d'exemples relatent l'utilisation de molécules fluorescentes pour la fonctionnalisation de ces nanoparticules. Le groupe de Wooley a montré qu'il était possible de fonctionnaliser soit la coque hydrophile, soit le cœur hydrophobe d'une micelle de copolymère polystyrène-polyacide méthacrylique (PS-PMA) en fonction du type de préparation de la micelle.^{39,40} Il s'agit alors de synthétiser le polymère amphiphile possédant les fonctions qui serviront au greffage dans les blocs souhaités (hydrophobe ou hydrophile).⁴¹ Après micellisation et polymérisation, le groupement réactif se trouve alors dans le domaine désiré. Pour une fonctionnalisation de la surface hydrophile, Wooley *et coll.* ont synthétisé un polymère avec une fonction azoture nécessaire au greffage par réaction « click », se situant au niveau des acides méthacryliques (Figure I – 7). En revanche, pour une fonctionnalisation du cœur, la fonction réactive, à savoir l'alcyne, est insérée sur les noyaux aromatiques de la partie styrénique (Figure I – 8).

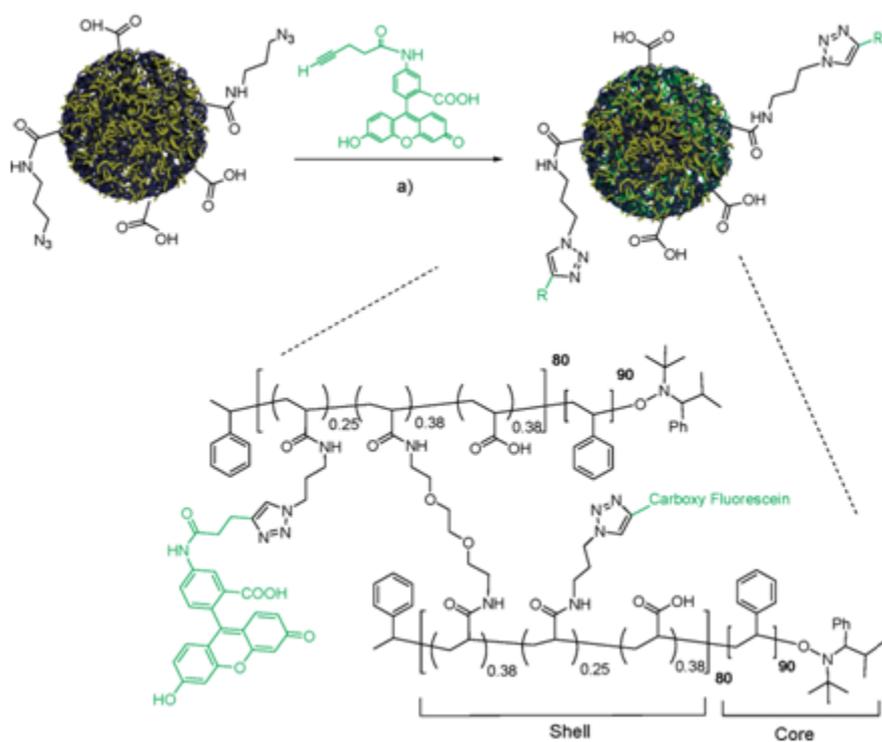


Figure I – 7 : Fonctionnalisation de la partie hydrophile de la micelle

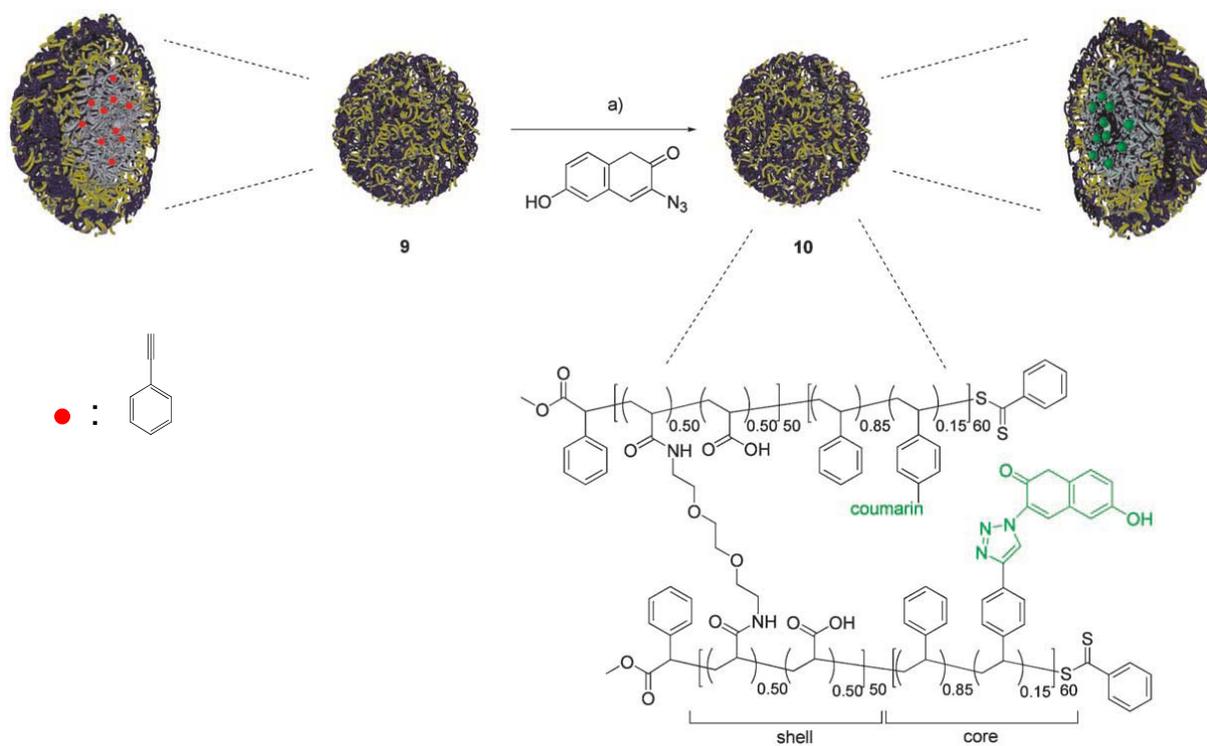


Figure I – 8 : Fonctionnalisation de la partie hydrophobe de la micelle

L'analyse de la fonctionnalisation de ces micelles polymériques s'effectue par ultracentrifugation analytique combinée à de l'absorption UV-visible permettant ainsi la vérification du greffage des micelles.⁴²

I – 2 – 3 : Les nanoparticules de polymère

Les nanoparticules de polymère sont des solutions colloïdales de sphères de polymère. Elles permettent également la formation de nano-objets fluorescents par incorporation d'un fluorophore pendant la polymérisation ou par post-fonctionnalisation de la nanoparticule.

I – 2 – 3 – 1 : Formation des nanoparticules de polymère

La synthèse de ces polymères peut s'effectuer soit par la méthode de nano-précipitation, soit par la méthode de polymérisation en émulsion. La méthode de nano-précipitation consiste à solubiliser le polymère dans un solvant organique miscible à l'eau et à l'ajouter à une solution aqueuse, avec ou sans tensio-actif.^{43,44} Lors de l'addition dans la phase aqueuse sous haute agitation, le solvant organique diffuse et conduit à la précipitation rapide du polymère et à la formation de nano-sphères. Les nanoparticules peuvent également être formées directement par polymérisation en émulsion. Dans un premier temps, l'initiateur de polymérisation, le monomère et l'agent de réticulation sont mélangés pour constituer la phase organique. Une solution aqueuse de tensio-actif est alors ajoutée lentement. Après agitation vigoureuse, une émulsion est obtenue et le milieu est chauffé pour initier la polymérisation. Des particules de polymère de taille comprise entre 200 nm et quelques μm sont ainsi obtenues. La technique de mini-émulsion permet quant à elle de fournir des particules de plus petite taille. Dans cette technique, une fois le mélange des deux phases réalisé, une étape d'ultra-sonication est effectuée afin de créer une émulsion encore plus fine. Un agent hydrophobe, généralement l'hexadécane, est alors ajouté afin de stabiliser les nanoparticules formées. Le milieu est enfin polymérisé. Après élimination par dialyse du tensio-actif et des éventuelles traces de monomère n'ayant pas réagi, des nanoparticules de polymère dont la taille est inférieure à 200 nm sont alors obtenues (Figure I – 9).

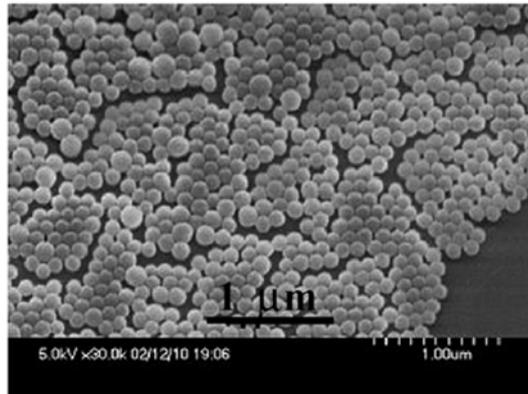


Figure I – 9 : Image par Microscopie Electronique à Balayage de nanosphères de polymère réalisées par mini-émulsion⁴⁸

I – 2 – 3 – 2 : Encapsulation et greffage au sein des nanoparticules de polymère

Parmi les nombreuses fonctions incorporées dans les nanoparticules de polymères, les sondes fluorescentes ont été particulièrement étudiées. Pour synthétiser des particules fluorescentes, la technique la plus aisée à mettre en œuvre est l'encapsulation de fluorophores.⁴⁵ Il est à noter qu'une incorporation directe peut également avoir lieu lors de la formation même des nanoparticules. Une première méthode concerne l'encapsulation directe du fluorophore lors de la formation des nanoparticules.⁴⁶ Le fluorophore est alors additionné au mélange monomère-agent de réticulation-initiateur de polymérisation. Lors de la polymérisation, la sonde est emprisonnée au sein du polymère. La matrice sert alors d'agent de protection face aux agressions du milieu extérieur. Un greffage covalent du fluorophore peut également avoir lieu directement lors de la polymérisation.⁴⁷ Dans ce cas, le fluorophore doit posséder un groupement polymérisable et évidemment résister aux conditions de polymérisation. Cette technique permet une répartition homogène du fluorophore. De plus, grâce à cette méthode, le fluorophore est lié de façon covalente aux chaînes de polymère, ce qui limite son extraction de la matrice polymérique.⁴⁸

L'encapsulation directe du fluorophore est une des applications les plus aisées à mettre en œuvre. De nouveaux matériaux fonctionnels peuvent alors être créés grâce à cette méthode. Des applications comme la détection d'ions en solution ont pu être réalisées grâce à des phénomènes de transfert de fluorescence entre différents fluorophores encapsulés dans les

nanoparticules de polymère.⁴⁹ Cependant, pour des applications plus spécifiques, il est possible de lier de manière covalente la sonde au sein de la matrice polymérique.

I – 2 – 4 : Les dendrimères

Le mot dendrimère provient du grec « dendron » (arbre, branche) et « meros » (partie). Les dendrimères sont une classe de macromolécules monodisperses ayant une architecture tridimensionnelle très ramifiée et possédant un nombre important de groupements fonctionnalisables en surface (Figure I – 10).⁵⁰

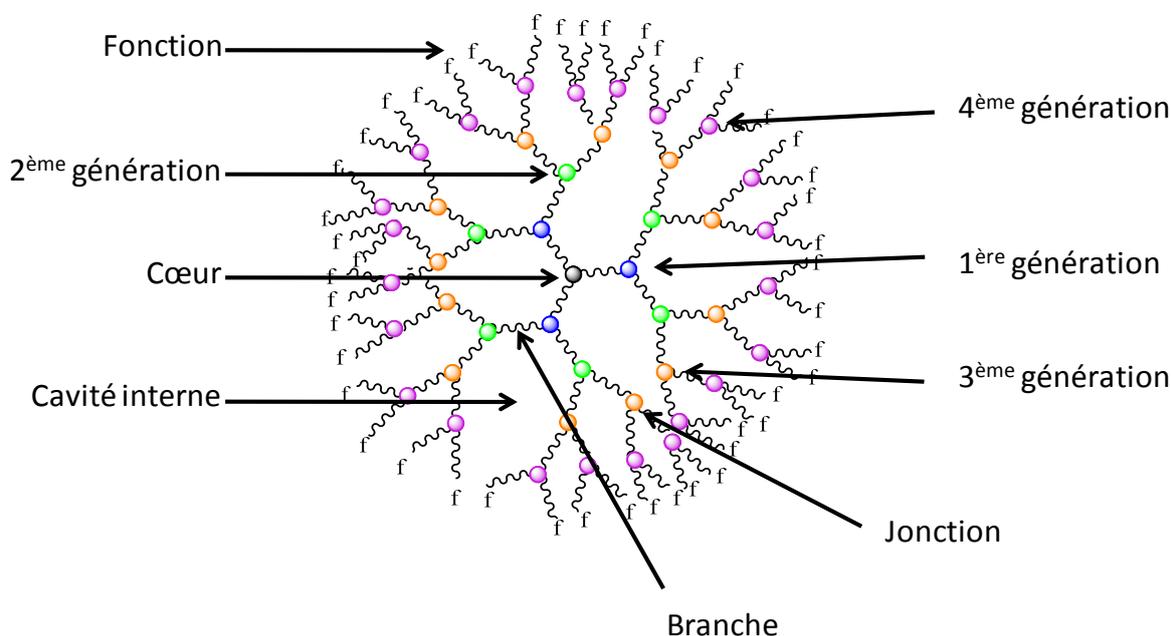


Figure I – 10 : Schéma d'un dendrimère de quatrième génération

Le dendrimère est constitué d'un motif central auquel sont connectés des dendrons qui peuvent être divisés en trois régions : le cœur, l'intérieur (composé des branches dendritiques connectées au cœur) et la périphérie. Le nombre de branches entre le cœur et la périphérie définit la génération du dendrimère. De façon générale, plus la génération est élevée, plus les ramifications sont nombreuses et plus le nombre de groupements fonctionnels en périphérie est important. Les dendrimères peuvent avoir une géométrie plane ou une architecture tridimensionnelle (Figure I – 11).

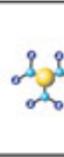
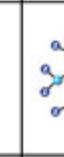
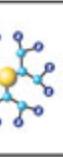
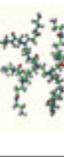
Generation	G0	G1	G2	G3	G4
# of Surface Groups	3	6	12	24	48
Diameter (nm)	1.4	1.9	2.6	3.6	4.4
2D Graphical Representation					
3D Chemical Structure View					

Figure I – 11 : Exemples de dendrimères de différentes générations

I – 2 – 4 – 1 : Synthèse des dendrimères

Deux approches différentes⁵¹ permettent de synthétiser les dendrimères (Figure I – 12):

- L'approche divergente consiste à construire le dendrimère à partir du cœur, génération après génération. Le but est d'augmenter le nombre de sites réactifs à chaque étape. Cette méthode, utilisée industriellement, a le désavantage de multiplier le nombre de réactions et d'accroître le nombre de réactions parasites à chaque étape, fournissant ainsi des dendrimères de taille très variable.
- L'approche convergente consiste à construire les dendrons séparément à partir de la périphérie. Une fois synthétisés, les dendrons sont attachés au cœur pour conduire au dendrimère souhaité. Cette méthode conduit généralement à des dendrimères plus homogènes.

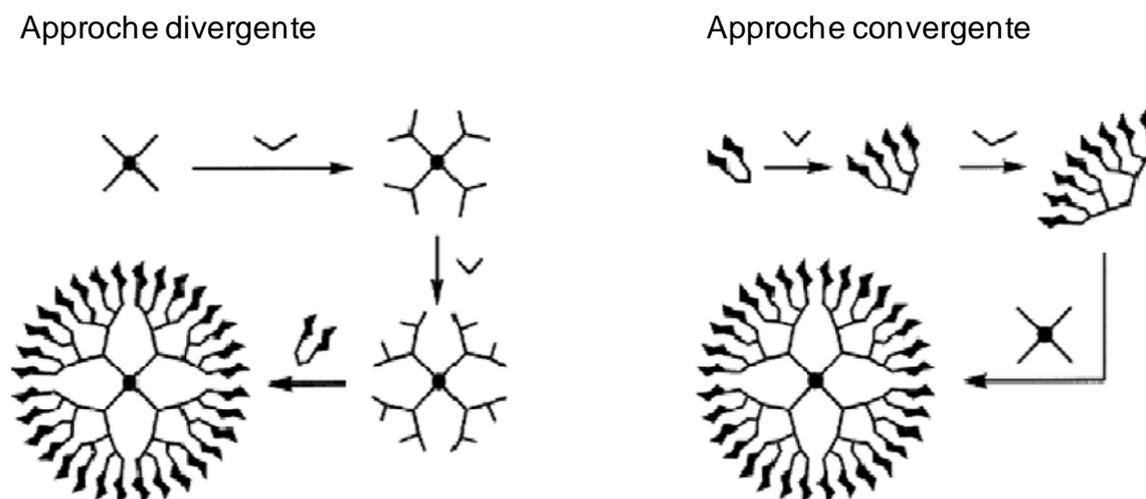


Figure I – 12 : – Approches de synthèse de dendrimères

I – 2 – 4 – 2 : Insertion de fluorophores au sein des dendrimères

Divers composés peuvent être incorporés au sein de ces architectures tridimensionnelles. La voie non covalente a d'abord été utilisée pour la solubilisation de composés hydrophobes par les dendrimères.^{52,53,54,55} Dans les générations élevées, les cavités internes libres entre les dendrons permettent une insertion du composé. Différentes interactions au sein du dendrimère entraînent une stabilisation du composé (liaisons hydrogène ou interactions ioniques) suivant la nature des jonctions. Ces dernières dépendent du motif utilisé pour la synthèse, le motif le plus courant étant le polyamidoamine (PAMAM),⁵⁶ mais d'autres tels que les poly(éthers d'aryle), les polyamines ou encore les polyesters sont également utilisés.

L'autre méthode d'incorporation de molécules consiste à greffer celles-ci directement au dendrimère. La première voie consiste à lier le fluorophore au cœur du système (Figure I – 13, exemple 1). Le dendrimère ainsi formé possède généralement un seul fluorophore comme les dendrimères centrés autour d'une porphyrine.⁵⁷ Des dendrimères asymétriques, possédant un fluorophore relié à un dendron, sont également utilisés. Bright *et coll.*⁵⁸ ont par exemple synthétisé des dendrimères comportant un pyrène au sein de la structure et leurs études ont notamment montré la difficulté d'accès grandissante d'inhibiteurs de fluorescence à l'espèce fluorescente au fur et à mesure des générations dendritiques. La deuxième voie utilise, quant à elle, le greffage en surface (Figure I – 13, exemples 2 et 3). Il s'agit alors généralement d'une multi-fonctionnalisation dans le sens où plusieurs molécules fluorescentes sont liées de façon

covalente à un seul dendrimère. L'équipe de Mier⁵⁹ a récemment publié ses travaux sur la fonctionnalisation de dendrimères PAMAM avec différents fluorophores en surface et a montré que seul le dansyl permettait à la fois un bon taux de greffage et une augmentation significative de l'intensité de fluorescence au cours des générations. Dans certains cas, le fluorophore greffé en surface peut perturber la solubilisation de l'ensemble du dendrimère. Pour contrer cet effet indésirable, des groupements solubilisant, tels que des amines, peuvent être rajoutés au sein du dendrimère, notamment le long des branches. Une autre possibilité consiste à synthétiser des dendrimères spécifiques, dits « Janus » (Figure I – 13, exemple 4).^{60,61} Ces derniers sont en fait composés de deux dendrons reliés entre eux, possédant chacun une fonctionnalité différente : un dendron permettra la solubilisation et l'autre portera les groupements fluorescents.

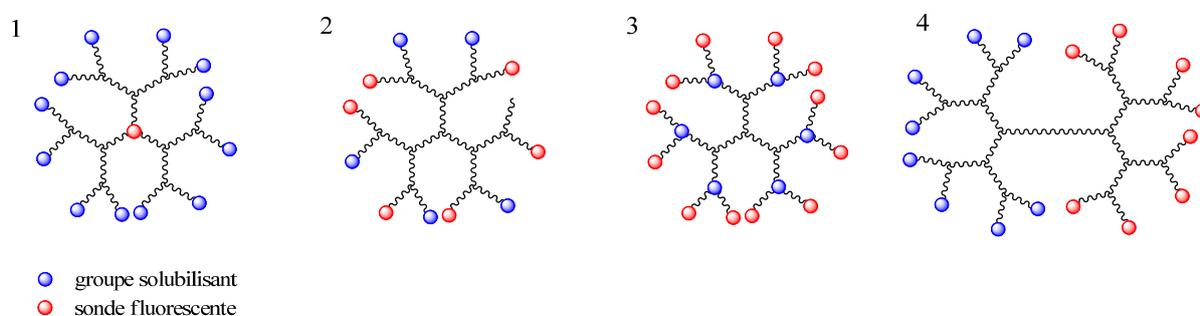


Figure I – 13 : Dendrimères fonctionnalisés : 1) au cœur, 2) et 3) en périphérie 4) dendrimère « Janus »

Les dendrimères permettent de nombreuses approches aussi bien en termes de fonctionnalisation (covalente ou non), qu'en terme de localisation (cœur ou périphérie). Cependant, chaque application future du dendrimère impose de synthétiser un dendrimère unique qui sera la plupart du temps pré-fonctionnalisé.

I – 3 : Antécédent au laboratoire : Les Constructions Lipidiques Photo-polymérisées (CLP)

Pour notre part, nous nous sommes intéressés au laboratoire à la formation d'auto-assemblages d'amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone, puis à leur extraction et

utilisation. Toutefois, avant d'étudier la formation de ces assemblages, faisons un bref état de l'art sur les auto-assemblages lipidiques rapportés dans la littérature à l'interface solide-liquide.

I – 3 – 1 : Auto-arrangements lipidiques à l'interface solide-liquide

Les tensio-actifs peuvent former différents auto-assemblages en solution selon la nature du tensio-actif utilisé. Dès le début des années 1990, ces auto-arrangements ont été étudiés non plus en solution, mais à l'interface solide-liquide. Le groupe de Manne et Gaub a montré, à partir de 1994, la formation d'assemblages de lipides sur différentes surfaces par microscopie à force atomique.^{62,63} En 1996, Aksay *et coll.* ont montré avec le dodécylsulfate de sodium (SDS), que des arrangements hémi-cylindriques parfaitement alignés les uns aux autres se formaient sur des surfaces hydrophobes telles que du graphite (Figure I – 14).⁶⁴ Ceci s'explique par le fait que les chaînes lipophiles du tensio-actif interagissent avec la surface hydrophobe du graphite grâce à des liaisons de type Van Der Waals.

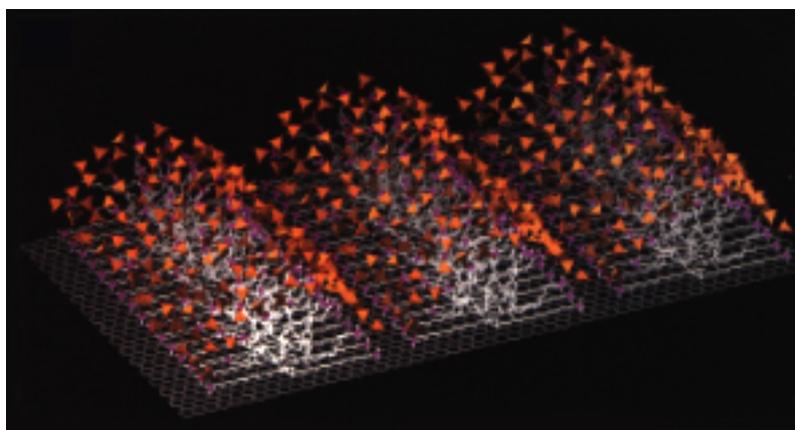


Figure I – 14 : Auto-arrangements hémi-cylindriques de SDS sur une surface de graphite

Des résultats similaires ont été obtenus par le groupe de Wanless et Ducker avec le SDS et le graphite.⁶⁵ Cette étude conforta l'hypothèse de l'arrangement hémi-cylindrique sur les surfaces hydrophobes et montra l'influence de la force ionique sur l'espacement entre les hémi-cylindres (diminution des espaces lorsque la force ionique augmente). D'autres études similaires ont été effectuées avec d'autres tensio-actifs sur ces différentes surfaces afin de prouver la généralisation du comportement.^{66,67}

I – 3 – 2 : Description et formation des constructions lipidiques photo-polymérisées (CLP)

I – 3 – 2 – 1 : Premières observations d'auto-arrangements lipidiques à la surface de nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone peuvent être considérés de manière schématique comme des feuilles de graphite enroulées sur elles-mêmes. Ces composés extrêmement hydrophobes, s'agrègent et sédimentent rapidement en milieu aqueux. Or, il a été montré en 1997 qu'une solution de SDS permet de former des suspensions stables de nanotubes de carbone.⁶⁸ En effet, l'adsorption du SDS à la surface des nanotubes de carbone engendre une distribution de charges négatives qui empêche l'agrégation des nanotubes par répulsion électrostatique. Cependant, l'organisation même de l'amphiphile adsorbé sur les nanotubes de carbone n'avait pas été étudiée. En s'inspirant des travaux effectués sur les surfaces de graphite, le Dr C. Mioskowski *et. coll.* ont voulu vérifier en 2003, par Microscopie Electronique à Transmission (MET), si le SDS formait des arrangements particuliers à la surface des nanotubes de carbone.^{69,70} Conformément aux études précédentes réalisées sur les auto-arrangements à l'interface solide-liquide, trois arrangements pouvaient être observés à la surface du nanotube :

- Un recouvrement complet et mono-couche de la paroi du nanotube par le SDS (Figure I – 15 – A)
- Un arrangement hémi-cylindrique parallèlement à l'axe du nanotube (Figure I – 15 – B)
- Un arrangement hémi-cylindrique perpendiculairement à l'axe du nanotube formant ainsi des anneaux (Figure I – 15 – C)

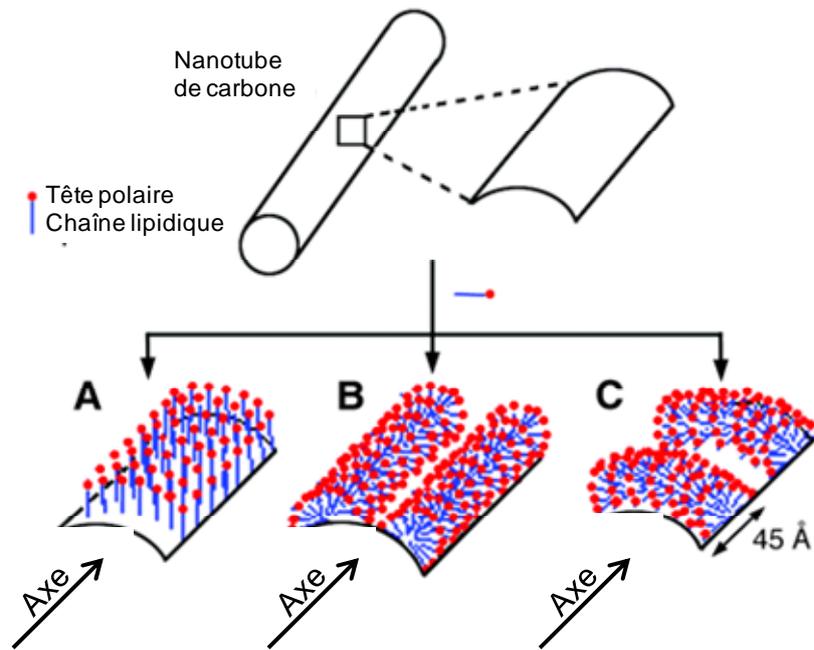


Figure I – 15 : Différents arrangements possibles du SDS à la surface des nanotubes de carbone

Lors de cette étude réalisée au laboratoire, il a été montré que le SDS s’auto-rangeait à la surface des nanotubes sous forme d’hémi-cylindres perpendiculaires à l’axe du nanotube de carbone. Les striations observées ont une largeur de $45 \pm 5 \text{ \AA}$, valeur similaire à celle observée par Ducker sur le graphite en 1995 qui était de 46 \AA (Figure I – 16).⁷¹

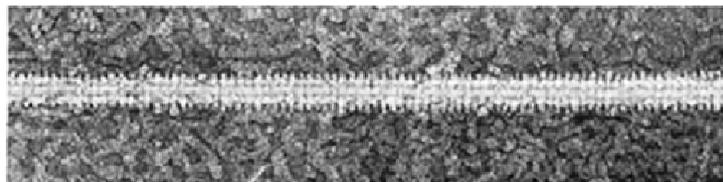


Figure I – 16 : Formation d’hémi-cylindres perpendiculaires à l’axe du nanotube de carbone

D’autres amphiphiles ont également été testés qu’ils soient cationiques (tête ammonium quaternaire) ou anioniques comme les lipides possédant une tête polaire acide nitrilotriacétique (NTA) (Figure I – 17).

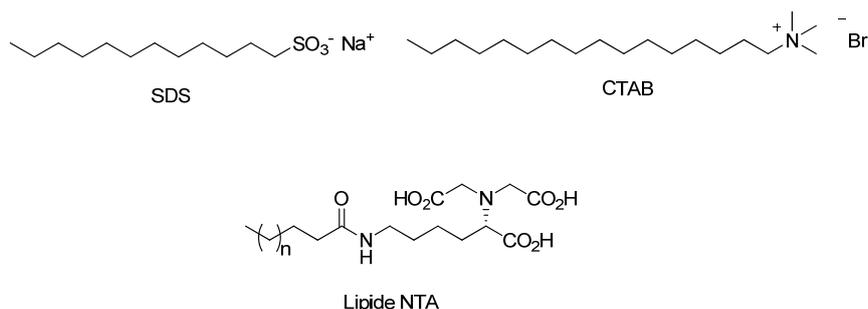


Figure I – 17 : Différents lipides permettant la formation d'hémi-cylindres à la surface des nanotubes de carbone

Suite à ces travaux, le laboratoire s'est intéressé à l'étude même de ces auto-arrangements lipidiques et de ce fait à leur extraction (Figure I – 18). Des amphiphiles photopolymérisables possédant une fonction diacétylène ont alors été synthétisés (Figure I – 18).⁷¹

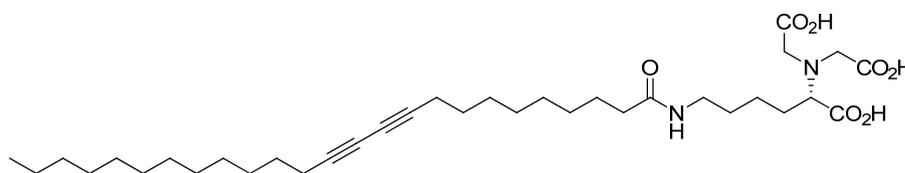


Figure I – 18 : Lipide permettant la formation de CLP (lipide 11,8-NTA)

L'auto-assemblage de ces molécules a également été observé sur les parois des nanotubes. Afin de stabiliser les auto-arrangements obtenus, une irradiation UV est ensuite réalisée. Une fois la photo-polymérisation effectuée, les édifices supramoléculaires peuvent être séparés de leur support carboné pour fournir alors les CLP en solution aqueuse (Figure I – 19)

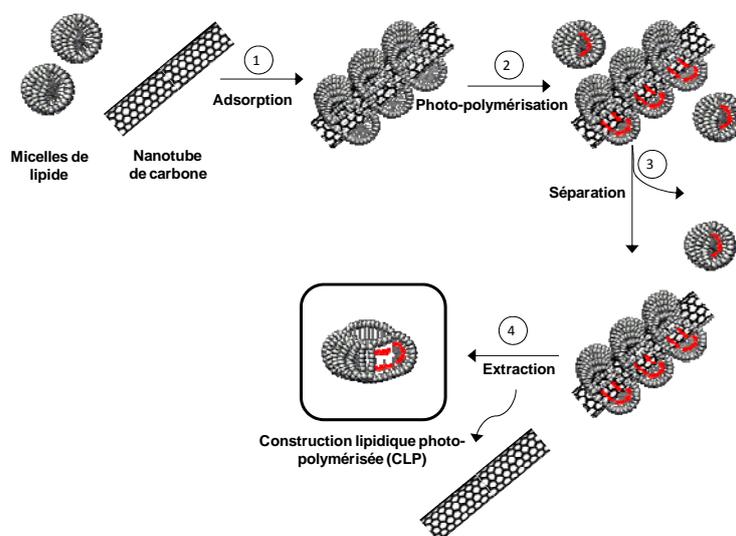


Figure I – 19 : Formation de constructions lipidiques photo-polymérisées (CLP)

Les CLP alors obtenues peuvent être considérées comme des arrangements de lipides offrant une surface externe hydrophile et un cœur hydrophobe (Figure I – 20). Idéalement, le cœur hydrophobe possède une cavité provenant de la mémoire du nanotube de carbone initialement présent. Cependant, cette cavité n'a jamais pu être observée jusqu'à ce jour.

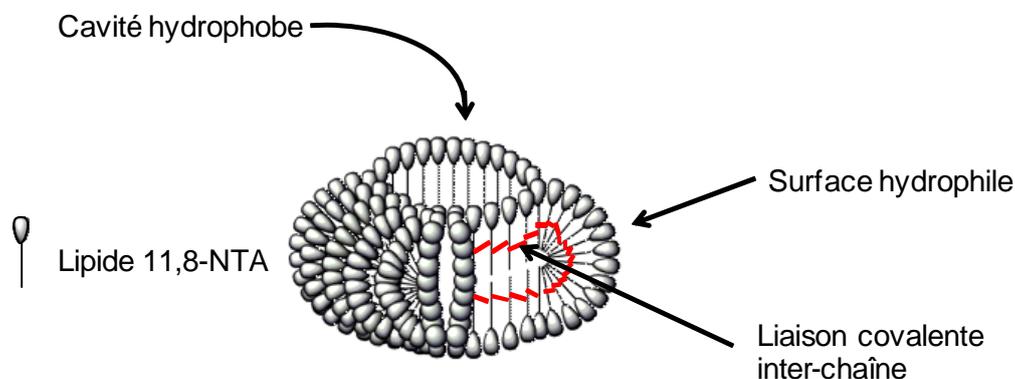


Figure I – 20 : Représentation idéalisée et caractéristiques d'une CLP

Plusieurs méthodes de formation de CLP ont été utilisées successivement et sont brièvement résumées ci-après. Elles se distinguent principalement par le type de nanotubes utilisés et par la méthode d'extraction des CLP.

I – 3 – 2 – 2 : Premier procédé d'extraction des CLP⁷²

Le premier procédé utilise des nanotubes mono-paroi dont le diamètre varie entre 1 et 3 nm de diamètre. Le lipide 11,8-NTA est solubilisé à une concentration de 1 mg/mL dans un tampon Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane 100mM, NaCl 150 mM, pH 8) contenant 1% massique de SDS favorisant l'adsorption du lipide sur les nanotubes. La même masse de nanotubes de carbone est alors ajoutée et l'ensemble est soniqué au bain à ultra-sons (80W) durant 30 min (Figure I – 21, a). La solution est dialysée sept fois contre du tampon Tris afin d'éliminer le SDS puis elle est centrifugée deux fois à 14000*g dans le but d'éliminer le lipide en excès qui ne s'était pas arrangé autour des nanotubes. Un lot de nanotubes de carbone recouverts de lipides formant des arrangements hémicylindriques est alors obtenu (Figure I – 21 b). L'ensemble est alors placé sous irradiation UV (254 nm, 12 W, 1 h) afin de polymériser le lipide.

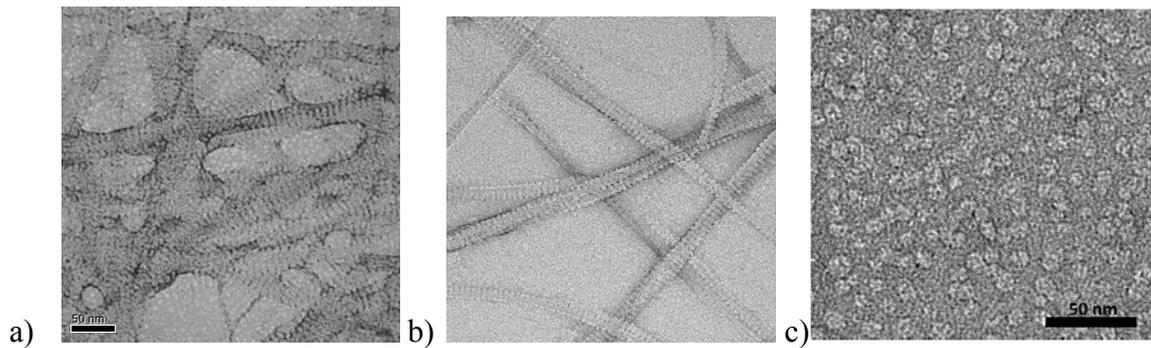
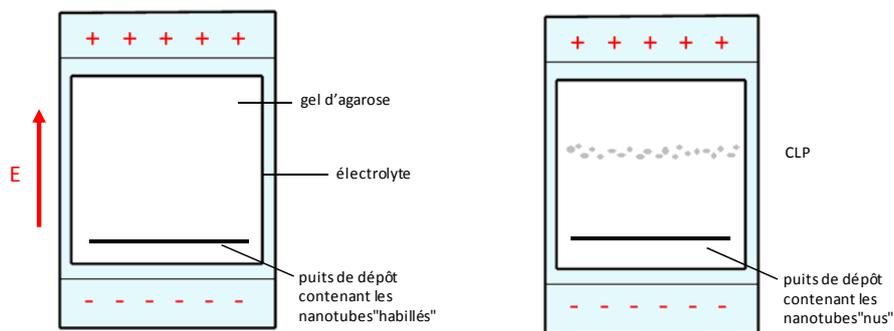


Figure I – 21 : Images MET : a) de nanotubes recouverts de lipide avant purification ; b) de nanotubes de carbone après purification ; c) du lot de CLP obtenu

Enfin, une étape d'extraction par électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une électro-élué est effectuée (Figure I – 22) afin d'obtenir un lot de CLP (Figure I – 21, c) dont la taille est de $10 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ soit environ 2-3 nm de plus que les micelles de lipide correspondantes. Un rendement d'obtention a alors été évalué à environ 20%. Cependant, cette technique fournit des quantités très faibles de CLP, de l'ordre du milligramme.

1^{ère} étape : Gel d'électrophorèse



2^{ème} étape : Electroélué

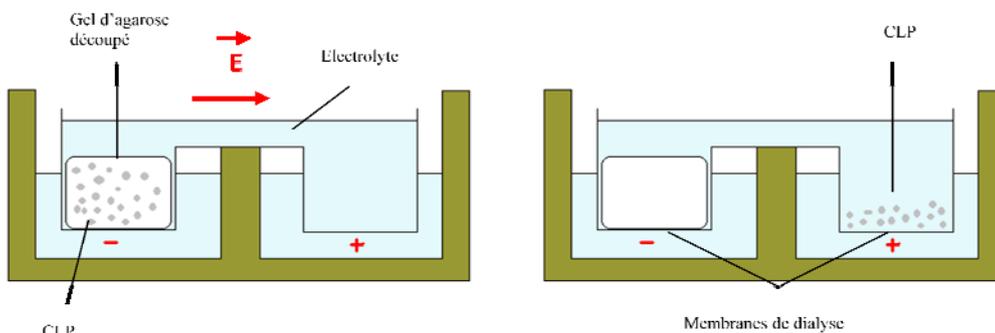


Figure I – 22 : Extraction des CLP par gel d'électrophorèse puis électroélué

Ces arrangements supramoléculaires ont permis de solubiliser des molécules hydrophobes en milieu aqueux telles que des composés aromatiques comme des rylènes, des fullerènes, ou encore des protéines membranaires.⁷³ Les molécules insolubles dans l'eau ont tendance à venir interagir avec les chaînes lipophiles des CLP favorisant ainsi leur solubilisation.

L'extraction par électrophorèse puis électroélution ne permet pas de fournir des quantités importantes de CLP. Il a donc été envisagé de développer une nouvelle méthode d'extraction des CLP. De plus, la différence de taille entre les CLP et les micelles de lipide étant très faible, il a été décidé d'utiliser des nanotubes de carbone multi-parois, plus larges, dont le diamètre varie entre 20 et 30 nm, afin de synthétiser des CLP de diamètre intérieur plus grand.

I – 3 – 2 – 3 : Deuxième procédé d'extraction des CLP⁷²

La première étape consiste toujours à solubiliser le lipide dans le tampon Tris, mais cette fois-ci à une concentration de 5 mg/mL et en absence de SDS. A cette solution, la même quantité de nanotubes multi-parois est alors ajoutée et l'ensemble est soniqué (80W, 30 minutes) (Figure I – 24, a). Puis, l'ensemble est soumis cette fois à huit cycles de dialyse afin d'éliminer le lipide en excès, puis placé sous irradiation UV (254 nm, 12 W, 1 h). L'extraction des CLP se fait alors par ultra-sonication en ajoutant, à la solution aqueuse contenant les nanotubes recouverts de lipide, le même volume d'éther diisopropylique (Figure I – 23). Cette technique permet aux arrangements hémi-micellaires de se séparer des nanotubes de carbone. Ces derniers se retrouvent alors « nus » dans la phase organique tandis que les CLP sont récupérées dans la phase aqueuse.

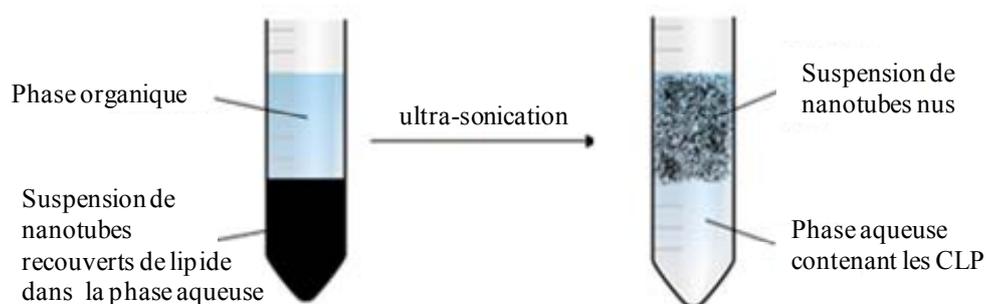


Figure I – 23 : Extraction des CLP par ultra-sonication

La phase aqueuse contenant les CLP est alors récupérée (Figure I – 24, c). Les analyses montrent une population de particules dont la taille est d'environ 10 nm. Ceci s'explique par le fait que les dialyses successives n'ont pas permis d'éliminer tout le lipide (Figure I – 24, b) et donc que des micelles sont présentes en grande quantité. Le rendement global de synthèse de ce mélange est de 76%.

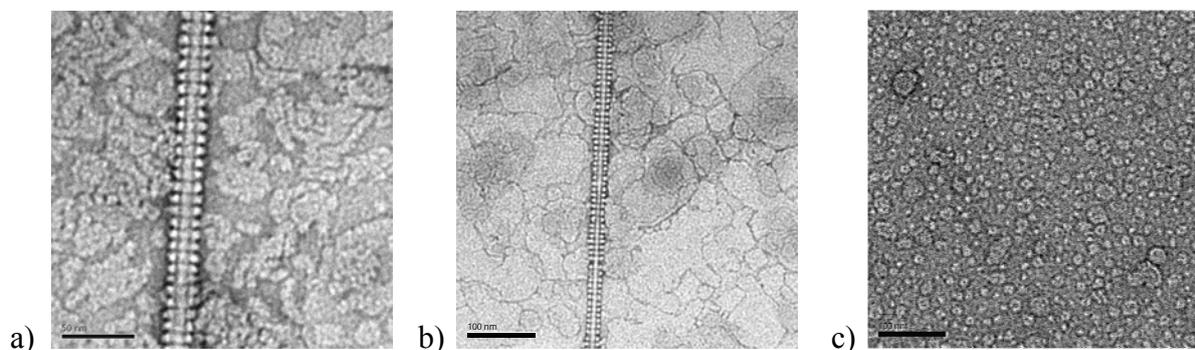


Figure I – 24 : Images MET : a) de nanotubes recouverts de lipide avant purification ; b) de nanotubes de carbone après purification ; c) du lot de CLP obtenu

La présence en trop forte quantité de micelles dans ce lot a mené au développement d'un troisième procédé où l'accent a été porté sur la purification de l'échantillon de nanotubes de carbone recouverts de lipide.

I – 3 – 2 – 4 : Troisième procédé d'extraction des CLP⁷²

La première étape consiste toujours à solubiliser le lipide dans du tampon Tris à une concentration de 5 mg/mL et en absence de SDS. A cette solution, une quantité 4 fois plus importante de MWNTs est ajoutée afin de faciliter l'adsorption du lipide sur les nanotubes. L'ensemble est soniqué (80W, 30 minutes) puis placé sous irradiation UV plus poussée (254 nm, 48 W, 4h). Les nanotubes sont alors purifiés par une succession de trois cycles de centrifugation de 10 minutes dont le surnageant est remplacé par du tampon Tris (Figure I – 25, a).

L'extraction des CLP se fait alors par ultra-sonication (100W, 30 minutes) en ajoutant, à la solution aqueuse contenant les nanotubes recouverts de lipide, le même volume d'éther diisopropylique. La phase aqueuse contenant les CLP est alors récupérée (Figure I – 25, b). Les analyses montrent une population de particules dont la taille est d'environ 30 nm. Le rendement est alors de 10%.

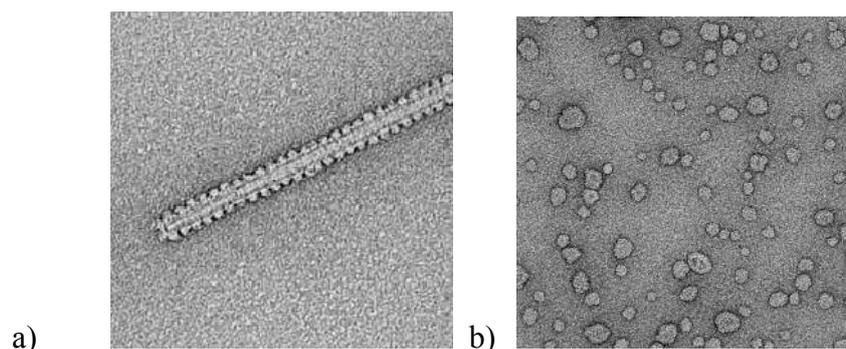


Figure I – 25 : Images MET de : a) Nanotubes recouverts de lipide après purification. b) lot de CLP

Ce procédé permet la formation de CLP en solution dont sont exemptes les micelles lipidiques. C'est donc cette méthode que nous utiliserons pour la formation des CLP.

I – 3 – 2 – 5 : Utilisations des CLP dans notre projet

Des tests de solubilisation de composés hydrophobes en milieu aqueux par ces différentes nano-structures ont été effectués et se sont révélés prometteurs. Des composés tels que des rylènes, fullerènes, ou encore des protéines membranaires ont été solubilisés en milieu aqueux. Pour la plupart des nanoparticules présentées précédemment, deux techniques complémentaires existent pour l'incorporation de molécules à ces nanoparticules : la voie non-covalente *via* l'encapsulation ou le greffage covalent. Notre projet s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire. Suite à ces tests de solubilisation de molécules hydrophobes, nous nous sommes pour notre part intéressés au greffage covalent de molécules dans le cœur hydrophobe des CLP (Figure I – 26).

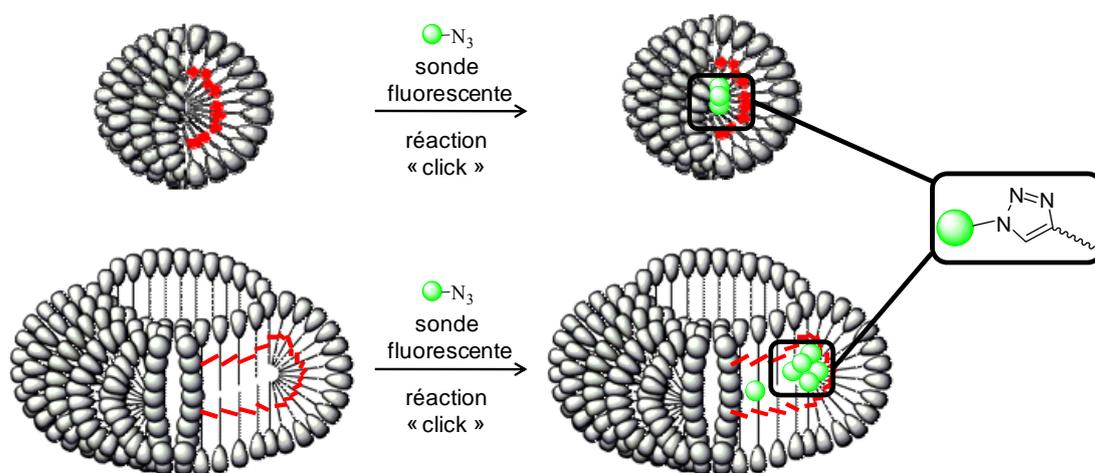


Figure I – 26 : Fonctionnalisation interne des micelles polymérisées et des CLP par réaction « click »

Nous nous sommes également intéressés à la fonctionnalisation de micelles de lipide polymérisées. Ces assemblages lipidiques sont à la fois des systèmes modèles des CLP, et sont également intéressants à étudier en eux-mêmes, du fait qu'ils se trouvent à la frontière entre des composés lipidiques classiques et des micelles de polymère. La différence notable avec les micelles de polymères est le fait que nos micelles sont d'abord formées par auto-assemblage du lipide puis polymérisées. A l'inverse les micelles de polymère sont constituées de polymères qui s'auto-arrangent en micelles.

Notre objectif sera tout d'abord synthétiser de nouveaux lipides possédant une partie réactive à la fin de la chaîne hydrophobe, qui se retrouvera alors au cœur des CLP et des micelles polymérisées. Ensuite, la post-fonctionnalisation interne grâce à la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre plus connue sous l'appellation de réaction « click » sera étudiée. Les lipides à synthétiser devront ainsi posséder soit une fonction alcyne terminale, soit une fonction azoture terminale. De plus, ces amphiphiles comporteront le motif diacétylène nécessaire à la photo-polymérisation et une tête polaire permettant leur solubilisation en milieu aqueux.

Lors de la mise en œuvre du procédé de formation des CLP, il a été observé de façon fortuite que les nanotubes de carbone couverts de lipides formaient des suspensions de nanotubes de carbone stables en milieu aqueux. Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de ce phénomène et avons évalué la généralisation de ces résultats. Par la suite, le procédé de formation des CLP avec les nouveaux lipides synthétisés sera présenté. Nous détaillerons tout d'abord l'adsorption de ces lipides synthétiques à la surface des nanotubes de carbone. Puis les étapes de photo-polymérisation, de purification de l'échantillon et enfin d'extraction selon la méthode d'ultra-sonication décrite précédemment, seront exposées.

Par la suite, nous nous intéresserons à la fonctionnalisation interne des nano-objets lipidiques. Cette dernière s'effectuera *via* la réaction « click » pour former le motif 1,4-triazole entre le lipide et le composé fluorescent à greffer. Cette fonctionnalisation sera tout d'abord effectuée sur des micelles de lipides afin de mettre au point le greffage et de fournir ainsi des micelles fluorescentes.

Enfin, cette méthode de greffage sera appliquée à différents tests de fonctionnalisation des micelles, notamment de double fonctionnalisation. De plus, cette méthode sera utilisée pour les CLP afin de greffer également une sonde fluorescente au cœur de ces nano-objets.

Références bibliographiques du Chapitre I :

- ¹ Andrieux, K.; Desmaele, D.; D'Angélo, J.; Couvreur, P. *L'actualité Chimique* **2003**, 135-138.
- ² Tong, R.; Cheng, J. *Polymer reviews* **2007**, 47, 345-381.
- ³ Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces, with applications to colloidal and biological systems*. Academic press: 1985.
- ⁴ Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, 295, 2418-2421.
- ⁵ Lehn, J.-M., *Science* **2002** 295, 2400-2403.
- ⁶ Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronbeg, B.; Lindma, B. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. John Wiley & Sons: 2002.
- ⁷ Coleman, J. N.; Khan, U.; Gun'ko, Y. K. *Advanced Materials* **2006**, 18, 689-706.
- ⁸ Vriezema, D.M.; Aragonès, M. C.; Elemans, J.A.A.W.; Cornelissen, J.J.L.M.; Rowan, A.E.; Nolte, R.J. M. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1445-1489.
- ⁹ Cheng, J. Y.; Ross, C. A.; Smith, H. I.; Thomas, E. L. *Advanced Materials* **2006**, 18, 2505-2521.
- ¹⁰ Lu, W.; Lieber, C. M. *Nature* **2007**, 6, 841-850.
- ¹¹ Zhang, X.; Sun, C.; Fang, N. *Journal of Nanoparticle Research* **2004**, 6, 125-130.
- ¹² Molnar, G.; Cobo, S.; Real, J. A.; Carcenac, F.; Daran, E.; Vieu, C.; Bousseksou, A. *Advanced Materials* **2007**, 19, 2163-2167.
- ¹³ Lichtenbeld, H. C.; Yuan, F.; Michel, C. C.; Jain, R. K. *Microcirculation* **1996**, 3, 349-357.
- ¹⁴ Shults, M. D., Imperiali, B. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 14248-14249.
- ¹⁵ Ranji, M.; Kanemoto, S.; Matsubara, M.; Grosso, M. A.; Gorman, J. H.; Gorman, R. C.; Jaggard, D. L.; Chance, B *Journal of Biomedical Optics* **2006**, 11, 064036.
- ¹⁶ Lorrain, J.-L.; Raoul, D. *Rapport sur « Nanosciences et progrès médical »* **2004**.
- ¹⁷ Kunitake T., *Angewandte Chemie International Edition* **1992**, 31, 709-726.
- ¹⁸ Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces, with applications to colloidal and biological systems*. Academic press: 1985.
- ¹⁹ Evans, F.; Wennerstrom, H. Chapter 1 : Solute and solvents, self-assembly of amphiphiles. In *The colloidal domain- where physics, chemistry and biology meet*, Wiley-VCH: 1999; pp1-43.
- ²⁰ Shimizu T.; Masuda M.; Minamikawa H. *Chemistry Reviews* **2005**, 105, 1401-1443.

- ²¹ Holmberg, K.; Jonsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactant Micellization*. In *Surfactants and polymers in aqueous solution*, John Wiley & sons: 2002; pp 39-66.
- ²² Torchilin V.P. *Pharmaceutical Research* **2007**, *24*, 1-16.
- ²³ Van Tilborg, G. A. F.; Mulder, W. J. M.; Deckers, N.; Storm, G.; Reutelingsperger, C. P. M.; Strijkers, G. J.; Nicolay, K. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 741-749.
- ²⁴ Marcato, P. D.; Durán, N. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2008**, *8*, 2216–2229.
- ²⁵ Mulder, W. J. M.; Strijkers, G. J.; Van Tilborg, G. A. F.; Cormode, D. P.; Fayad Z. A.; Nicolay, K. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 904-914.
- ²⁶ Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13*, 238–252.
- ²⁷ Torchilin V.P.; Weissig V. *Liposomes : A Practical Approach*, Oxford Univ. Press : 2003.
- ²⁸ Gregoriadis G. *Liposome Technology*, Taylor & Francis/Informa : 2006.
- ²⁹ Sharma, A.; Sharma, U. S. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *154*, 123-140.
- ³⁰ Chonn, A.; Cullis, P. R. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *30*, 73-83.
- ³¹ Opsteen, J. A.; Brinkhuis, R. P.; Teeuwen, R. L. M.; Lowik, D. W. P. M.; Van Hest, J. C. M. *Chemical Communications* **2007**, *30*, 3136-3138.
- ³² Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Srinivas, G.; Brannan, A.; Bates, F. S.; Klein, M. L.; Minko, T.; Discher, B. M. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *3*, (3), 340-350.
- ³³ Torchilin, V. P. *Nature Reviews: Drug Discovery* **2005**, *4*, 145-160.
- ³⁴ Torchilin, V. P. *Polymers in drug delivery*, Group T. F., Ed. 2006; pp 111-130.
- ³⁵ Haag, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 278-282.
- ³⁶ Jiang, X.; Zhang, J.; Zhou, Y.; Xu, J.; Liu, S. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 860-871.
- ³⁷ Jiang, X.; Zhang, G.; Narain, R.; Liu, S. *Soft Matter* **2009**, *5*, 1530-1538.
- ³⁸ Sutton, D.; Nasogkla, N.; Blanco, E.; Gao, J. *Pharmaceutical Research* **2007**, *24*, (6), 1029-1046.
- ³⁹ O'Reilly, R. K.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 1068-1083.
- ⁴⁰ O'Reilly, R. K.; Joralemon, M. J.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L. *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry* **2006**, *44*, 5203-5217.
- ⁴¹ O'Reilly, R. K.; Joralemon, M. J.; Wooley, K. L.; Hawker, C. J. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 5976-5988.

- ⁴² Ievins, A. D.; Wang, X.; Moughton, A. O.; Skey, J.; O'Reilly, R. K. *Macromolecules* **2008**, *41*, 2998-3006.
- ⁴³ Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J.-M.; Cattel, L.; Couvreur, P. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *344*, 71-77.
- ⁴⁴ Park, K.; Lee, G. Y.; Kim, Y.-S.; Yu, M.; Park, R.-W.; Kim, I.-S.; Kim, S. Y.; Byun, Y. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114*, 300-306.
- ⁴⁵ Carreyre, M.-T.; Zhang, P.; Winnik, M. A.; Pichot, C.; Graillat *Journal of Colloid and Interface Science* **1995**, *170*, 374-382.
- ⁴⁶ Ando, K.; Kawaguchi, H. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *285*, 619-626.
- ⁴⁷ Tronc, F.; Li, M.; Lu, J.; Winnik, M. A.; Kaul, B. L.; Graciet J.-C. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2003**, *41*, 766-778.
- ⁴⁸ Sun, H.; Scharff-Poulsen, A.-M.; Gu, H.; Almdal, K. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 3381-3384.
- ⁴⁹ Frigoli, M.; Ouadahi, K.; Larpent, C. *Chemistry : a European Journal* **2009**, *15*, 8319-8330.
- ⁵⁰ Lee, C. L.; MacKay, J. A.; Fréchet, J. M.J.; Szoka, F. C. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, (12), 1517-1526.
- ⁵¹ Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Molecular Biotechnology* **2002**, *90*, 231-255.
- ⁵² Chai, M.; Holley, A. K.; Krushamp, M. *Chemical Communications* **2007**, 168-170.
- ⁵³ Morgan, M. T.; Carnahan, M. A.; Immoos, C. E.; Ribeiro A. A.; Finkelstein, S.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15485-15489.
- ⁵⁴ Namazi, H.; Adeli, M.; Zarnegar, Z.; Jafari, S.; Dadkhah, A.; Shukla, A. *Colloid and Polymer Science* **2007**, *285*, 1527-1533.
- ⁵⁵ Cho, S. Y.; Allcock, H. R. *Macromolecules* **2007**, *40*, 3115-3121.
- ⁵⁶ Kline, K. K.; Morgan, E. J.; Norton, L. K.; Tucker, S. A. *Talanta* **2009**, *78*, 1489-1491.
- ⁵⁷ Sadamoto, R.; Tomioka, N.; Aida, T. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 3978-3979.
- ⁵⁸ Bright, F. V. *et coll.* *Journal of Physical Chemistry: Part B* **2002**, *106*, 8649-8656.
- ⁵⁹ Wängler, C.; Moldenhauer, G.; Saffrich, R.; Knapp, E.-M.; Beijer, B.; Schnölzer, M.; Wängler, B.; Eisenhut, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. *Chemistry: a European Journal* **2008**, *14*, 8116-8130.
- ⁶⁰ Martinez-Ferrero, E.; Franc, G.; Mazères, S.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Sanchez, C. *Chemistry : a European Journal* **2008**, *14*, 7658-7669.

- ⁶¹ Fuchs, S.; Pla-Quintana, A.; Mazères, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Organic Letters* **2008**, *10*, 4751-4754.
- ⁶² Manne, S.; Cleveland, J. P. ; Gaub, H. E. *Langmuir* **1994**, *10*, 4409-4413.
- ⁶³ Manne, S.; Gaub, H. E. *Science* **1995**, *270*, 1480-1482.
- ⁶⁴ Aksay, I. A.; Manne, S.; Honma, I.; Yao, N.; Zhou, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Gruner, S. M. *Science* **1996**, *273*, 892-898.
- ⁶⁵ Wanless, E. J.; Ducker, W. A. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 3207-3214.
- ⁶⁶ Patrick, H. N.; Warr, G. G. ; Manne, S.; Aksay, I. A. *Langmuir* **1997**, *13*, 4349-4356.
- ⁶⁷ Grant, L. M.; Tiberg, F.; Ducker, W. A. *Journal of Physical Chemistry: Part B* **1998**, *102*, 4288-4292.
- ⁶⁸ Bonard, J.-M.; Stora, T.; Salvetat, J.-P.; Maier, F.; Stockli, T.; Duschl, C.; Forro, M.; De Heer, W. A.; Chatelain, A. *Advanced Materials* **1997**, *9*, 827-831.
- ⁶⁹ Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775-778.
- ⁷⁰ Richard C. *Thèse de l'Université de Paris XI Orsay*, **2000**.
- ⁷¹ Rickling, S. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg*, **2004**.
- ⁷² Thauvin, C. *Thèse de l'Université de Strasbourg*, **2009**.
- ⁷³ Thauvin, C.; Rickling, S.; Schultz, P.; Célia, H.; Meunier, S.; Mioskowski, C. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3*, 743-748.

Chapitre 2

-

*Synthèse des lipides
et évaluation
de leur solubilité en milieu aqueux*

L'objectif est ici de synthétiser des lipides possédant à la fois une tête polaire pour la solubilisation du lipide en phase aqueuse, un motif diacétylène permettant une polymérisation afin de stabiliser les arrangements autour des nanotubes de carbone par formation d'un motif ène-yne et enfin une fonction réactive permettant la post-fonctionnalisation par réaction « click », qui sera abordée dans la suite de ce manuscrit (Figure II – 1). Les lipides ne possédant pas la fonction réactive terminale seront eux aussi synthétisés et serviront de contrôle pour toutes les étapes, allant de la synthèse des nano-objets jusqu'aux essais de post-fonctionnalisation.

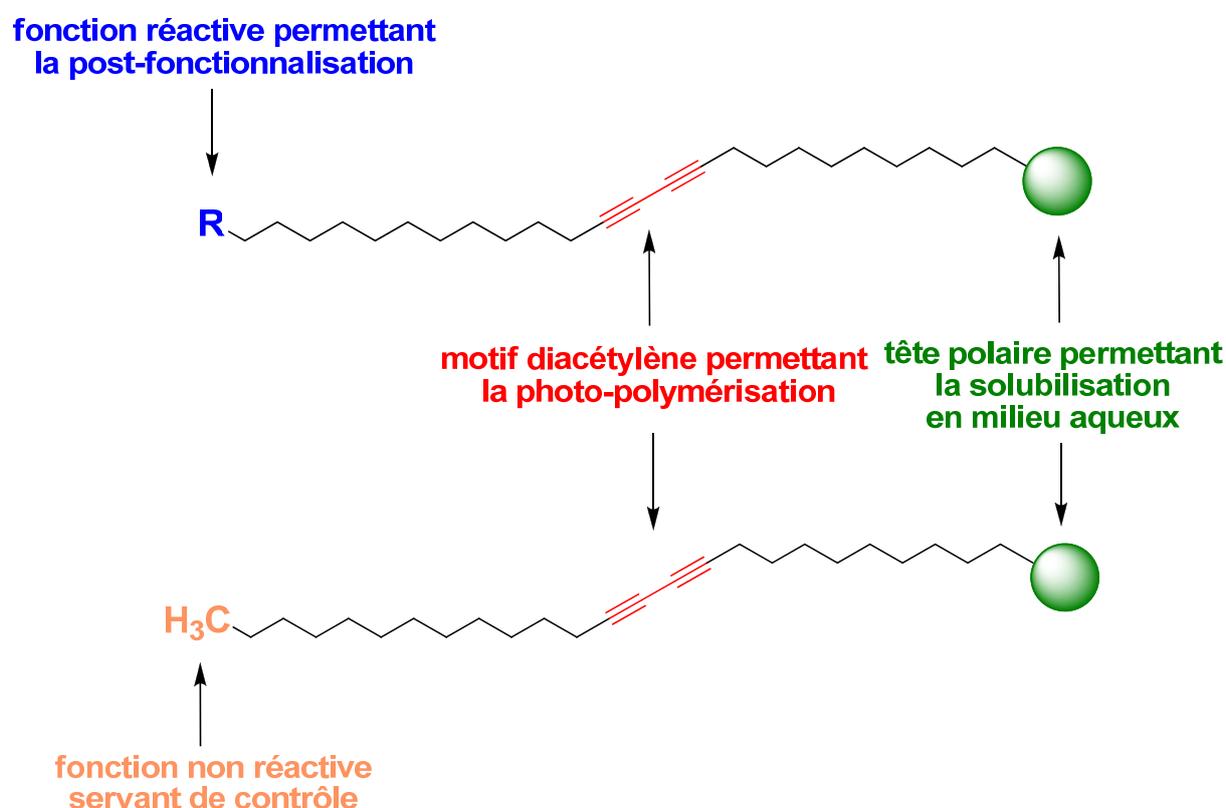


Figure II – 1 : Structure générale des lipides à synthétiser

II – 1 : Rétrosynthèses des différents lipides

II – 1 – 1 : Lipides possédant une tête polaire NTA

Au laboratoire, les travaux antérieurs ont montré qu'il fallait des lipides comportant une chaîne carbonée relativement longue pour permettre la formation d'arrangements h »mi-cylindriques sur les nanotubes de carbone.¹ Une chaîne hydrophobe importante est nécessaire pour contre-balancer le caractère hydrophile de la tête polaire et permettre ainsi au lipide de s'auto-assembler à la surface des nanotubes de carbone. A titre d'exemple, le lipide 11,8-NTA **1** utilisé jusque-là comportait 11 groupements méthylène du CH₃ terminal au motif diacétylène puis 8 groupements méthylènes du motif diacétylène à la tête polaire (Schéma II – 1). Ce lipide provient du couplage peptidique entre l'acide 10,12-pentacosadiynoïque commercial et la *N*_ω*N*_α-bis(carboxyméthyl)-L-lysine **2**.²

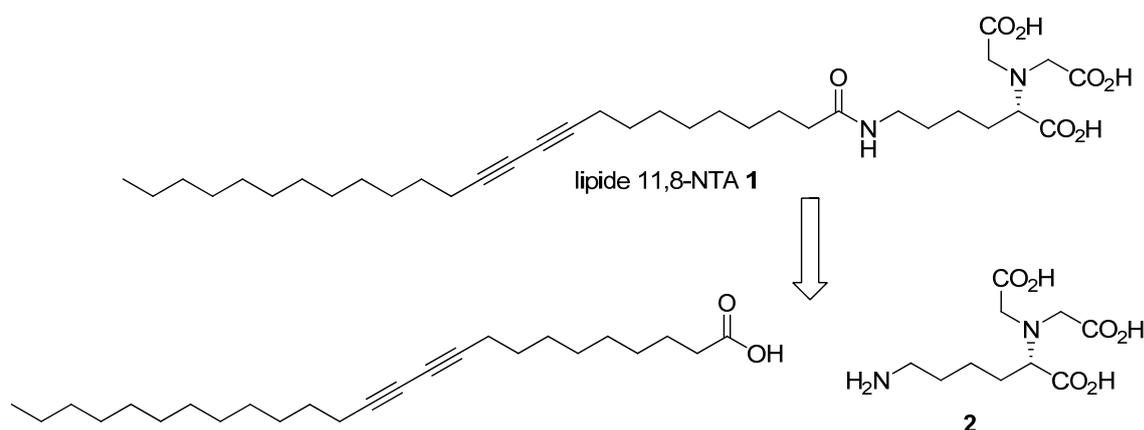


Schéma II – 1 : Rétrosynthèse du lipide 11,8-NTA **1**

La synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA **3** avec une fonction alcyne terminale a été envisagée de manière analogue à celle du lipide 11,8-NTA **1**. Ainsi, le composé **3** proviendrait du couplage peptidique entre l'acide **I-1** possédant une fonction alcyne terminale protégée et une fonction diacétylène centrale, avec la *N*_ω*N*_α-bis(carboxyméthyl)-L-lysine **2** (Schéma II – 2). Le groupement triméthylsilyl (TMS) a été choisi pour la protection de l'alcyne terminal. En effet, les protections silylées sont les plus utilisées dans la chimie des alcynes car ce groupement protecteur peut aisément et sélectivement être clivé par une source d'ions fluorures. Le motif diacétylène de l'intermédiaire **I-1** serait issu d'un couplage de Cadiot-Chodkiewicz entre le di-yne mono-protégé **I-2** d'une part, et l'alcyne bromé **10** d'autre part. Il est à noter qu'au sein de l'intermédiaire **I-2**, la deuxième fonction alcyne sera protégée de manière à éviter toute réaction secondaire lors du couplage. Finalement, la synthèse de **I-2**

pourrait être envisagée à partir de l'undec-10-yn-1-ol commercial et l'acide 11-bromoundec-10-ynoïque **10** serait préparé par bromation de l'alcyne vrai correspondant.

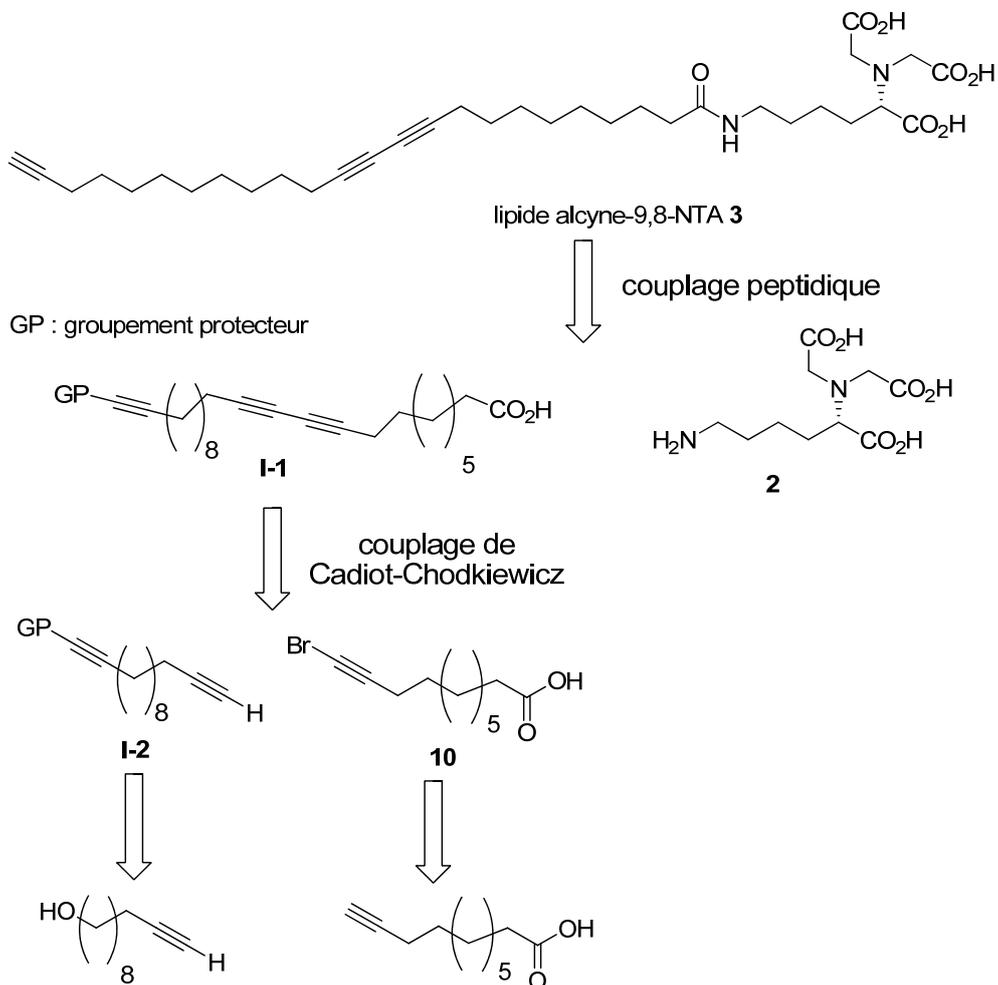


Schéma II – 2 : Rétrosynthèse envisagée pour le lipide alcyne-9,8-NTA **3**

II – 1 – 2 : Lipides possédant une tête polaire malonate

Nous avons décidé de synthétiser également des lipides possédant une tête polaire malonate afin de faire varier la partie hydrophile des molécules. Les lipides **4**, **5** et **6** ont alors été envisagés (Figure II – 2).

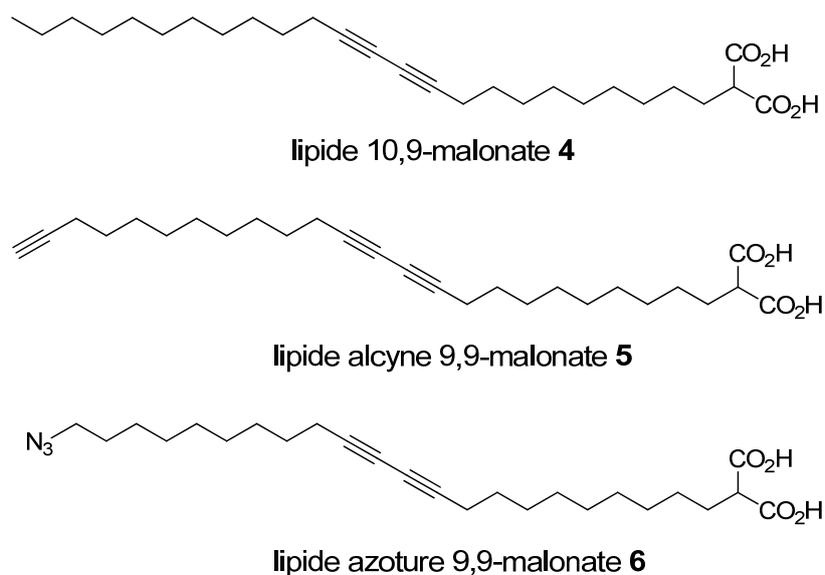


Figure II – 2 : Différents lipides à tête malonate

Les rétrosynthèses de ces lipides sont basées sur un modèle commun, à savoir que les lipides **4**, **5** et **6** proviendraient des intermédiaires **I-3** possédant l'alcool correspondant (Schéma II – 3). Ces composés seraient eux-mêmes issus d'un couplage de Cadiot-Chodkiewicz entre les intermédiaires **I-4** et le 11-bromoundec-10-yn-1-ol **18**. Dans le cas du lipide **4**, **I-4** serait le tridec-1-yne commercial. Dans le cas du lipide **5**, **I-4** serait en fait l'intermédiaire **I-2** utilisé pour la synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA **3**. Dans le cas du lipide **6**, l'intermédiaire **I-4** proviendrait du undec-10-yn-1-ol commercial.

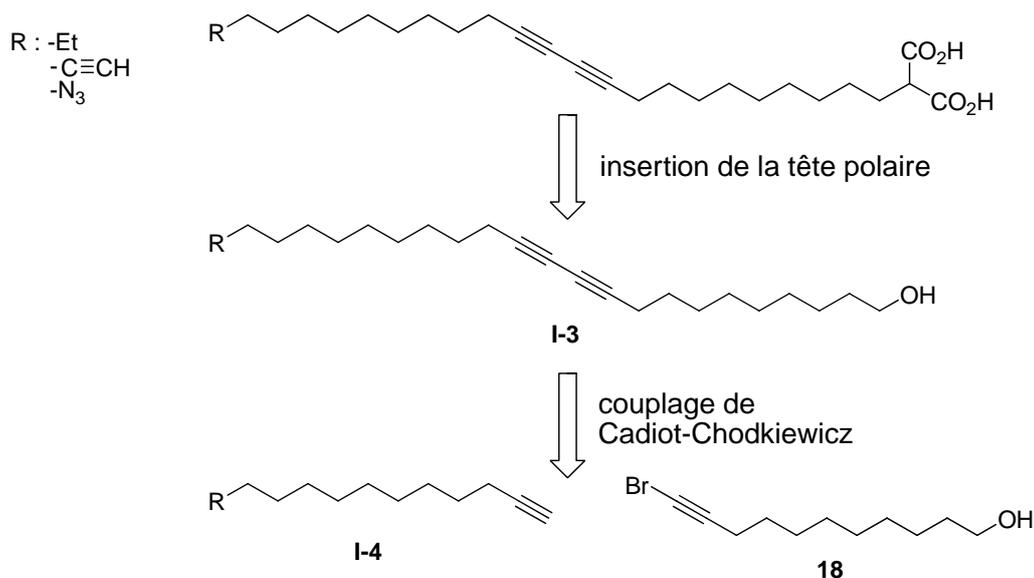


Schéma II – 3 : Rétrosynthèse des lipides à tête polaire malonate

II – 2 : Synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à la synthèse des lipides possédant la tête NTA. Pour ce faire, nous avons tout d'abord préparé deux têtes polaires NTA.

II – 2 – 1 : Synthèse des têtes polaires NTA

La synthèse de la tête NTA **2** a été mise au point au laboratoire par Michel Mosser (Schéma II – 4). Elle est obtenue à partir de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine. Une première étape d'alkylation de l'amine primaire par l'acide bromoacétique permet la formation du motif triacide. Un mélange de produits est alors obtenu, correspondant au produit de départ n'ayant pas réagi, au produit de mono-alkylation et au produit de di-alkylation souhaité. Ces produits fortement polaires sont difficilement séparables. Une étape de benzylation des fonctions acides carboxyliques est nécessaire pour permettre la purification aisée des produits par chromatographie sur gel de silice. Le produit désiré **7** est obtenu avec un rendement global sur deux étapes de 68%. Une hydrogénation est ensuite effectuée afin de fournir la tête NTA **2** possédant l'amine primaire et les trois acides carboxyliques libres avec un rendement quantitatif.

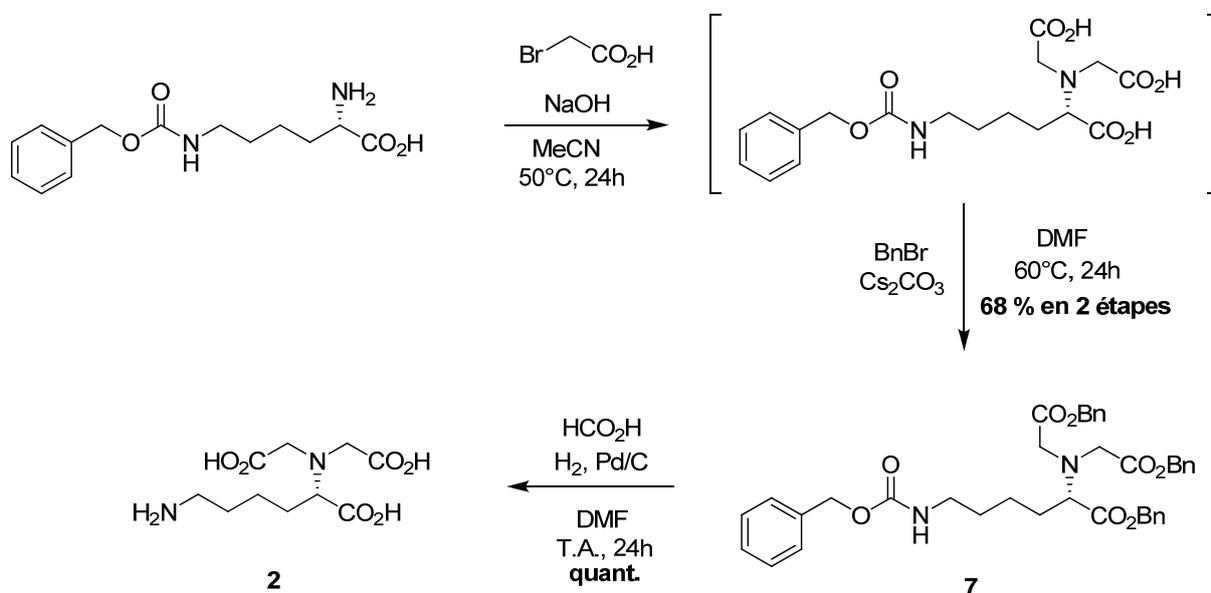


Schéma II – 4 : Synthèse de la tête NTA **2**

Nous avons également synthétisé la tête NTA **9** possédant l'amine libre et les acides carboxyliques protégés par des fonctions esters méthyliques (Schéma II – 5). La synthèse débute par l'alkylation du 2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoate de méthyle commercial par le 2-bromoacétate de méthyle pour fournir le composé **8** possédant les trois fonctions esters avec un rendement de 78%. L'étape suivante consiste à déprotéger l'amine par hydrogénation pour fournir la tête NTA méthylée **9** avec un rendement de 95%.

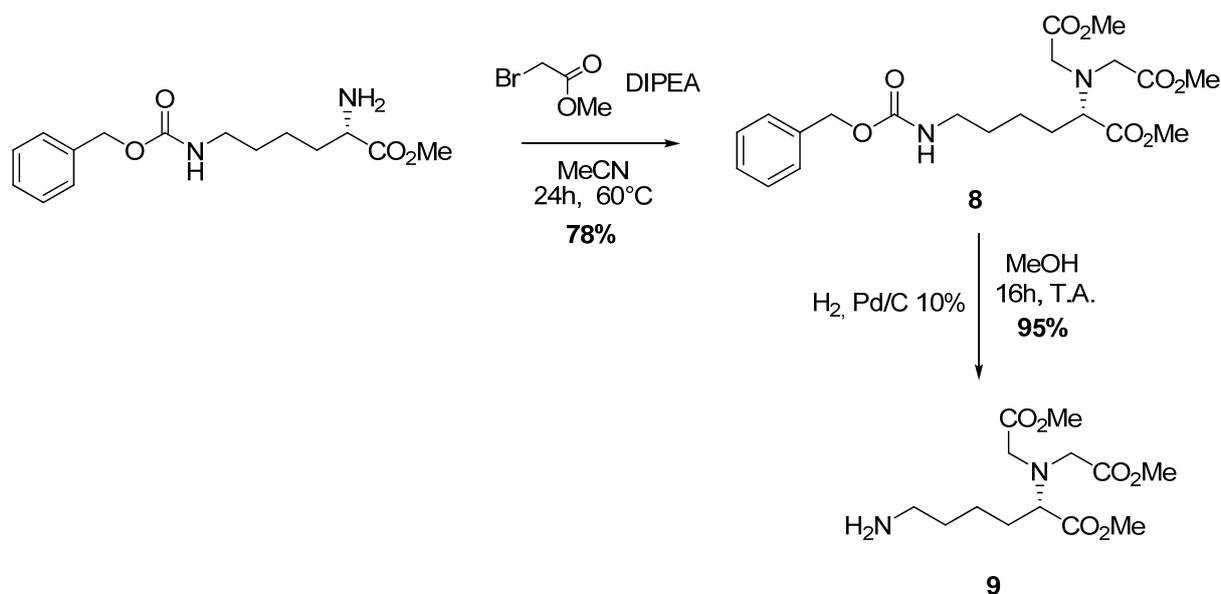
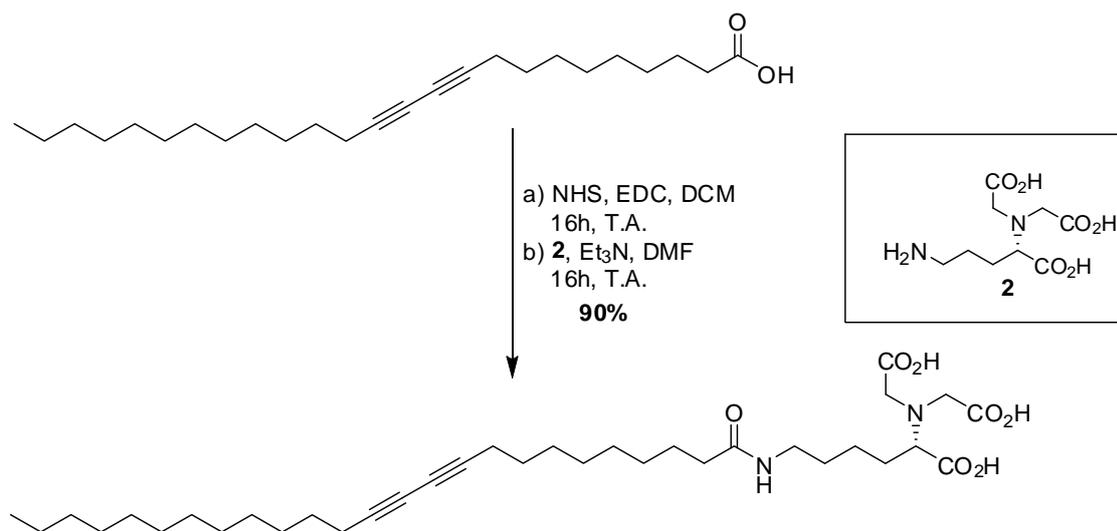


Schéma II – 5 : Synthèse de la tête NTA méthylée **9**

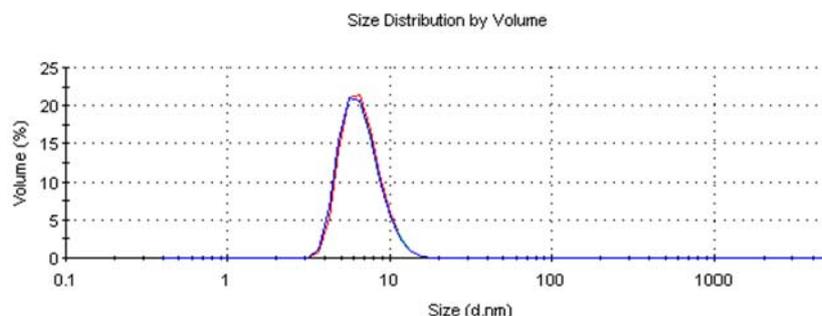
Les deux têtes polaires ayant été synthétisées, nous allons maintenant nous intéresser aux synthèses des lipides 11,8-NTA **1** et alcynes-9,8-NTA **3**.

II – 2 – 2 : Synthèse du lipide 11,8-NTA **1**

Le lipide 11,8-NTA **1** provient du couplage entre l'acide 10,12-pentacosadiynoïque commercial et la N_{ω},N_{α} -bis(carboxyméthyl)-L-lysine **2**. La première étape consiste à modifier l'acide sous la forme d'un ester activé qui est par la suite engagé dans la réaction de couplage avec la tête NTA **2** (Schéma – 6). Le lipide est ainsi obtenu avec un rendement global de 90%.


 Schéma II – 6 : Synthèse du lipide 11,8-NTA **1**

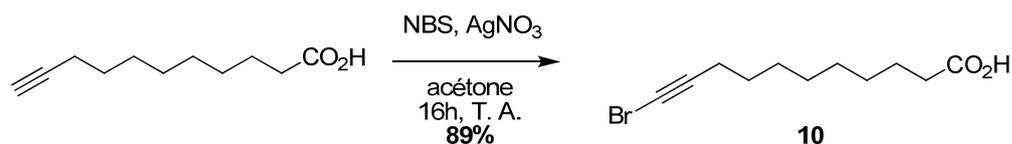
Une fois **1** dissout dans une solution de tampon Tris pH = 8 (100mM Tris, 150 mM NaCl) à une concentration de 5 mg/mL, l'analyse par diffusion de la lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) de l'échantillon montre une population centrée vers 6-8 nm de diamètre correspondant à des micelles (Figure II – 3).


 Figure II – 3 : Analyse par DLS des micelles de lipide 11,8-NTA **1**

II – 2 – 3 : Synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA

II – 2 – 3 – 1 : Synthèse de l'intermédiaire **10**

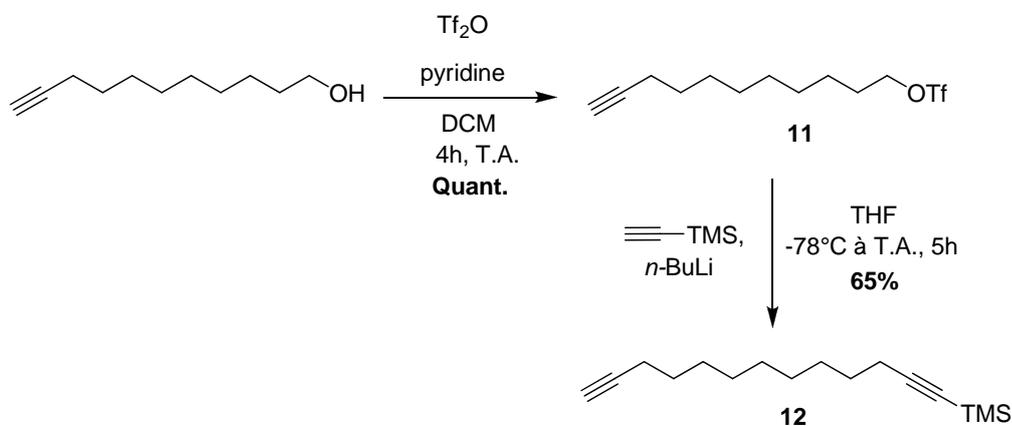
Afin de former le lipide **3**, il nous faut tout d'abord synthétiser l'intermédiaire **I-3**. Pour cela, l'acide undécyn-10-oïque est bromé en présence de N-bromosuccinimide (NBS) et de nitrate d'argent dans l'acétone.³ L'alcyne bromé **10** correspondant est alors obtenu avec un rendement de 89% (Schéma II – 7).

Schéma II – 7 : Synthèse de l'intermédiaire **10**

Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse de l'intermédiaire **I-2** possédant les deux fonctions alcynes.

II – 2 – 3 – 2 : Synthèse de l'intermédiaire I-2

L'intermédiaire **I-2** possède à la fois une fonction alcyne vrai et une fonction alcyne protégée par un groupement silylé. Nous avons alors choisi le groupement triméthylsilyle (TMS) (Schéma II – 8). La synthèse débute par l'activation de l'alcool de l'undec-10-yn-1-ol sous forme de triflate **11**.⁴ La molécule **11** réagit ensuite avec le triméthylsilylacétylène de lithium, formé par réaction du triméthylsilylacétylène en présence de *n*-BuLi, pour fournir le composé **12** avec un rendement de 65%.^{5,6}

Schéma II – 8 : Synthèse du précurseur dissymétrique **12**

Les deux intermédiaires ayant été synthétisés, le couplage formant le motif diacétylène va être étudié.

II – 2 – 3 – 3 : Synthèse de l'intermédiaire I-1

Notons tout d'abord qu'à partir de cette étape, toutes les réactions suivantes se dérouleront à l'abri de la lumière afin d'éviter la polymérisation du motif diacétylène photosensible. La synthèse de l'intermédiaire **I-1** s'effectue par couplage entre l'alcyne vrai **12** et l'alcyne bromé **10** selon la méthode décrite par Cadiot et Chodkiewicz dans un mélange amine/MeOH en présence de CuCl.⁷ A la vue des travaux utilisant cette réaction, il semble que le choix de l'amine ne soit pas réellement important pour que la réaction se déroule convenablement.^{10,8,9,10} Nous avons donc décidé d'utiliser l'éthylamine. La réaction fournit un mélange de composés non séparables avec un rendement global faible de 10%. Ce mélange contient le diacétylène désiré **13** majoritairement accompagné d'un produit **14** déprotégé et de traces du composé **15** issu d'une seconde étape de couplage *in situ* de **10** (Schéma II – 9). Cette déprotection serait le résultat d'une insertion du cuivre dans la liaison alcyne-TMS,^{11,12} suivie d'une élimination permettant de régénérer l'alcyne vrai.

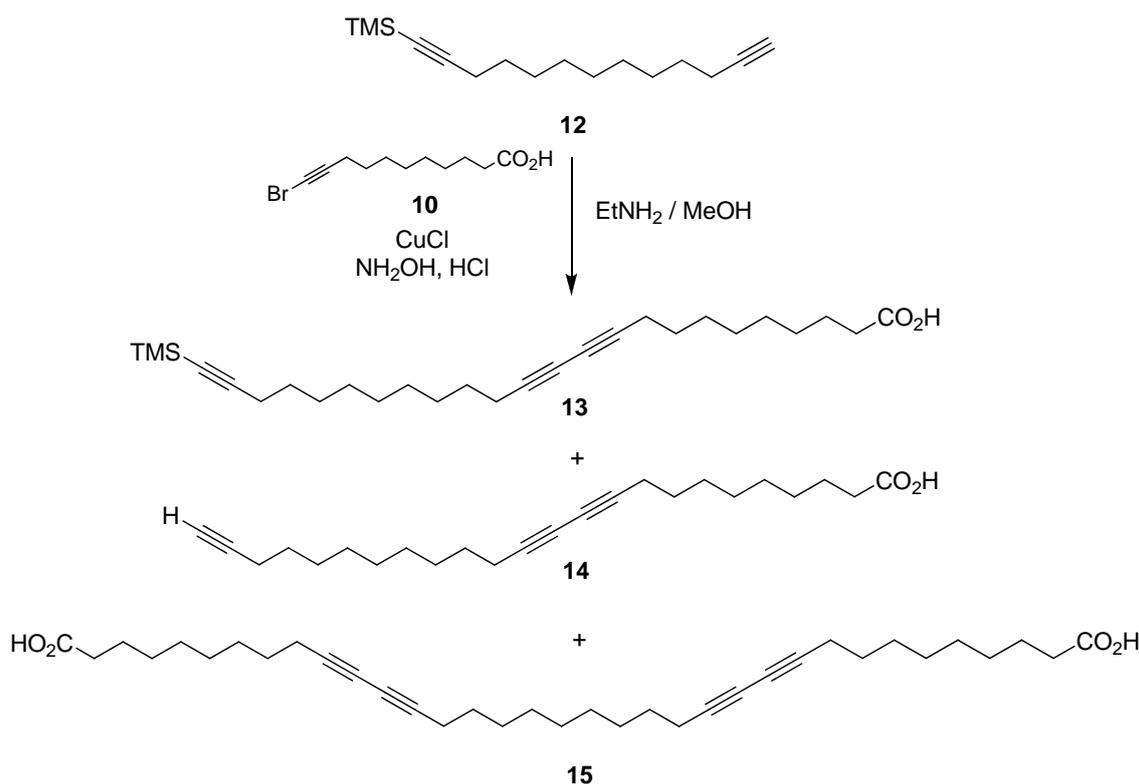


Schéma II – 9 : Formation du diacétylène **13** et des sous-produits

Nous avons donc décidé de changer de groupement silylé de manière à limiter les réactions secondaires. Un groupement protecteur plus stable a été envisagé comme le triéthylsilyle (TES) ou encore le triisopropylsilyle (TIPS). Le groupement TIPS étant plus

difficilement éliminé, le choix s'est porté sur le groupement TES. La molécule **16** a alors été synthétisée avec un rendement de 75% (Schéma II – 10).

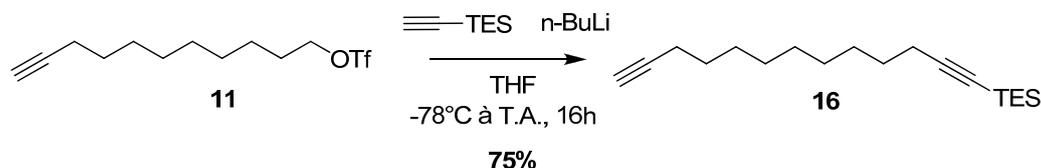


Schéma II – 10 : Formation du di-alcyne dissymétrique **16**.

Le couplage permettant la formation du motif diacétylène est ensuite réalisé avec l'alcyne bromé **10** pour conduire au composé **17** avec un rendement faible de 13% (Schéma II – 11).

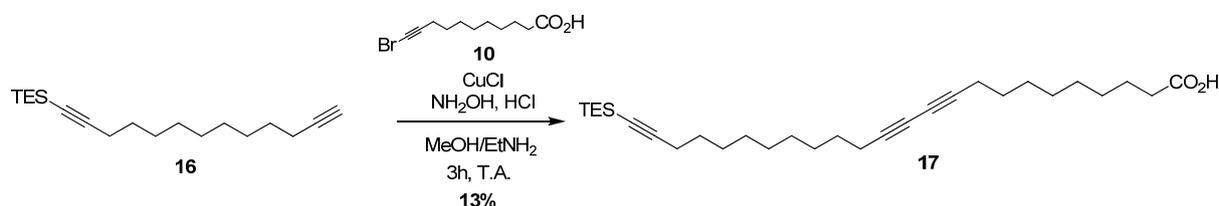


Schéma II – 11 : Synthèse du précurseur acide **17**

Bien que cette fois-ci le produit isolé soit propre, le faible rendement de la réaction ne permet pas une suite aisée de la synthèse. Une nouvelle stratégie a alors été envisagée pour réaliser le couplage. Elle consiste à synthétiser l'intermédiaire **I-3** possédant une fonction alcool terminale qui sera alors oxydée en acide carboxylique (Schéma II – 12).

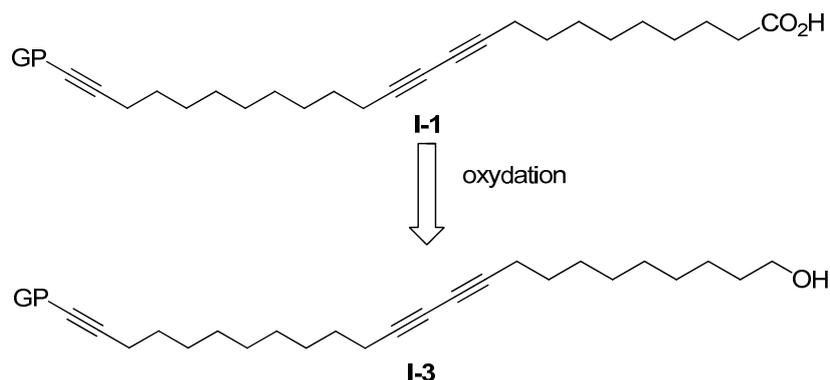


Schéma II – 12 : Formation de l'intermédiaire **I-1** par oxydation de **I-3**

II – 2 – 3 – 4 : Synthèse de l'intermédiaire I-3

Afin de former l'intermédiaire **I-3**, il faut tout d'abord former le 11-bromoundec-10-yn-1-ol **18** (Schéma II – 13). La bromation de l'alcyne s'effectue en présence de N-bromosuccinimide (NBS) et de nitrate d'argent dans l'acétone pour former le composé **18** avec un rendement de 95%. Le couplage entre **16** et **18** dans les conditions précédentes aboutit à la formation du diacétylène **19** avec un rendement de 17%.

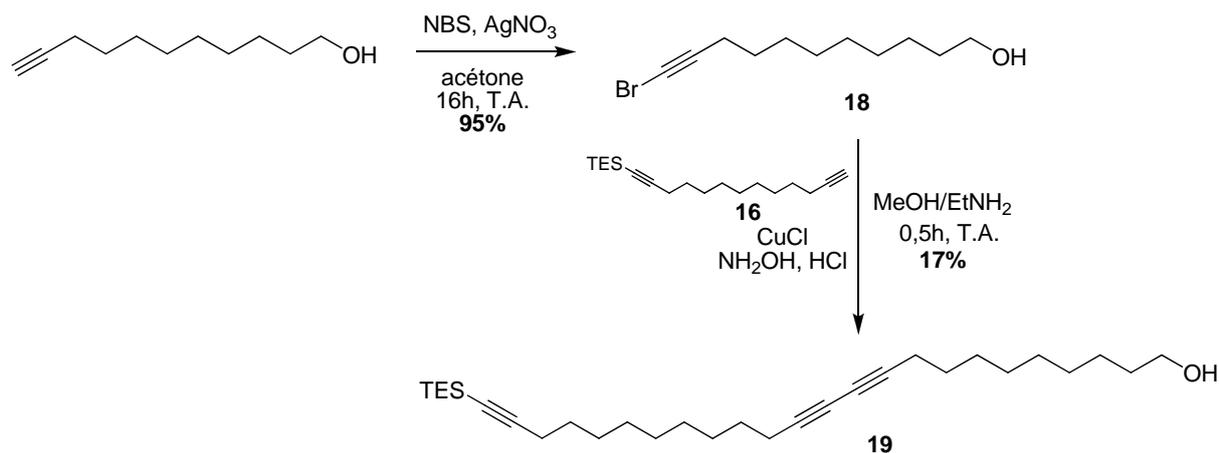


Schéma II – 13 : Formation du diacétylène **19**

Le rendement obtenu reste modeste. Or, le composé **19** sera commun à la fois à la synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA **3** et à la synthèse du lipide alcyne-9,9-malonate **5**. Nous avons donc décidé d'optimiser les conditions de formation de **19**.

II – 2 – 3 – 4 – a : Etude de la synthèse du diacétylène **19 par la méthode de Cadiot-Chodkiewicz**

Les conditions pour la réaction de Cadiot-Chodkiewicz ont été optimisées dans le mélange EtNH₂/MeOH 9/1 précédemment utilisé (Tableau II – 1):

Entrée	Equivalents de 18	Temps de réaction (h)	Quantité de CuCl	Rendement en 19
1	1,1	0,5	5%	17%
2	1,1	2	5%	23%
3	1,1	4	5%	25%
4	1,1	16	5%	26% *
5	1,1	4	20%	22%
6	0,5	4	5%	21%
7	2	4	5%	24%

*Rendement global entre le produit désiré et le produit déprotégé au niveau du TES (5% - Évaluation par RMN ¹H)

Tableau II – 1 : Optimisation des conditions d'obtention de **19**

Après 30 minutes, 17% du composé **19** sont formés (entrée 1). L'augmentation de la durée de réaction jusqu'à 4 heures permet une amélioration du rendement de 17% à 25% (entrées 2 et 3). Lorsque la réaction se poursuit jusqu'à 16h, une légère déprotection du groupement TES est observée sans amélioration du rendement (entrée 4). Le groupement TES est donc plus stable que le groupement TMS et permet une réaction plus aisée à maîtriser. La variation des quantités de réactifs influence peu la réaction et **19** est toujours obtenu avec un rendement moyen de 20-25% (entrées 5 et 6). Le rendement n'a pu être amélioré de manière significative et les conditions retenues sont donc : 1,1 équivalents d'alcyne bromé, 5% de CuCl et un temps de réaction de 4 heures.

Les proportions des co-solvants ont été par la suite évaluées (Tableau II – 2) en retenant ces conditions réactionnelles précédentes :

Entrée	Solvant	Amine	Volume solvant / Volume amine	Rendement de 19
1	MeOH	EtNH ₂	9 / 1	23%
2	MeOH	EtNH ₂	5 / 5	55%
3	MeOH	EtNH ₂	1 / 9	25%

Tableau II – 2 : Optimisation des solvants lors de la réaction d'obtention de **19**

Quel que soit le solvant en excès par rapport à l'autre, le rendement reste faible aux alentours de 25% (entrées 1 et 3). En revanche, lorsque le méthanol et l'éthylamine sont en quantité équivalente, la réaction est largement améliorée et **19** est isolé avec un rendement de 55% (entrée 2).

II – 2 – 3 – 4 – b : Alternative au couplage de Cadiot-Chodkiewicz

Une autre méthode a été envisagée pour la formation du composé **19**. Elle consiste à réaliser le couplage à partir de l'alcyne iodé **20** et de l'alcyne vrai **16** en présence de CuI dans la pyrrolidine selon des conditions mises au point par Alami.¹³ Le composé **20** possédant l'iode terminal a tout d'abord été synthétisé à partir du undec-10-yn-1-ol en présence de diiode et de KOH avec un excellent rendement de 95% (Schéma II – 14) Le couplage avec l'alcyne vrai **16** est ensuite réalisé aboutissant au diacétylène **19** avec un rendement de 30%.

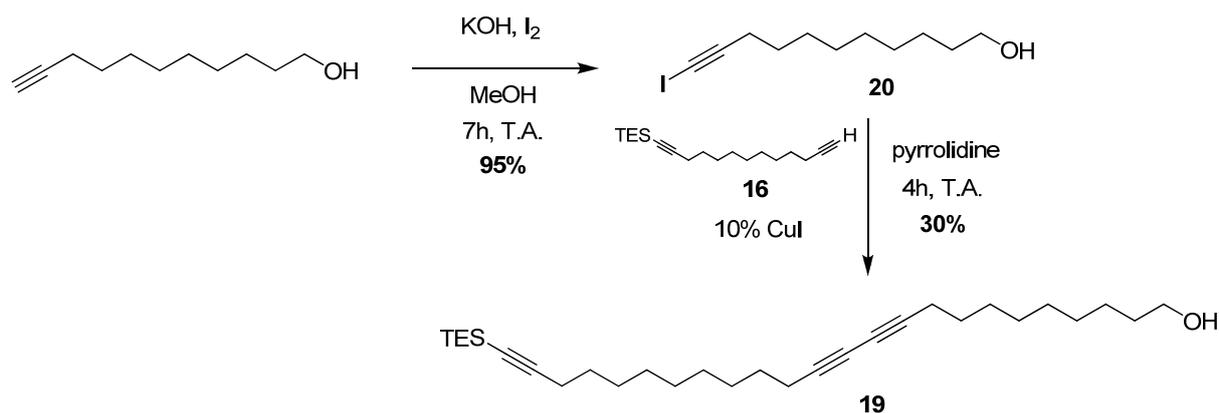


Schéma II – 14 : Synthèse du diacétylène **19** par la méthode de Alami

Cette nouvelle méthode de couplage n'a donc pas permis d'améliorer le rendement de formation de **19**. Les meilleures conditions de couplage utilisent donc la méthode de Cadiot-Chodkiewicz dans un mélange 1/1 MeOH/EtNH₂ permettant de synthétiser **19** avec un rendement satisfaisant de 55%.

II – 2 – 3 – 4 – c : Influence de la longueur de chaîne de l'alcyne bromé sur la réaction

Nous avons ensuite voulu savoir si la longueur de la chaîne carbonée était responsable de ces faibles rendements de formation du motif diacétylène. Nous avons alors réalisé le

couplage d'une molécule beaucoup plus courte, à savoir le 4-bromobutyn-1-ol **21**, avec l'alcyne terminal **16** pour donner le diacétylène **22** (Schéma II – 15).

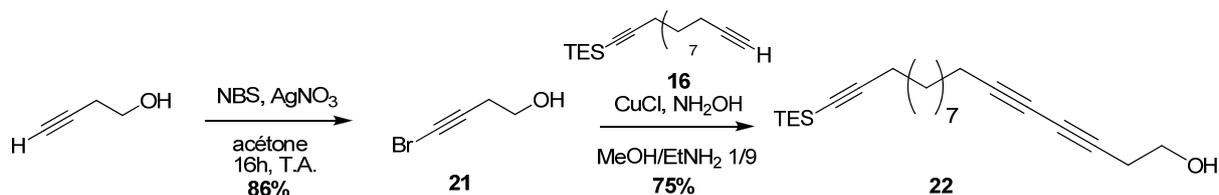


Schéma II – 15 : Synthèse d'un analogue plus court

En utilisant les conditions non optimisées, le composé **22** est obtenu avec un bon rendement de 75% alors que le composé **19** était obtenu avec seulement 25%. Ceci supporte l'hypothèse que la faible réactivité proviendrait de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcyne bromé.

II – 2 – 3 – 5 : Suite de la synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA

L'oxydation de l'alcool **19** en présence de dichromate de pyridinium (PDC) dans le DMF fournit l'acide **17** avec un rendement de 92% (Schéma II – 16).¹⁴

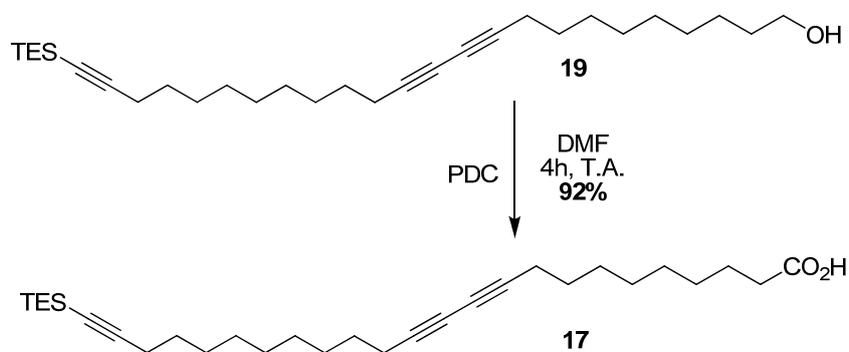


Schéma II – 16 : Formation de l'acide **17**

La première voie de formation de **17**, avec un couplage direct entre l'acide **10** et le composé **16**, fournissait **17** avec un rendement de 12% à partir de l'acide undécyn-10-oïque (Schéma II – 11). L'acide **17** dans cette nouvelle séquence réactionnelle est synthétisé en 2 étapes avec un rendement de 48% à partir de l'undéc-10-yn-1-ol. Cette séquence sera alors utilisée par la suite.

Le couplage de la tête NTA **2** sur l'acide **17** a alors été réalisé dans les conditions décrites précédemment pour la synthèse du lipide 11,8-NTA **1**, par activation de l'acide par un groupement NHS, puis couplage avec l'amine **2**. De façon surprenante, le couplage ne s'est pas réalisé et les produits de départ sont retrouvés inchangés. D'autres méthodes classiques de couplage peptidique ont alors été testées (HOBt, HBTU, préactivation de l'acide en chlorure d'acyle, T₃P, BOP-Cl) mais aucune réaction ne s'est produite. Ces résultats étant certainement dus aux acides carboxyliques libres de la tête NTA, nous avons réalisé le couplage avec la tête NTA méthylée **9** (Schéma II – 17). Le couplage entre cette amine **9** et l'acide **22** a été testé en utilisant de nouveau les méthodes de couplage classiques, dans les mêmes conditions que précédemment, et seule la réaction en présence de HOBt a fourni l'amide désiré **23** avec un rendement très faible de 11%.

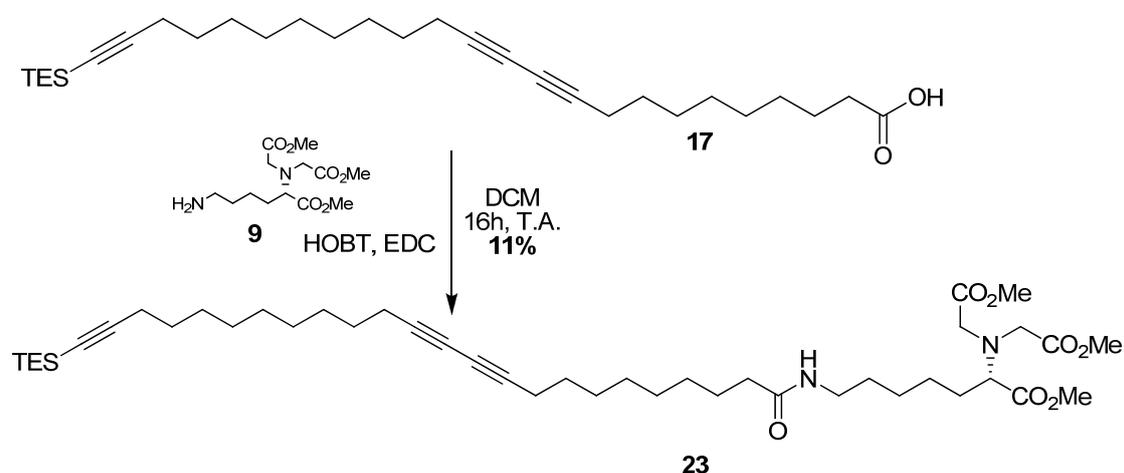


Schéma II – 17 : Synthèse de l'amide **23**

Les résultats de fonctionnalisation interne ayant progressé plus rapidement avec les lipides possédant une tête malonate, l'optimisation de la synthèse du lipide alcyne-9,8-NTA n'a pas été poursuivie et le lipide n'a pas été utilisé par la suite.

II – 3 : Synthèse des lipides possédant une tête polaire malonate

II – 3 – 1 : Synthèse du lipide 10,9-malonate

La synthèse du lipide 10,9-malonate **4** a été envisagée (Schéma II – 18). La synthèse débute par la formation du motif diacétylène à partir du bromo-alcyne **18** et du tridecyne pour former l'alcool **24** avec un rendement de 50%. Celui-ci est alors activé sous forme de mésyle

25 de manière quantitative puis condensé sur le malonate de diméthyle pour former le composé **26** avec un rendement de 75%. La saponification aboutit finalement au diacide **4** quantitativement.

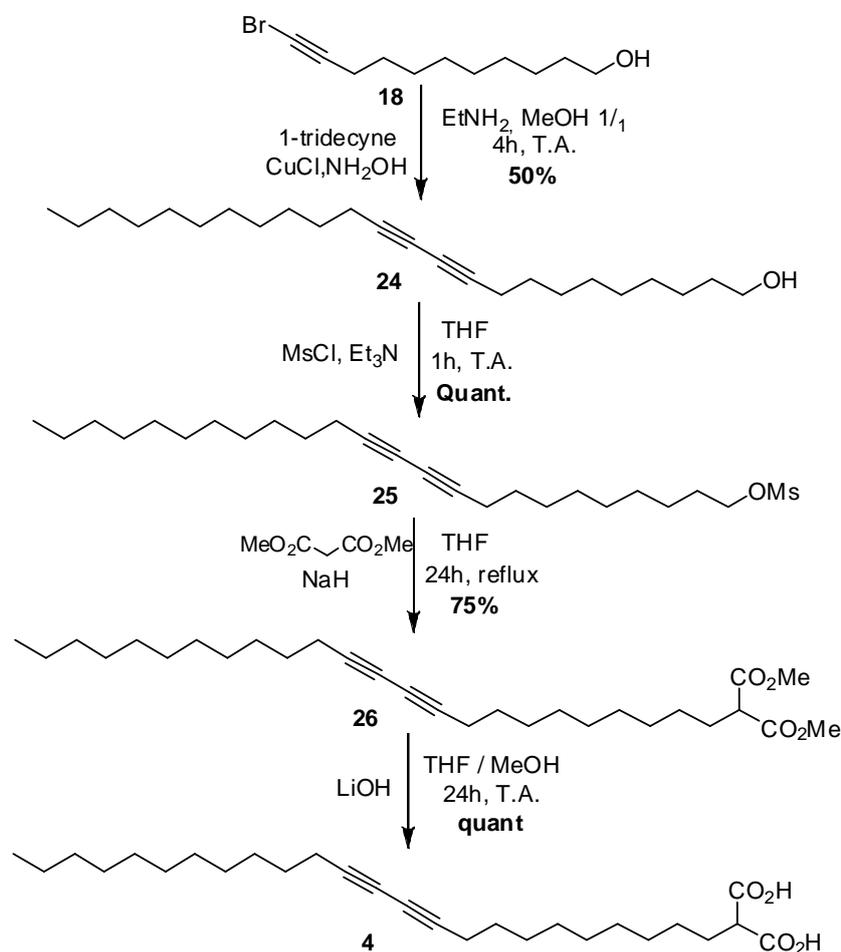


Schéma II – 18 : Synthèse du lipide 10,8-malonate **4**

Un soin particulier a été apporté à la dernière étape de saponification fournissant le lipide **4**. En effet, si une quantité trop importante d'acide est ajoutée lors du traitement de la réaction, le composé se dégrade complètement. De plus, ce lipide **4** est très sensible à la lumière car il suffit de quelques minutes après traitement et évaporation pour qu'il devienne légèrement bleu, signe de polymérisation, et ce, même s'il est protégé de la lumière. La conservation du lipide à -18°C ne peut excéder deux mois car là aussi, des problèmes de stabilité interviennent. Pour toutes ces raisons, il a été décidé que les synthèses futures se feront jusqu'au composé **26** ; à ce stade, la saponification fournissant le lipide **4** s'effectuera au fur et à mesure sur des échelles n'excédant pas 200 mg afin d'éviter toute perte trop

importante de produit. Au final, ce lipide a été synthétisé en 5 étapes au départ de l'undec-10-yn-1-ol avec un rendement global de 36%.

Des essais préliminaires de solubilisation ont montré que ce lipide **4** n'est pas soluble à pH = 8, mais qu'il se solubilise à une concentration de 5 mg/mL à un pH supérieur à 10. L'analyse par DLS de l'échantillon montre qu'une fois solubilisé, le lipide forme des micelles centrées vers 5-7 nm (Figure II – 4).

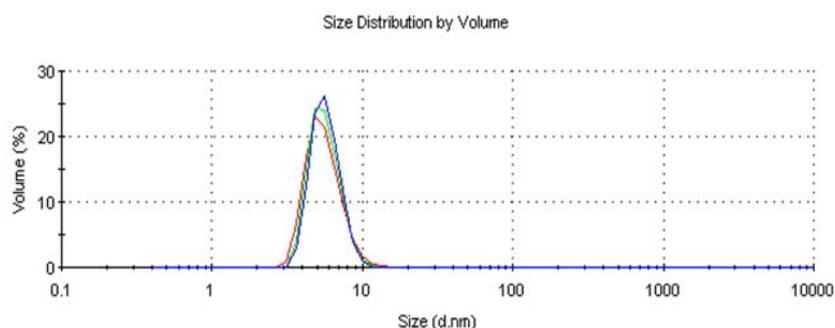


Figure II – 4 : Analyse par DLS des micelles de lipide **4**

II – 3 – 2 : Synthèse du lipide alcyne-9,9-malonate

La synthèse de ce nouveau lipide utilise l'intermédiaire alcool **19** que nous avons précédemment synthétisé (Schéma II – 19). L'alcool est activé de manière quantitative sous forme de mésyle **27**, puis est condensé sur le malonate de diméthyle en présence de NaH pour former le composé **28** avec un rendement de 75%. La déprotection du TES par le fluorure de tétrabutylammonium fournit la molécule **29** avec un rendement de 85%. **29** est finalement saponifié quantitativement en présence d'hydroxyde de lithium pour fournir le lipide **5**.

Les mêmes problèmes de stabilité du diacide ont été observés. De ce fait, la déprotection des esters ne s'effectue que sur petites quantités. Ce lipide a ainsi été synthétisé en 8 étapes au départ de l'undec-10-yn-1-ol avec un rendement global de 26%.

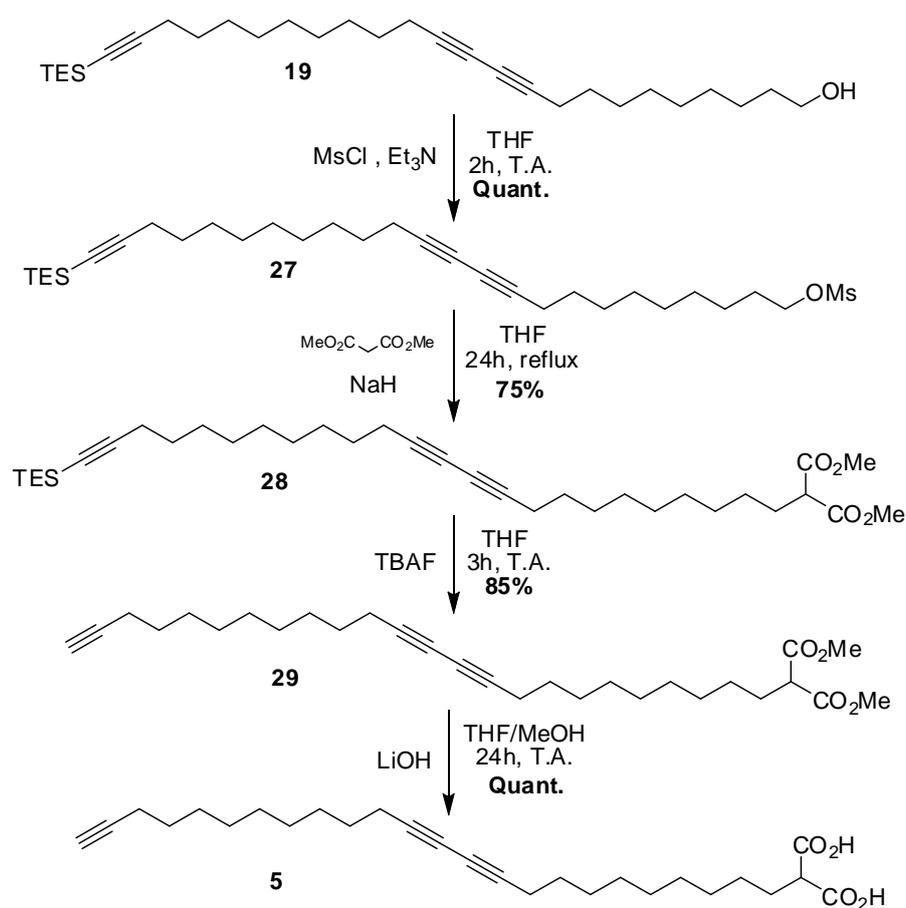


Schéma II – 19 : Synthèse du lipide alcyne-malonate 5

Les essais de solubilisation du lipide **5** se sont révélés identiques à ceux effectués pour le lipide **4**. Ce lipide ne se solubilise qu'à un pH supérieur à 10. L'analyse par DLS de l'échantillon montre la formation de micelles centrées autour de 5-7 nm de diamètre (Figure II – 5).

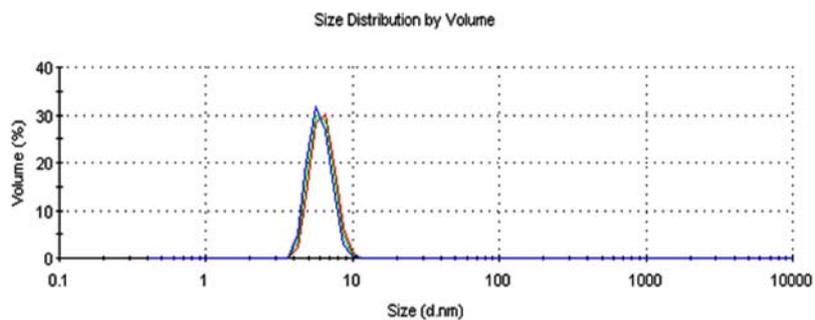


Figure II – 5 : Analyse par DLS des micelles de lipide alcyne-9,9-malonate

II – 3 – 3 : Synthèse du lipide azoture-9,9-malonate

L'objectif est ici d'obtenir le lipide **6** qui proviendrait de l'intermédiaire **I-3** possédant d'une part un groupement nucléofuge X en fin de chaîne pour l'insertion de l'azoture et de l'autre, un groupement alcool qui servira à l'insertion de la tête malonate (Schéma II – 20). Ce dernier pourrait être synthétisé de deux manières différentes. Dans la première stratégie, il proviendrait directement du couplage de Cadiot-Chodkiewicz entre le composé **18** et l'intermédiaire **I-4** qui serait lui-même issu de l'undec-10-yn-1-ol. Dans la deuxième stratégie, l'intermédiaire **I-3** serait issu d'une mono-activation du diol **32** qui proviendrait lui-même d'un homo-couplage du undec10-yn-1-ol.

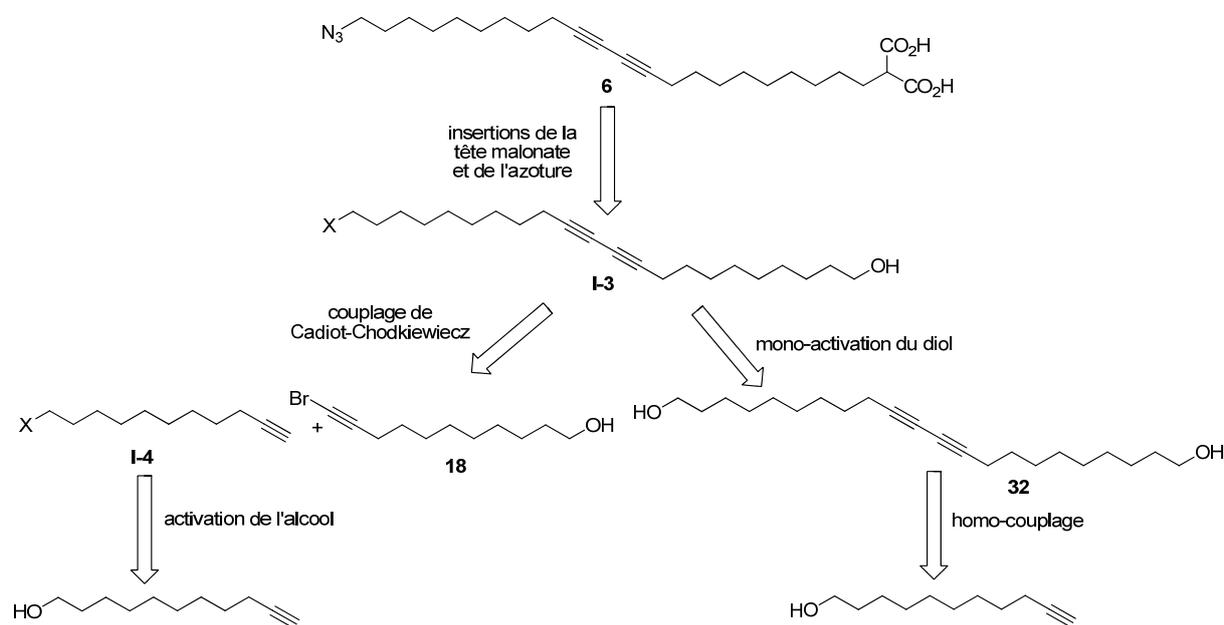


Schéma II – 20 : Rétrosynthèse du lipide **6**

II – 3 – 3 – 1 : Synthèse de l'intermédiaire I-3

II – 3 – 3 – 1 – a : Première stratégie d'obtention de I-3

La molécule **30** a été formée en bromant sélectivement l'alcool du undec10-yn-1-ol en présence de triphénylphosphine et de tétrabromure de carbone avec un rendement quantitatif (Schéma II – 21). Pour rappel, le composé **18** est lui bromé sur la position acétylénique par du NBS en présence de AgNO_3 avec un rendement de 95%. La formation du motif diacétylène **31** s'effectue ensuite dans les conditions optimales mises au point précédemment, à savoir un

mélange 1/1 de méthanol/éthylamine. Malheureusement, la réaction ne donne lieu qu'à un rendement décevant de 4%.

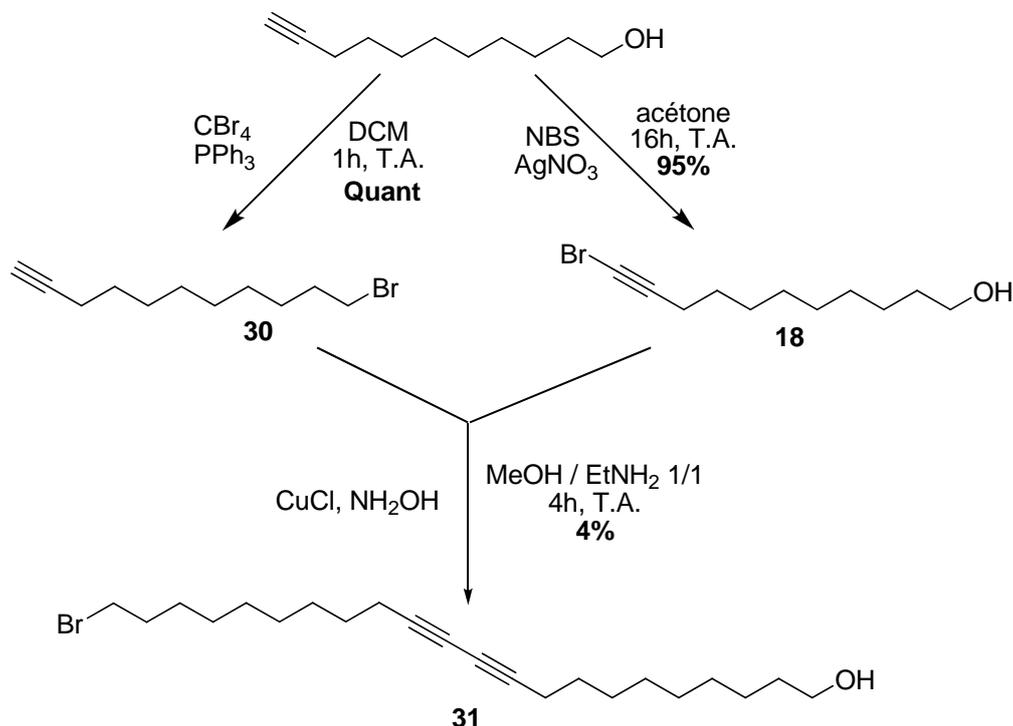


Schéma II – 21 : Synthèse de l'intermédiaire 31 lors de la stratégie 1

Devant le très faible rendement obtenu, il a été envisagé de former le composé 31 par la deuxième stratégie.

II – 3 – 3 – 1 – b : Deuxième stratégie d'obtention de I-3

Dans un premier temps, le diol 32 sera synthétisé, puis la mono-activation du diol 32 sera envisagée. La réaction d'homo-couplage peut s'effectuer de différentes manières.¹⁵ Une des plus classiques est la méthode de Glaser qui consiste à ajouter à la solution d'alcyne vrai, une source de Cu(I) et une base, généralement une amine, en présence d'oxygène.¹⁶ Une autre voie, développée par Eglington, utilise quant à elle, une source de Cu(II) comme Cu(OAc)₂.¹⁷ Ces deux méthodes ont été testées mais seule la méthode d'Eglington a fourni le composé 35 avec un rendement faible de 15% (Schéma II – 22). Une méthode dérivée du couplage de Sonogashira est également décrite pour la formation de di-acétylènes symétriques, mais celle-ci n'a pas permis une amélioration significative du rendement.¹⁸

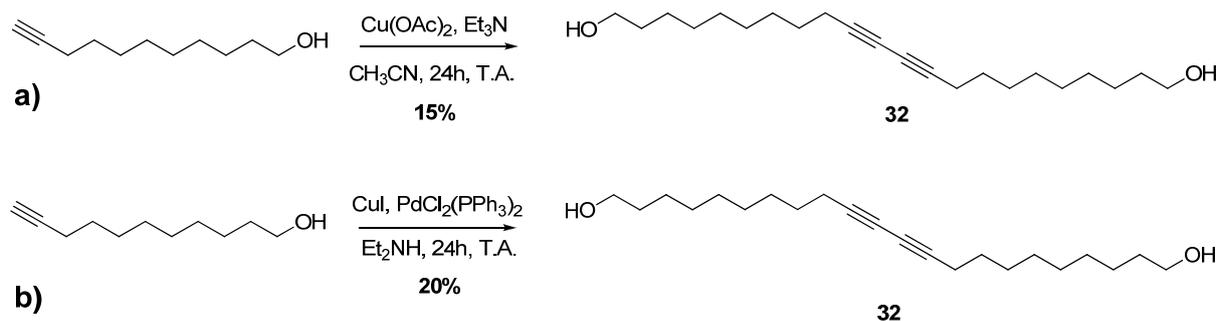


Schéma II – 22 : Synthèse du diol **32** : a) par la méthode d'Eglinton
b) par la méthode dérivée du couplage de Sonogashira

La méthode de Cadiot-Chodkiewicz a alors été tentée pour synthétiser **32** (Schéma II – 23). Il s'agit ici d'un couplage croisé entre l'alcyne vrai commercial et l'alcyne bromé correspondant. Une étape de plus est donc nécessaire afin de former **18**, mais le rendement de formation du diacétylène a pu être largement amélioré jusqu'à 48% et le rendement global de ces deux étapes est de 46%. Cette méthode est donc choisie pour poursuivre la synthèse.

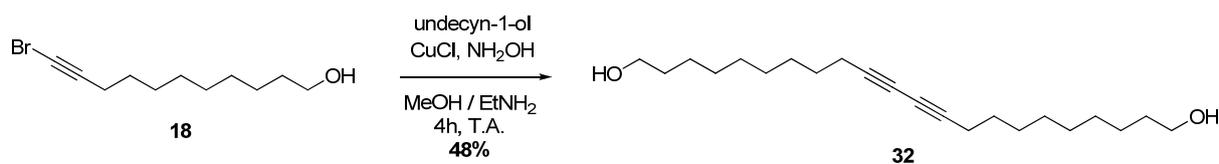


Schéma II – 23 : Synthèse du diol **32** par couplage croisé

La mono-activation de **32** par bromation d'une des deux fonctions alcool ne fournit pas le bromure **33** avec de bons rendements (15% en composé désiré, dû à la formation majoritaire du composé di-bromé). Il a donc été décidé d'activer un des alcools sous forme de mésyle (Schéma II – 24).

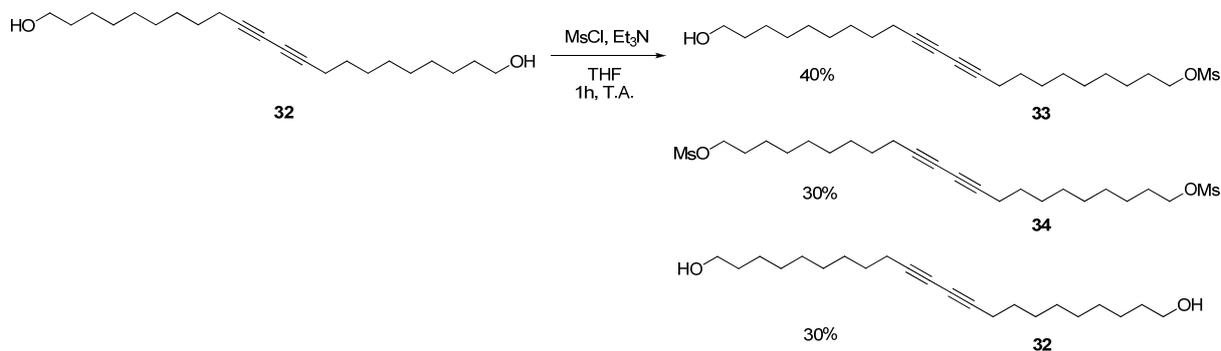


Schéma II – 24 : Synthèse de l'intermédiaire-clé **33**

Un mélange de produits est obtenu après réaction comprenant le produit de mono-mésylation désiré **33**, un produit de di-mésylation **34** et le produit de départ **32**. Plusieurs

essais ont été réalisés (ajout de réactif très lent, réaction à froid...), mais le meilleur rendement obtenu pour le composé mono-mésylé **33** reste de 40%.

II – 3 – 3 – 2 : Suite de la synthèse

La suite de la synthèse n'a pas posé de problème particulier (Schéma II – 25). Le composé **33** subit une substitution nucléophile par l'azoture de sodium pour fournir **35** avec un rendement de 89%. La fonction alcool restante de **35** est alors activée sous forme de mésyle **36** avec un rendement de 97%, puis le malonate de diméthyle est condensé en présence de NaH pour fournir le composé **37** avec un rendement de 59%. La saponification des esters méthyliques fournit **6** de manière quantitative. Le lipide **6** est ainsi synthétisé en 7 étapes à partir de l'undec10-yn-1-ol avec un rendement global de 9 %.

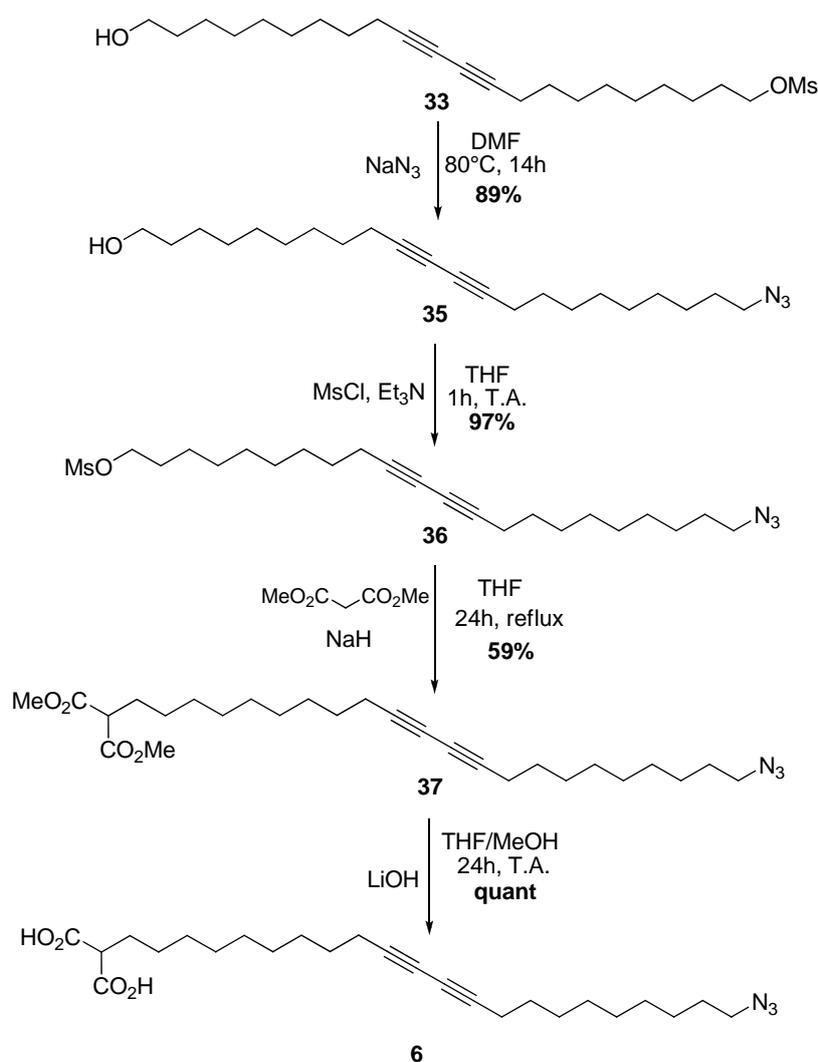


Schéma II – 25 : Fin de la synthèse du lipide **32**

La solubilisation du lipide **6** a été réalisée comme pour les deux précédents lipides possédant une tête malonate à un pH de 10-11. Malheureusement, d'après les analyses DLS, celui-ci ne forme pas de micelles mais des nano-objets de taille supérieure centrée vers 60 nm de diamètre. Ceci est peut-être dû au fait que le motif azoture perturberait le caractère amphiphile du lipide et que celui-ci n'arriverait alors plus à s'auto-assembler sous forme de micelles sphériques. Notre objectif étant de synthétiser des lipides formant des micelles, ce lipide n'a pas été utilisé par la suite.

II – 4 : Conclusion sur les synthèses

Différents lipides ont été synthétisés au cours de ces travaux (Tableau II – 3). Le lipide 11,8-NTA **1** est synthétisé en 2 étapes avec un rendement de 90% à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque (entrée 1). Il se retrouve soluble dans le tampon Tris à pH = 8 et forme des micelles. Le lipide alcyne-9,8-NTA **3**, lui, n'a pu être synthétisé dû au rendement trop faible lors de la synthèse (entrée 2). Le lipide 10,9-malonate **4** a été synthétisé en 5 étapes avec un rendement global de 36% à partir de l'undec-10-yn-1-ol (entrée 3). Ce dernier n'est soluble en milieu aqueux qu'à un pH supérieur à 10 et forme alors des micelles. De même, le lipide alcyne-9,9-malonate a été synthétisé en 7 étapes avec un rendement de 26% à partir de l'undec-10-yn-1-ol (entrée 4). Ce dernier n'est soluble qu'à un pH supérieur à 10 et forme également des micelles. Le lipide azoture-9,9-malonate **6** a été synthétisé en 7 étapes avec un rendement de 9% à partir de l'undec-10-yn-1-ol (entrée 5). Il est également soluble à un pH supérieur à 10 mais ne forme pas de micelles.

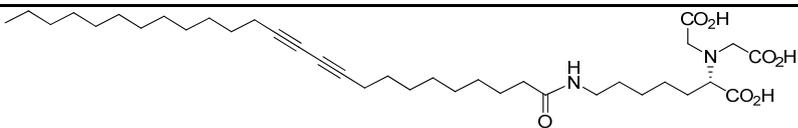
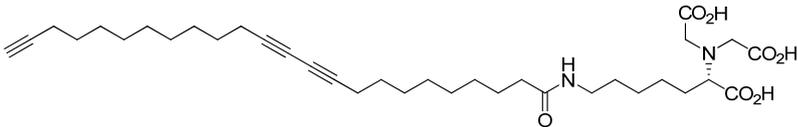
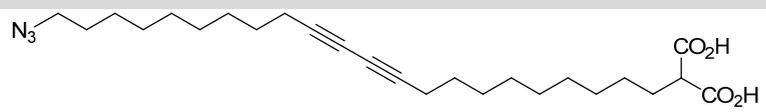
Entrée	Lipide	Remarques
1	 <p>lipide 11,8-NTA 1</p>	Soluble à pH 8 et formant des micelles
2	 <p>Lipide alcyne-9,8-NTA 3</p>	Rendement global de la synthèse trop faible
3	 <p>lipide10,9-malonate 4</p>	Soluble à pH 10 et formant des micelles
4	 <p>lipide alcyne-9,9-malonate 5</p>	Soluble à pH 10 et formant des micelles
5	 <p>lipide azoture-9,9-malonate 6</p>	Soluble à pH 10 mais ne formant pas de micelles

Tableau II – 3 : Récapitulatif des différents lipides synthétisés

La différence de solubilité observée entre le lipide **1** possédant la tête NTA et le lipide **4** possédant la tête malonate a été mise à profit dans une étude concernant la dispersion programmée en milieu aqueux de nanotubes de carbone en fonction du pH.¹⁹ Cette étude comprend également deux autres lipides : le premier possédant comme tête polaire un motif polyéthylène-glycol et le deuxième possédant un motif diéthylamine (cf : Annexe 1).

Concernant notre étude de formation de micelles polymérisées et de CLP, puis de leur fonctionnalisation interne, les lipides **4** et **5** seront utilisés. Le lipide **4** servira à la mise au point des conditions de formation des CLP. Il servira également de lipide de contrôle pour les réactions de greffage de composés hydrophobes au cœur des CLP. Les procédés seront alors appliqués au lipide **5**.

Références bibliographiques du Chapitre II :

- ¹ Rickling, S. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg*, **2004**.
- ² Thauvin, C. *Thèse de l'Université de Strasbourg*, **2009**.
- ³ Nie, X.; Wang, G. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 4734-4741.
- ⁴ Armstrong-Chong, R. J.; Matthews, K.; Chong, J. M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10239-10244.
- ⁵ Pearson, A. J.; Perosa, A. *Organometallics* **1995**, *14*, 5178-5183.
- ⁶ Bao J.; Wulff W.D.; Dragisich V.; Wenglowisky S.; Ball R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7616-7630.
- ⁷ Cadiot, P. C.; Chodkiewicz, W. in *Chemistry of acetylenes*, H. G. Viehe, Ed., Marcel Dekker, New York 1969, pp 597.
- ⁸ Montierth, J. M.; DeMario, D. R.; Kurth, M. J.; Schore, N. E. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11741-11748.
- ⁹ Patrick, T. B.; Melm G. F. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, *4*, 645-646.
- ¹⁰ Shi Shun, A. L. K.; Tykwinski, R. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1034-1057.
- ¹¹ Ikegashira, K.; Nishihara, Y.; Hirabayashi, K.; Mori, A.; Hiyama, T. *Chemical Communications* **1997**, 1039-1040.
- ¹² Nishihara, Y.; Ikegashira, K.; Mori, A.; Hiyama, T. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 4075-4078.
- ¹³ Alami, M.; Ferri, F. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 2763-2766.
- ¹⁴ Xu, Z.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 7183-7186.
- ¹⁵ Siemsen, P.; Livingston, R. C.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 2632-2657.
- ¹⁶ Glaser, C. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1870**, *154*, 137-171.
- ¹⁷ Eglinton, G.; Galbraith, A. R. *Journal of the Chemical Society*, **1959**, 889-896.
- ¹⁸ Wityak, J.; Chan, J. B. *Synthetic Communications* **1991**, *21*, 977-979.
- ¹⁹ Thauvin, C.; Perino, A.; Contal, E.; Morin, E.; Schultz, P.; Meunier, S.; Wagner, A. *Nano Letters*, soumis.

Chapitre 3

-

*Etude de la stabilité des suspensions de
nanotubes de carbone*

-

Formation des micelles et des CLP

Au cours de ce chapitre, une étude sur la stabilité de suspensions de nanotubes sera présentée. Puis, la formation des micelles en solution et leur polymérisation seront abordées. Enfin, la formation des arrangements hémi-micellaires de lipides à la surface de nanotubes de carbone pour la formation de CLP sera étudiée. Cependant, afin de mieux comprendre le procédé de formation de CLP, intéressons-nous dans un premier temps aux nanotubes de carbone et à leur procédé de synthèse.

III – 1 : Les nanotubes de carbone

III – 1 – 1 : Le carbone dans tous ses états

Le carbone peut se présenter sous forme de réseau cristallin ou sous forme amorphe. Concernant le carbone cristallin, le graphite et le diamant sont les deux formes allotropiques naturelles du carbone les plus connues. Le graphite, très répandu, est thermodynamiquement stable dans les conditions normales de température et de pression. Il est formé d'un réseau hexagonal où chaque sommet de l'hexagone correspond à un atome de carbone hybridé sp^2 (Figure III – 1). Sa structure est constituée de feuillets qui peuvent glisser les uns par rapport aux autres donnant au graphite son caractère friable. En effet, sur un même plan, les atomes de carbone sont entourés de trois voisins de manière covalente, induisant une grande cohésion. A l'inverse, entre les feuillets, les seules interactions existantes sont de type Van Der Waals beaucoup plus faibles, permettant alors le glissement inter-feuillets. Le diamant est quant à lui constitué d'atomes de carbone tétraédriques hybridés sp^3 qui forment un réseau cubique à faces centrées (Figure III – 1). Chaque atome est lié à quatre voisins dans un réseau tridimensionnel. De ce fait, le diamant est très résistant et est une des matières les plus difficiles à rayer. Bien que formés uniquement d'atomes de carbone, les propriétés du graphite et du diamant sont totalement différentes et ces derniers sont par conséquent utilisés dans des domaines très divers (mines de crayons ou têtes de forage respectivement).

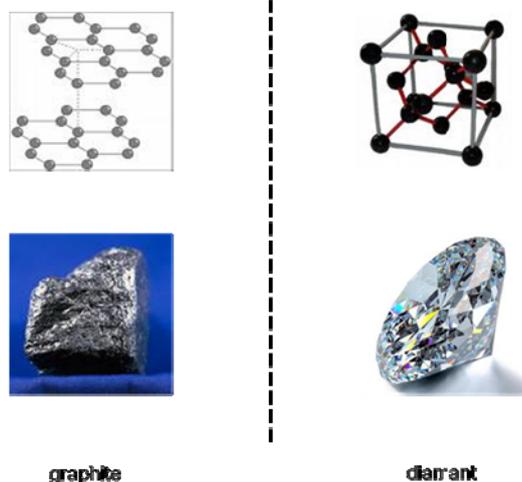


Figure III – 1 : Les deux formes allotropiques naturelles du carbone les plus répandues

Depuis les années 1980-1990, deux nouvelles formes allotropiques du carbone ont été découvertes : les fullerènes et les nanotubes de carbone (Figure III – 2). Le fullerène C_{60} a été découvert par le groupe de Kroto en 1985¹ ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1996. Le fullerène doit son nom trivial de footballène à sa forme sphérique composée d'enchaînements réguliers de pentagones et d'hexagones formant une structure fermée où chaque atome de carbone est lié à trois autres atomes de carbone. Le composé le plus connu est le fullerène C_{60} composé de 60 carbones mais d'autres types ont depuis été synthétisés comme le C_{20} ² ou le C_{70} .³

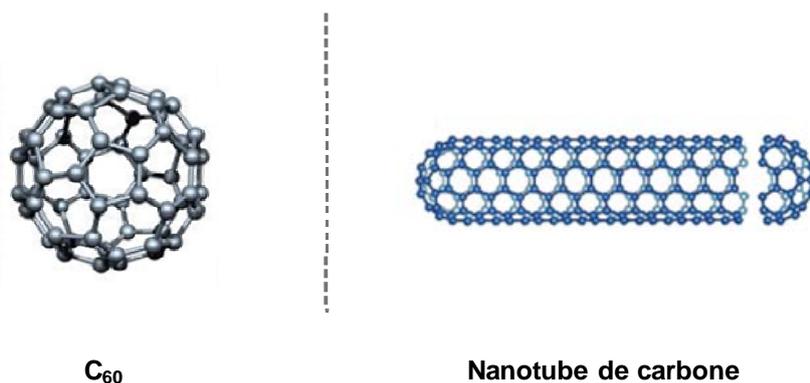


Figure III – 2 : Les deux nouvelles formes allotropiques du carbone

En 1991, lors d'une expérience au cours de laquelle un arc électrique était généré entre deux électrodes de graphite, Ijima a mis en évidence la présence de microtubules cylindriques de carbone graphitique sur la surface de la cathode (Figure III – 3).⁴ L'observation plus poussée par microscopie électronique à transmission a révélé la présence de plusieurs

cylindres de graphite les uns dans les autres : les nanotubes de carbone multi-parois avaient ainsi été formés. Dès lors, les recherches et l'impact des nanotubes de carbone sont allés grandissants et de nombreuses équipes ont étudié leur mode de synthèse et de purification.

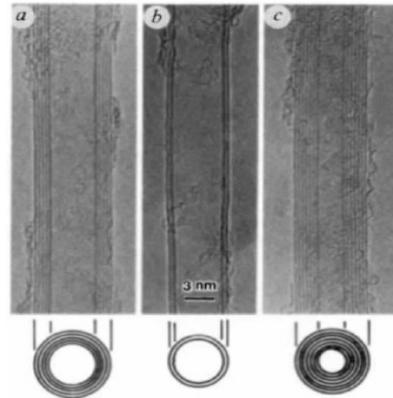


Figure III – 3 : Observations des nanotubes de carbone par Ijima

III – 1 – 2 : Structures des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone se divisent en trois catégories selon le nombre de feuillets de graphène qui les composent :

- Les nanotubes de carbone simple-paroi (SWNTs pour Single-Walled Carbon Nanotubes)
- Les nanotubes de carbone double-parois (DWNTs pour Double-Walled Carbon Nanotubes)
- Les nanotubes de carbone multi-parois (MWNTs pour Multi-Walled Carbon Nanotubes)

Les SWNTs peuvent être considérés comme des plans de graphite enroulés sur eux-mêmes (Figure III – 4, a) et fermés aux extrémités par des demi-sphères de type fullerènes. Comme le graphite, les nanotubes de carbone sont formés d'hexagones de carbone hybridé sp^2 . La façon dont le feuillet de graphène est replié sur lui-même définit un paramètre, appelé hélicité, qui fixe la structure du nanotube (Figure III – 4, b).

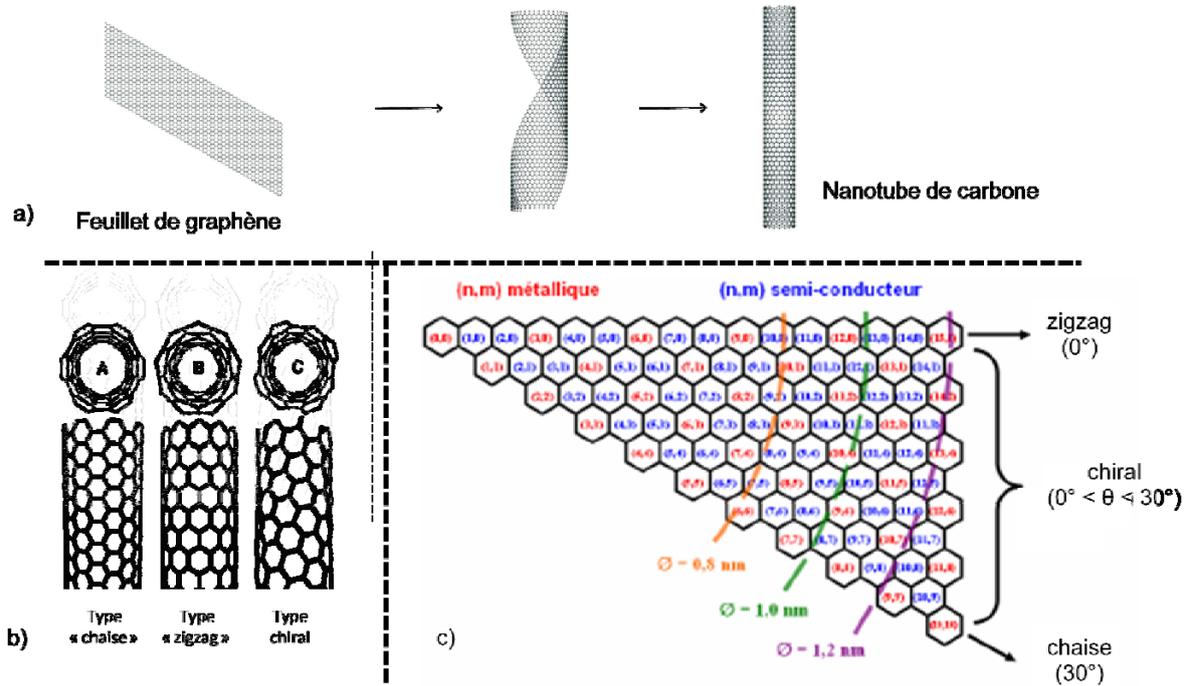


Figure III – 4 : Structures des SWNTs

Hamada a créé un repère (Figure III – 4, c) permettant de répertorier tous les types de nanotubes.⁵ La paire d'indice (n, m) représente les coordonnées du vecteur d'enroulement et l'hélicité, et indique les propriétés électroniques et le diamètre du nanotube considéré. Lorsque $n - m = 3k$ (k étant un nombre entier), le nanotube est alors métallique. C'est le cas pour tous les nanotubes dits « chaise » où $n=m$. Dans le cas où $n - m \neq 3k$, les nanotubes sont semi-conducteurs. Les propriétés électroniques des nanotubes diffèrent selon le type d'enroulement du feuillet de graphène.^{6,7} L'hélicité permet donc de caractériser les différents types de nanotubes existants :

- Les nanotubes de type « chaise » dont l'enroulement s'effectue parallèlement aux cotés des hexagones et qui ont un comportement électronique de type métallique.
- Les nanotubes de type « zigzag » dont l'enroulement s'effectue parallèlement aux cotés des hexagones et qui sont semi-conducteurs.
- Les nanotubes « chiraux » qui sont intermédiaires entre les deux premières espèces.

III – 1 – 3 : Synthèse des nanotubes de carbone

Trois méthodes générales permettent de synthétiser les nanotubes de carbone : les techniques par arc électrique, par ablation laser et par décomposition catalytique.⁸

La technique de l'arc électrique est la méthode la plus aisée à mettre en œuvre et la plus couramment utilisée en laboratoire (Figure III – 5). Il s'agit de la méthode initialement utilisée par Ijima. Sous atmosphère inerte généralement constituée d'hélium, un champ électrique est établi entre les deux électrodes de graphite provoquant un arc électrique. Un plasma est formé à une température d'environ 6000°C et le graphite est alors sublimé à l'anode. La température de la cathode étant inférieure, le graphite se condense à la cathode sous forme de carbone amorphe et de nanotubes de carbone.⁹ Par cette technique, des SWNTs ou des MWNTs peuvent être obtenus selon que du graphite contenant des catalyseurs métalliques ou du graphite pur sont utilisés.^{10,11,12} Ce procédé est peu coûteux et permet la synthèse de nanotubes de carbone avec peu de défauts de structure. L'inconvénient majeur réside dans le faible rendement de synthèse et dans la présence de nombreuses impuretés comme du carbone amorphe, des fullerènes ou encore des catalyseurs métalliques dans le cas des SWNTs.

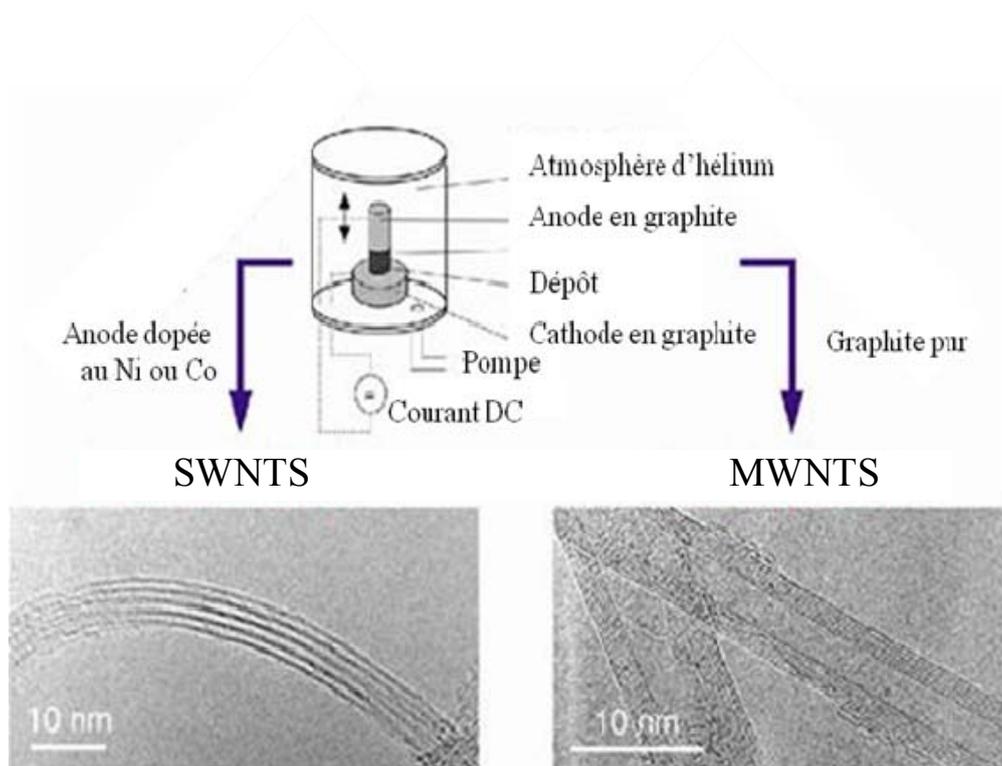


Figure III – 5 : Synthèse de nanotubes de carbone par arc électrique

La technique de l'ablation laser est également utilisée pour la synthèse de nanotubes de carbone.^{13,14} Cette dernière consiste à irradier par un laser de forte énergie du graphite dans une enceinte chauffée à 1200°C. Le carbone une fois sublimé se condense sur une tige de cuivre sous forme de nanotubes de carbone. Cette méthode est coûteuse mais permet de former des SWNTs d'une assez grande pureté.

La troisième grande technique utilise quant à elle la décomposition catalytique.¹⁵ Dans un four sous température modérée (700°C), un gaz carboné (acétylène, méthane...) est décomposé à la surface de particules métalliques, généralement des alliages de fer. Le carbone formé est alors condensé pour donner des nanotubes. L'avantage principal de cette technique est sa mise en œuvre facile pour la production en gros volume, ce qui en fait la méthode de synthèse la plus utilisée industriellement. Néanmoins, les résidus catalytiques sont importants après formation des nanotubes constituant la principale impureté. La croissance par dépôt chimique en phase vapeur (CVD) fournit des nanotubes SWNTs ou MWNTs dont la taille est contrôlée par la taille des catalyseurs (Fe, Ni ou Co) utilisés.¹⁶ Les nanotubes « HiPco », très largement utilisés dans la littérature, sont ainsi fabriqués en utilisant le monoxyde de carbone sous haute pression en présence de métallocène ou de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, ce qui forme des nanotubes dont le diamètre varie entre 0,7 et 1,4 nm.¹⁷

III – 1 – 4 : Purification et solubilisation des nanotubes de carbone

Les lots de nanotubes de carbone comportent généralement un certain nombre d'impuretés comme le carbone amorphe ou des catalyseurs métalliques. De nombreuses techniques de purification existent mais la moins dénaturante consiste en la solubilisation des nanotubes en milieu aqueux par un surfactant.¹⁸ En effet, les nanotubes sont des composés hydrophobes totalement insolubles en milieu aqueux qui sédimentent. En présence de tensio-actifs tels que le SDS et après sonication, les nanotubes de carbone sont alors entourés de tensio-actifs par interactions hydrophobes et se retrouvent en suspension dans la phase aqueuse. Dès lors, une séparation est possible avec les particules de carbone amorphe et/ou les traces de catalyseurs qui eux décantent rapidement. Après filtration puis élimination du tensio-actif, les nanotubes sont obtenus avec une grande pureté. Cette méthode de suspension des nanotubes a été plus récemment utilisée au laboratoire pour séparer les nanotubes selon

leur hélicité, en utilisant des tensio-actifs dont la structure spécifique rappelle l'arrangement des atomes de carbone au sein du nanotube.^{19,20}

Les nanotubes de carbone du fait de leur résistance mécanique importante sont étudiés afin de renforcer de nombreux matériaux.^{21,22} Cependant, un frein à leur développement dans de nombreuses applications reste encore leur répartition non-homogène au sein du matériau, notamment dans le domaine des polymères. La principale difficulté consiste à briser les forces très cohésives (liaisons hydrophobes, π -stacking) qui lient les nanotubes de carbone entre eux, pour permettre leur dispersion à travers les différentes matrices. La solubilisation des nanotubes peut alors être envisagée dans ce but car elle permet de séparer efficacement les nanotubes entre eux. Cette technique de solubilisation ouvre ainsi des perspectives pour une meilleure homogénéité au sein de la matrice polymérique et donc une meilleure efficacité du renforcement.

A ce titre, de nombreux groupes travaillent sur la solubilisation de nanotubes de carbone où deux méthodes co-existent. La première est l'approche covalente.^{23,24} Dans la majeure partie des cas, elle consiste à former lors d'un traitement acide des motifs acides carboxyliques au niveau des défauts ponctuels du nanotube. Mais d'autres fonctions chimiques peuvent être incorporées à la surface des nanotubes de carbone, issues de l'addition de carbènes, d'ylures d'azote²⁵ ou de cycloaddition de nitrènes²⁶ permettant le greffage de motifs hydrosolubles. L'inconvénient majeur de ces méthodes réside dans la modification des propriétés des nanotubes notamment les propriétés électroniques. En effet, ces additions perturbent la conjugaison du système le long du nanotube et de ce fait une perte des propriétés électroniques est souvent observée. Afin de palier à ces problèmes, la deuxième méthode, basée sur une approche non covalente, a été développée. L'approche non covalente consiste à sélectionner les parties hydrophobes appropriées pour que les tensio-actifs se lient directement à la surface des nanotubes grâce aux forces de Van Der Waals. Les tensio-actifs employés sont anioniques comme le SDS^{27,28} ou le benzène-dodécylsulfate de sodium (SDBS)²⁹, cationiques comme le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB)^{30,31} ou neutres comme le Tween-80³⁰ ou le triton-X³². Les polymères aromatiques³³ ou les biomolécules^{34,35,36} sont également utilisés pour disperser les nanotubes en milieu aqueux.

III – 2 : Etude de la formation et de la stabilité des suspensions de nanotubes de carbone³⁷

Au sein de notre procédé de formation des CLP (Chapitre I, Figure I – 19), les nanotubes de carbone recouverts de lipides polymérisés ont formé des suspensions stables en milieu aqueux. Les observations par microscopie électronique à transmission ont montré que ces nanotubes de carbone étaient recouverts d'arrangements hémicylindriques de lipides. Dans le cadre de notre projet, une étude de l'adsorption de lipide sur différents nanotubes (SWNTs, DWNTs, MWNTs) puis de la stabilité des suspensions obtenues a été réalisée. Jusqu'alors, le lipide 11,8-NTA **1** était utilisé au laboratoire. Afin de poursuivre les études réalisées, ce lipide a donc été utilisé. Grâce au motif photo-polymérisable du lipide, il sera possible de quantifier le lipide adsorbé à la surface du nanotube et les analyses par MET nous permettront de vérifier la nature des arrangements observés

III – 2 – 1 : Adsorption du lipide 11,8-NTA **1** sur différents nanotubes

Afin de réaliser cette étude, différents nanotubes ont été utilisés dans le but de couvrir une large gamme de possibilités tant au point de vue de la structure même du nanotube (SWNTs, DWNTs ou MWNTs) que de son mode de fabrication. Ces derniers sont représentés dans le Tableau III – 1.

Entrée	Nanotubes	Méthode de production	Diamètre	Pureté en nanotubes
1	Mer SWNTs	Arc électrique	1-2 nm	12%
2	Mer SWNTs purifiés	Arc électrique	1-2 nm	95%
3	Aldrich DWNTs	CVD	2-5 nm	50-80%
4	Nanocyl DWNTs	CVD	2-5 nm	60-80%
5	Nanocyl MWNTs	CVD	10-15 nm	60-80%
6	n-Tec MWNTs	Arc électrique	10-30 nm	60-70%
7	Sunnano MWNTs	CVD	10-15 nm	20-60%
8	Arkema U100 MWNTs	CVD	10-15 nm	70-90%

Tableau III – 1 : Caractéristiques des nanotubes utilisés

Les SWNTs proviennent de la société Mer et sont fabriqués par la méthode de l'arc électrique (entrées 1 et 2). La différence entre les deux lots réside dans la pureté de l'échantillon. Le deuxième échantillon a subi un traitement de purification par ultra-sonication suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique.³⁸ La quasi-totalité du carbone amorphe et des catalyseurs métalliques est alors éliminée. Concernant les DWNTs, la méthode de fabrication est la croissance par dépôt chimique en phase vapeur. La différence entre les deux échantillons est leur fournisseur (entrées 3 et 4). Les MWNTs de la société Nanocyl ont été choisis afin de voir l'influence de la nature des nanotubes (DWNTs et MWNTs) chez un même fournisseur (entrées 4 et 5). Les MWNTs de la société n-Tec sont les seuls MWNTs de la liste à être fabriqués par la méthode de l'arc électrique (entrée 6).

La polymérisation du lipide est réalisée au niveau du motif diacétylène qui, lorsqu'il est placé sous irradiation UV, réagit lors d'une réaction 1-4 entre les monomères pour former un enchaînement ène-yne (Figure III – 6) entre les différentes chaînes lipidiques.³⁹

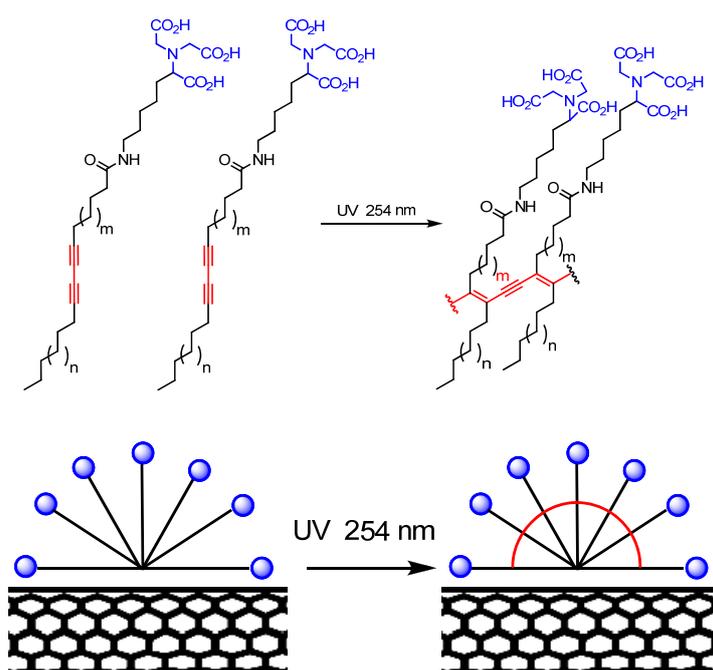


Figure III – 6 : Représentations schématiques de la polymérisation

La formation de ce motif ène-yne s'accompagne d'une augmentation significative de l'absorbance UV-Visible. En effet, cet enchaînement présente une délocalisation électronique importante des liaisons π induisant l'absorbance dans le domaine UV-Visible. Dans des structures diacétylènes plus classiques comme les liposomes,^{40,41} les couches de Langmuir-Blodgett⁴² ou les organo-gels,⁴³ la polymérisation de ce motif fournit des polymères dont

l'absorbance se situe vers 600 nm due à une très forte délocalisation. Cependant lorsque le système polymérique est soumis à une torsion, notamment en réponse à un stimulus extérieur (température, pH...), la couleur bleue vire au rouge synonyme d'un déplacement de la bande d'absorption vers 400 nm.^{44,45} Ces polymères peuvent alors servir de capteurs avec une détection facilitée par le changement de couleur. Dans notre cas, les CLP et les micelles polymérisées sont des structures supramoléculaires de taille relativement faible impliquant une courbure importante, la couleur obtenue est ainsi orange. L'absorbance UV-Visible obtenue va ainsi nous permettre de quantifier l'adsorption du lipide sur les différents nanotubes.

Au cours du procédé de formation des CLP, après la première étape de mélange par sonication d'une quantité identique de lipide et de nanotubes (20 mg) à une concentration de 5 mg/mL dans une solution de Tris (100 mM Tris, 150 mM NaCl), un mélange entre les nanotubes recouverts de lipide et le lipide non adsorbé, restant en solution sous forme de micelles, est obtenu (Figure III – 7, étape 1). Le mélange placé sous irradiation UV est alors figé lors d'une étape de polymérisation (Figure III – 7, étape 2). La séparation par centrifugation fournit un culot où les nanotubes sont recouverts de lipide, et un surnageant contenant le reste de lipide sous forme de micelles polymérisées (Figure III – 7, étape 3). A ce stade, un dosage par spectroscopie UV-Visible à 285 nm devrait permettre de mesurer la quantité de lipide restant en solution et donc de déduire par soustraction la quantité de lipide adsorbé.

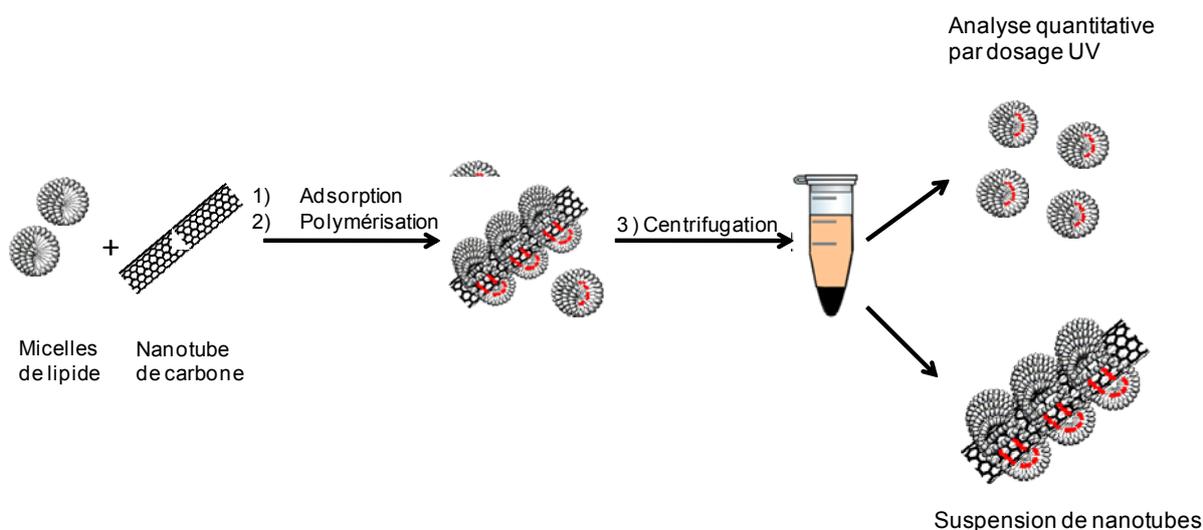


Figure III – 7 : Protocole permettant la quantification de lipide adsorbé

Après avoir effectué une courbe de calibration à l'aide de solutions de micelles polymérisées à concentrations fixées de 0 à 5 mg/mL (cf: Partie expérimentale), le pourcentage de lipide adsorbé pour un ratio lipide/nanotubes de 1/1 a été déterminé pour les différents nanotubes (Tableau III – 2).

Nanotubes utilisés	Mer SWNTs	Mer SWNTs Purifiés	Aldrich DWNTs	Nanocyl DWNTs	Nanocyl MWNTs	n-Tec MWNTs	Sunnano MWNTs	Arkema U100 MWNTs
% massique de lipide adsorbé	50%	60%	28%	55%	55%	27%	24%	64%

Tableau III – 2 : Quantité de lipide adsorbé sur les différents nanotubes pour un ratio massique lipide/nanotube de 1/1, à une concentration initiale de lipide de 5 mg/mL dans une solution de Tris

Bien que le lipide soit adsorbé sur tous les nanotubes, la quantité adsorbée est très variable selon les nanotubes de carbone utilisés. Il est difficile de percevoir une corrélation précise entre la capacité d'adsorption et le type de nanotubes (SWNTs, DWNTs ou MWNTs). Par exemple, pour les deux échantillons Nanocyl, le taux d'adsorption est identique (55%). Le mode de fabrication ne semble pas être un facteur déterminant pour l'adsorption. En effet, pour les MWNTs fabriqués par la technique CVD, l'adsorption varie de 24% pour les Sunnano à 64% pour les Arkema. De plus, la pureté des nanotubes pour un même fournisseur influence peu l'adsorption du lipide. En effet, pour les deux échantillons de SWNTs Mer la pureté passe de 12% à plus de 95% alors que l'adsorption augmente seulement de 50% à 60%. Ceci pourrait s'expliquer par une adsorption partielle du lipide sur le carbone amorphe présent en grande quantité dans les SWNTs non purifiés. Finalement, le meilleur taux d'adsorption de 64% est obtenu avec les MWNTs Arkema U100.

III – 2 – 2 : Etude de l'adsorption du lipide selon le ratio lipide/nanotubes

Ces résultats nous ont poussés à réaliser une étude d'adsorption plus approfondie. Quatre échantillons de nanotubes ont alors été choisis : les SWNTs Mer purifiés, les DWNTs Aldrich, les MWNTs n-Tec et les MWNTs Arkema U100. Le même procédé a été utilisé en faisant cette fois-ci varier le ratio massique lipide/nanotubes. La concentration du lipide est toujours fixée à 5 mg/mL, mais la quantité de nanotubes varie quant à elle de 0,5 à 30 mg/mL,

correspondant à des rapports massiques lipide / nanotubes de 10/1 à 1/6. Les résultats obtenus par dosage UV-Visible sont représentés dans la Figure III – 8.

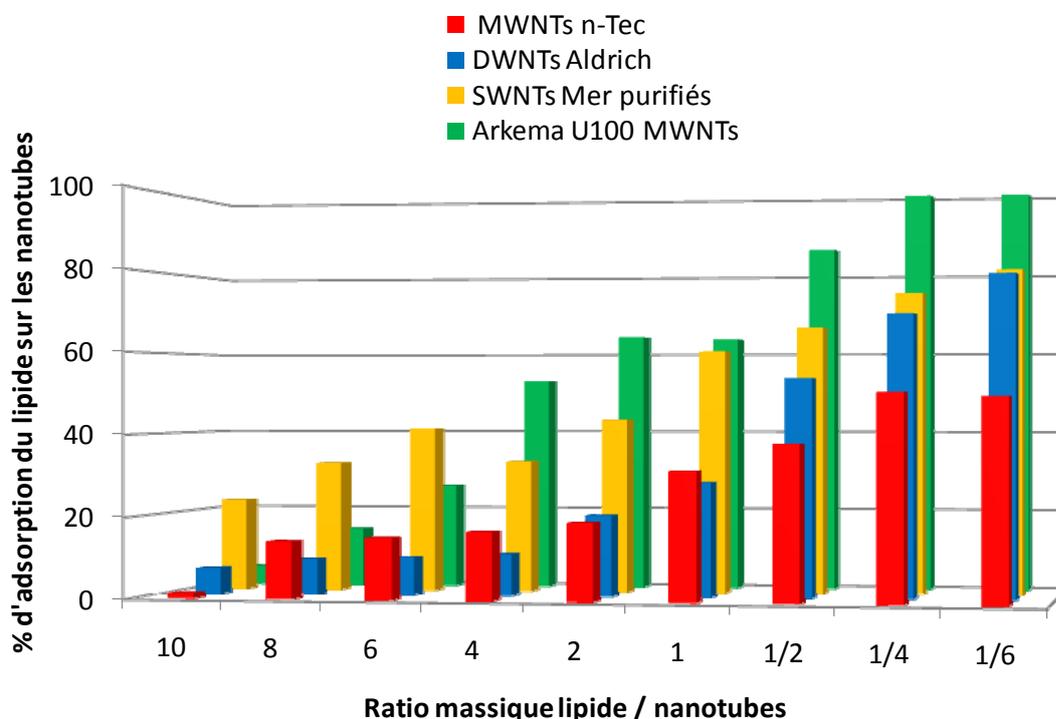


Figure III – 8 : Adsorption du lipide sur les nanotubes de carbone à différents ratios lipide/nanotubes, à une concentration initiale de lipide de 5 mg/mL dans une solution de Tris

Tous les échantillons présentent la même tendance : plus il y a de nanotubes, plus le lipide est adsorbé. Les MWNTs Arkema U100 montrent encore les meilleurs résultats. En effet, à partir d'un ratio 1/4, une adsorption complète du lipide est observée. A un ratio 1/6, les DWNTs Aldrich et les SWNTs Mer purifiés ont la même capacité d'adsorption à hauteur de 80%. Cependant, à faible concentration les SWNTs sont plus efficaces en terme d'adsorption. Ceci est sans doute dû au fait que lorsque le lipide est utilisé en excès, les SWNTs sont mieux disloqués les uns des autres au sein des fagots de nanotubes, et présentent donc une plus grande surface d'adsorption que les DWNTs et les MWNTs. Concernant les MWNTs n-Tec, un maximum d'adsorption à 55% est observé pour un ratio de 1/4.

Certains nanotubes apparaissent plus efficaces que d'autres au niveau de l'adsorption du lipide et notamment les Arkema U100 avec une adsorption de 100% à un ratio 1/4 lipide/nanotubes. Toutefois, il semble difficile de prédire la capacité d'adsorption d'un type de nanotube.

III – 2 – 3 : Observation par MET des auto-assemblages lipidiques à la surface des nanotubes de carbone

Les études précédentes montrent que le lipide s'adsorbe plus ou moins bien sur les nanotubes de carbone. La formation des arrangements supramoléculaires à la surface des nanotubes va être étudiée afin de vérifier si tous les nanotubes permettent la formation d'arrangements hémi-micellaires avec le lipide 11,8-NTA **1**.

Dans le protocole utilisé précédemment, après centrifugation, le culot est cette fois-ci mis en suspension dans du tampon Tris. Ce cycle de centrifugation/mise en suspension est répété deux fois afin d'éliminer toute trace de lipide non adsorbé en suspension. Les échantillons sont ensuite analysés par MET. Deux types d'arrangements ont été obtenus. Le premier est l'arrangement de lipide sous forme d'hémi-micelles cylindriques le long des nanotubes⁴⁶ (Figure III – 9).

Ces auto-assemblages sont notamment observés pour les SWNTs Mer purifiés, les DWNTs provenant d'Aldrich, les MWNTs n-Tec, les MWNTs Nanocyl et les MWNTs Arkema U100 et ont une largeur variable de 10-12 nm pour les SWNTS et jusqu'à 30-35 nm pour les MWNTs et une épaisseur relativement fixe (8-9 nm).

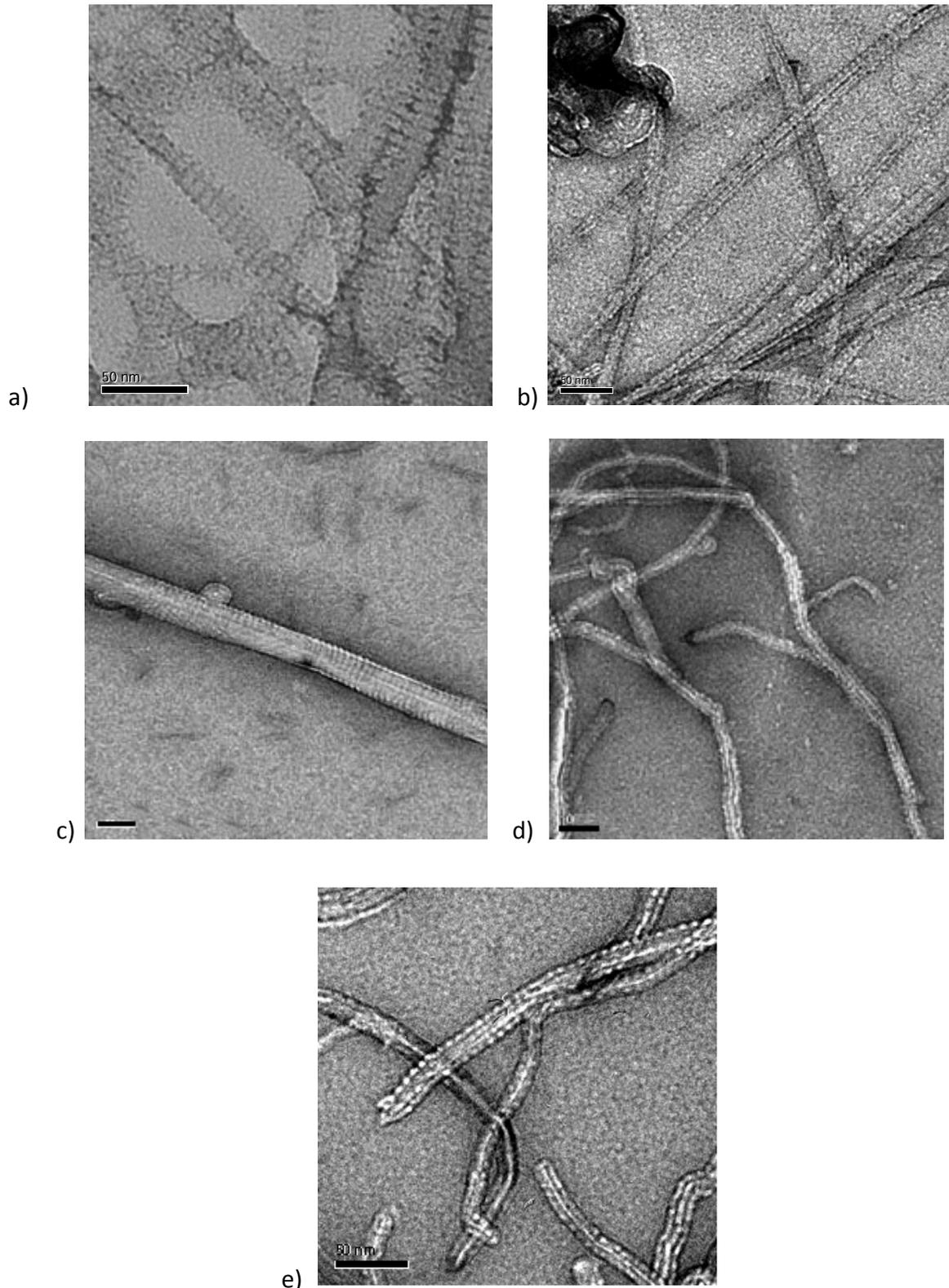


Figure III – 9 : Images MET de nanotubes couverts d'arrangements hémi-cylindriques : a) SWNTs Mer purifiés ; b) DWNTs Aldrich ; c) MWNTs n-Tec ; d) MWNTs Nanocyl ; e) MWNTs Arkema U100 ; barre : 50 nm

Pour les autres (SWNTs Mer non purifiés, DWNTs Nanocyl, Sunnano MWNTs), les striations sur les nanotubes ne sont pas visibles bien que le lipide semble recouvrir les nanotubes de carbone (Figure III – 10).

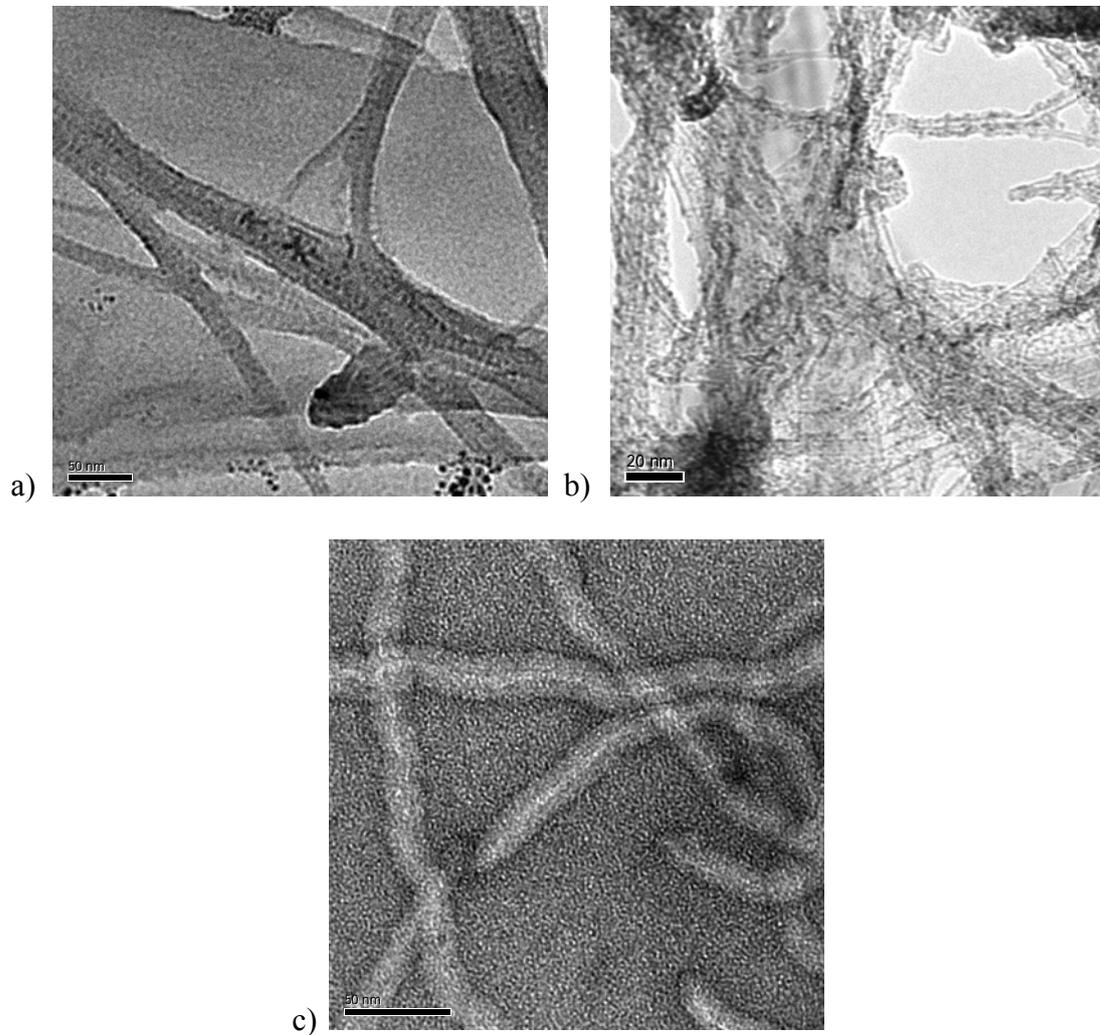


Figure III – 10 : Images MET de nanotubes couverts de lipide : a) SWNTs Mer non purifiés ;
b) DWNTs Nanocyl ; c) MWNTs Sunnano

Par conséquent, une corrélation entre la quantité de lipide adsorbé sur les nanotubes de carbone et la formation d'auto-assemblages sous forme d'hémi-micelles ne semble pas évidente.

III – 2 – 4 : Etude de la stabilité des suspensions de nanotubes de carbone obtenues

La stabilité des suspensions obtenues avec les différents nanotubes a finalement été étudiée. Pour cela, après élimination du lipide non adsorbé en excès, les nanotubes sont mis en suspension par sonication (5 minutes, 80W) dans une solution de tampon Tris (pH = 8) à une concentration de 5 mg/mL en nanotubes. A ce stade, tous les nanotubes forment des suspensions stables. Les suspensions sont alors observées visuellement sur une période d'un mois (Figure III – 11).

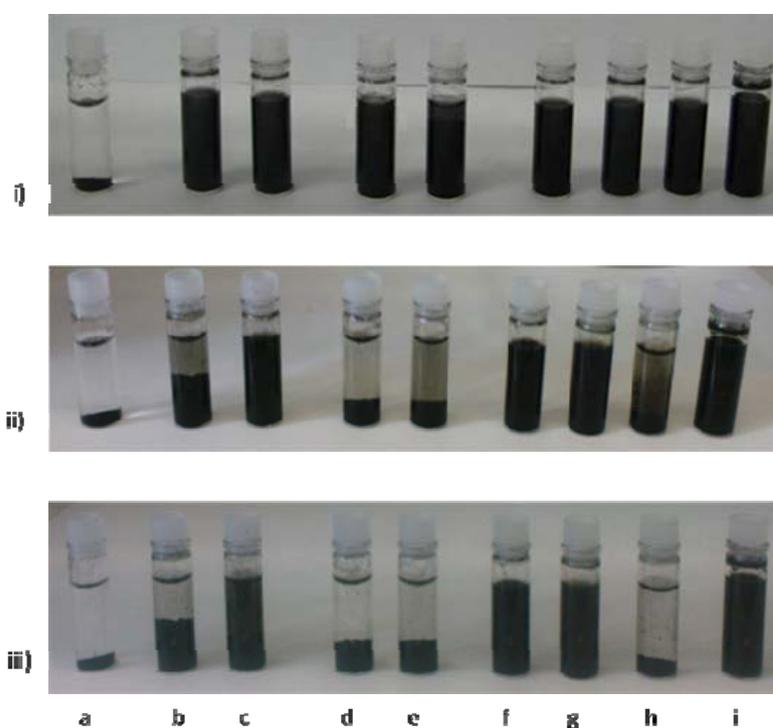


Figure III-11 : Photographies des suspensions de nanotubes de carbone après élimination de l'excès de lipide après i) 1 jour; ii) 10 jours; iii) 30 jours: a) exemple de nanotubes sans lipide (n-Tec MWNTs) ; b) SWNTs Mer ; c) SWNTs Mer purifiés ; d) DWNTs Aldrich ; e) DWNTs Nanocyl ; f) MWNTs Nanocyl ; g) MWNTs n-Tec ; h) MWNTs Sunnano ; i) MWNTs Arkema U100.

Après un jour, tous les nanotubes de carbone forment encore des suspensions stables (Figure III – 11, i) alors que les nanotubes en l'absence de lipide sédimentent très vite après quelques minutes (échantillon a). Ceci met en évidence l'importance du lipide pour l'obtention de suspensions stables. Cependant, après 10 jours des différences notables ont été observées selon le type de nanotube utilisé (Figure III – 11, ii). Les SWNTs Mer purifiés

forment toujours une suspension stable alors que les SWNTs Mer non purifiés ont décanté probablement du fait de la grande proportion de carbone amorphe présent dans l'échantillon (échantillons b et c). Il semble que les DWNTs ne permettent pas d'obtenir des suspensions stables car nos deux échantillons ont sédimenté (échantillons d et e). Concernant les MWNTs, seul l'échantillon de nanotubes Sunnano a décanté (échantillon h). Après 30 jours, les différences entre les échantillons se sont accentuées (Figure III – 11, iii). En effet, les suspensions dans lesquelles des traces de nanotubes étaient encore présentes au bout de 10 jours ont complètement décanté (échantillons b, e et h). Finalement, quatre échantillons se sont retrouvés stables après un mois à savoir les SWNTs Mer purifiés, les MWNTs Nanocyl, les MWNTs n-Tec et les MWNTs Arkema U100 (échantillons c, f, g et i). De plus, ces échantillons de nanotubes ont montré une stabilité supérieure à six mois.

Notons que la densité des nanotubes de carbone utilisés a peu ou pas d'impact sur la stabilité des suspensions obtenues. En effet, les MWNTs n-Tec sont les plus denses (600 kg/m^3) et les plus stables tandis que les MWNT Sunnano décantent alors qu'ils sont les plus légers (30 kg/m^3). C'est donc bien la capacité du lipide à s'insérer entre les nanotubes de carbone qui induit la stabilité des suspensions.

III – 2 – 5 : Conclusions et choix des nanotubes pour le procédé de formation des CLP

Afin de conclure sur les travaux effectués, les résultats ont été résumés dans le Tableau III –3.

Entrée	CNTs	Adsorption du lipide	MET	Stabilité de la suspension
1	Contrôle	/	/	- - -
2	SWNTs Mer	+ + -	+ - -	+ + -
3	SWNTs Mer purifiés	+ + -	+ + +	+ + +
4	DWNTs Aldrich	+ - -	+ + +	+ + +
5	DWNTs Nanocyl	+ + -	+ - -	+ + -
6	MWNTs Nanocyl	+ + -	+ - -	+ + +
7	MWNTs n-Tec	+ - -	+ + +	+ + +
8	MWNTs Sunnano	+ - -	+ - -	+ + -
9	MWNTs Arkema U100	+ + +	+ + -	+ + +

Les sigles +++ correspondent aux meilleurs résultats, +- à d'excellents résultats, +- à de bons résultats et --- aux expériences de contrôle sans lipide.

Tableau III – 3: Conclusion sur le comportement des nanotubes de carbone.

De façon générale, on peut noter qu'une part importante des suspensions de nanotubes présente une très bonne stabilité après un jour. Cependant, aux vues de l'ensemble des résultats, il semble qu'il n'y ait pas de corrélation entre la quantité de lipide adsorbé et la formation des anneaux le long des nanotubes de carbone (entrées 4 et 9). De même, la relation entre la quantité de lipide adsorbé et la stabilité des suspensions n'est pas évidente (entrées 7 et 9). De ce fait, il semble que chaque nanotube ait un comportement propre, même si nous avons expérimentalement constaté que les nanotubes synthétisés par arc électrique présentent de meilleurs résultats en termes de formation d'anneaux.

Parmi les nanotubes présentant de bons résultats, le coût élevé des DWNTs Aldrich ne permet pas de poursuivre les expériences. De même, les SWNTs Mer purifiés étant devenus indisponibles, notre choix s'oriente donc sur les MWNTs n-Tec qui présentent de très bons résultats en termes de qualité d'arrangements lipidiques formés à la surface et de stabilité des suspensions obtenues, même si l'adsorption du lipide reste moyenne (27%) comparée à d'autres.

Par la suite, les MWNTs n-Tec seront donc utilisés pour la formation des CLP avec nos lipides à tête polaire malonate. Cependant, avant d'étudier la formation de ces CLP, nous allons nous intéresser à l'étude des micelles qui serviront de système modèle lors de nos études de fonctionnalisation interne.

III – 3 : Formation et caractérisation des micelles

III – 3 – 1 : Choix du milieu aqueux

Afin de solubiliser les lipides 10,9-malonate **4** et alcyne-9,9-malonate **5**, nous avons constaté au chapitre II qu'il fallait se placer dans des conditions basiques voire fortement basiques. Ceci peut s'expliquer par le pKa des acides carboxyliques des lipides. Kanicky et Shah ont montré que le pKa d'acides gras était dépendant de la longueur de la chaîne carbonée (Figure III – 12) : plus cette dernière est importante et plus le pKa est élevé. Par exemple, le pKa de l'acide stéarique possédant 18 carbones est de l'ordre de 10.⁴⁷

Nous pouvons donc penser que nos molécules amphiphiles ayant 26 atomes de carbone possèdent un pKa assez élevé vers 11-12. De ce fait, il apparaît qu'un pH suffisamment basique est nécessaire pour permettre une déprotonation d'un des acides carboxyliques du malonate afin de solubiliser le lipide.

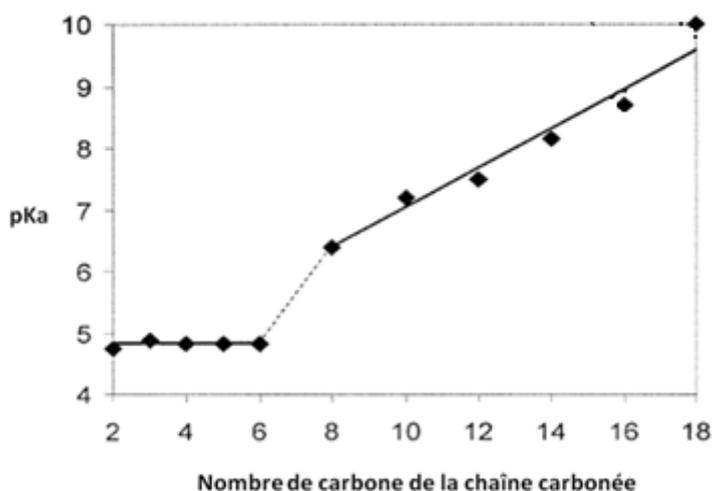


Figure III – 12 : pKa de l'acide carboxylique en fonction de la longueur de la chaîne carbonée

Le lipide 11,8-NTA **1** ayant été utilisé dans le tampon Tris pH = 8 (100 mM Tris, 150 mM NaCl), nous avons décidé de garder ce dispersant en modifiant son pH. Lors de la préparation d'une solution de Tris classique pH = 8 (100 mM Tris, 150 mM NaCl), après dissolution du tris(hydroxyméthyl)aminométhane, le pH est d'environ 10. Une solution d'acide chlorhydrique concentrée est alors ajoutée afin d'arriver dans la zone tampon dont le pH est de 7-8. Nous avons décidé au contraire d'ajouter quelques gouttes d'une solution de soude 1N afin d'obtenir une solution de Tris à pH = 11. Tout en étant conscient qu'il ne

s'agisse plus d'une véritable solution tampon, nous avons néanmoins décidé d'utiliser cette dernière. Cette solution a donc été choisie et sera nommée par la suite « solution Tris pH = 11 ».

III – 3 – 2 : Photo-polymérisation des lipides malonate 4 et 5

L'étude de la photo-polymérisation a été réalisée avec le lipide 4. L'objectif est de déterminer la durée de l'étape de photo-polymérisation du lipide 4 nécessaire pour une polymérisation suffisante des auto-arrangements lipidiques. Pour ce faire, le lipide est solubilisé dans une solution de Tris pH = 11 à une concentration de 5 mg/mL formant ainsi des micelles. Différents lots de ces micelles sont placés dans un four UV (254 nm, 48W) et le suivi de l'absorption UV-Visible est effectué au cours du temps (Figure III – 13).

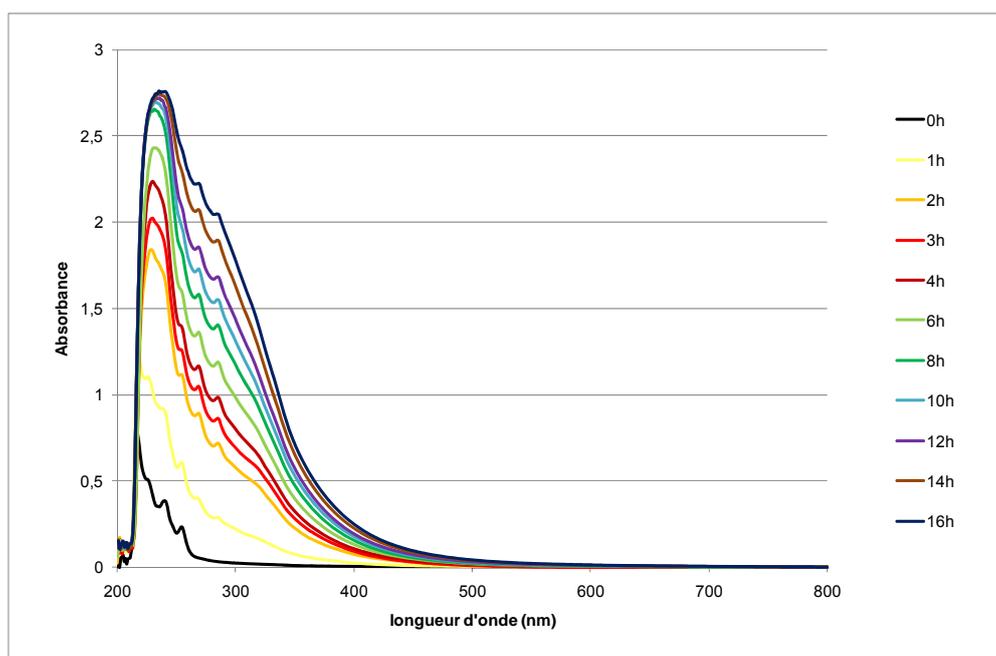


Figure III – 13 : Suivi de polymérisation par spectroscopie UV-Visible

Les micelles de lipide 4 possèdent une absorbance UV-Visible comprise entre 200 et 500 nm. Durant les deux premières heures, une nette augmentation de l'absorbance est visible. Puis, au cours du temps, celle-ci continue d'augmenter comme si la polymérisation n'était pas complètement terminée jusqu'à 16 heures d'irradiation où l'expérience a été stoppée. La polymérisation des micelles possédant des motifs diacétylènes est donc lente par rapport à la polymérisation des liposomes diacétyléniques.

En effet, les temps de polymérisation des liposomes rapportés dans la littérature sont de quelques minutes à quelques dizaines de minutes.^{40,48} Or, dans notre cas, la polymérisation s'effectue pendant plusieurs heures. Ceci peut s'expliquer par le fait que les micelles ont une structure de très petite taille. De ce fait, l'enchaînement ène-yne est difficile à former car les molécules ne sont pas dans une conformation favorable pour réagir (la géométrie plane étant la conformation idéale). Ce phénomène a été observé par le groupe de Choi.⁴⁹ Dans un premier temps, des liposomes diacétyléniques de taille variable comprise entre 90 nm et 900 nm sont formés. Ils sont ensuite irradiés 2 minutes et les comportements se sont révélés différents : les liposomes de grande taille (900 nm) étaient devenus bleus comme dans la plupart des cas rapportés, témoin d'une polymérisation avancée. En revanche, les échantillons de 170 nm étaient devenus roses et ceux de 90 nm n'avaient pas changé de couleur, témoins d'une polymérisation plus difficile.

Dans notre cas, les micelles forment des assemblages de l'ordre de 5-7 nm. Il est nécessaire d'effectuer une polymérisation pendant au minimum une heure pour apercevoir un changement de couleur. De plus, l'absorbance de nos micelles est différente de celle des liposomes qui se situe plutôt vers 600 nm. Il est probable que la faible taille de nos micelles entraîne une délocalisation faible au sein de l'enchaînement ène-yne formé lors de la photopolymérisation, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance.

Nous avons alors décidé de polymériser dans des contenants dont la surface d'irradiation est cinq fois plus importante, ce qui devrait permettre à une quantité supérieure de photons d'interagir. Un suivi de polymérisation a été effectué pour les deux types d'échantillons à une longueur d'onde de 330 nm (Figure III – 14).

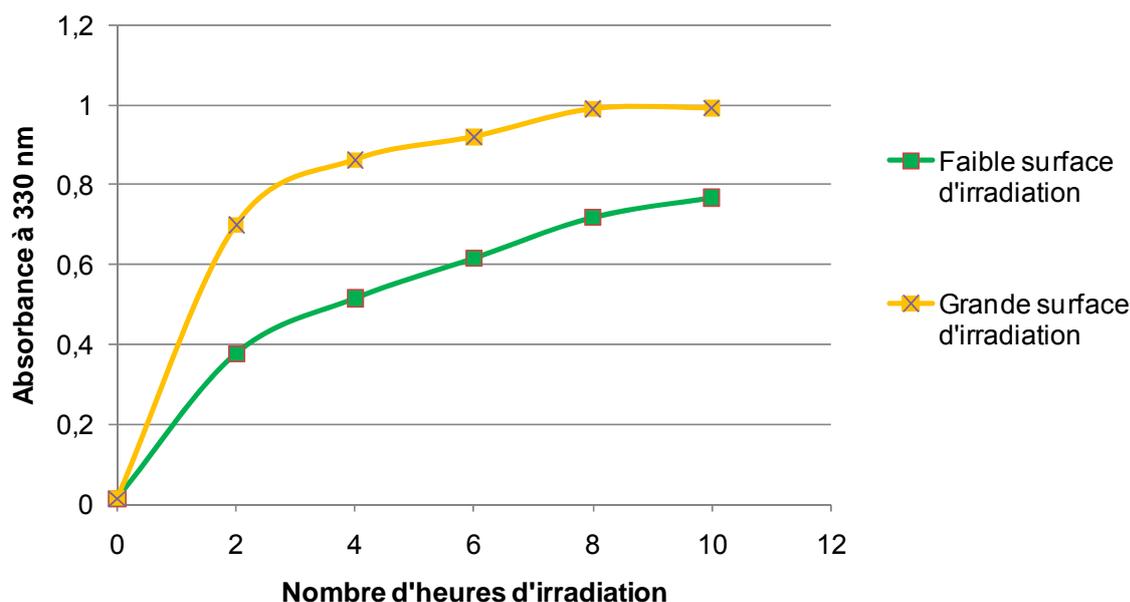


Figure III – 14 : Suivi de l'absorbance de micelles polymérisées

A la vue des courbes, une surface d'irradiation cinq fois plus importante permet une meilleure polymérisation. En effet, au bout de 2 heures d'irradiation, l'absorption est presque doublée. De plus, un plateau est obtenu après 8 heures d'irradiation alors qu'auparavant l'absorbance augmentait continuellement. Dans ces nouvelles conditions, la polymérisation est arrivée à son terme au bout de 10 heures. Cette valeur a alors été retenue pour la polymérisation des échantillons.

Les essais réalisés sur le lipide alcyne-9,9-malonate **5** ont montré un comportement similaire à celui du lipide **4**. Une polymérisation de 10 heures a donc été également retenue pour ce lipide.

III – 3 – 3 : Analyses des micelles et des micelles polymérisées

III – 3 – 3 – 1 : Analyses par DLS

L'analyse par DLS permet de mesurer la taille de particules en solution. Cependant, il existe trois types de résultats par DLS : les analyses par nombre, par volume et par intensité. Le résultat expérimental est celui lié à l'intensité qui correspond à l'intensité lumineuse que les particules diffusent et que le détecteur collecte. Les deux autres graphiques (nombre et volume) correspondent à des valeurs recalculées par un algorithme. La diffusion de la lumière

par les particules est une diffusion de type Rayleigh dont l'intensité est proportionnelle à la puissance 6 du rayon de la particule. Par le calcul, il est alors possible d'obtenir soit une distribution en volume proportionnelle au cube du rayon de la particule, soit une distribution en nombre proportionnelle au rayon de la particule. De ce fait, les distributions de taille peuvent être différentes selon que les représentations sont en nombre, en volume ou en intensité. La Figure III – 15 montre l'exemple de deux familles de particules, l'une à 5 nm et l'autre à 50 nm, dont le nombre de particules est identique. Alors que la distribution est identique en nombre, les grandes particules ont une distribution mille fois plus importante en volume et un million de fois en intensité.

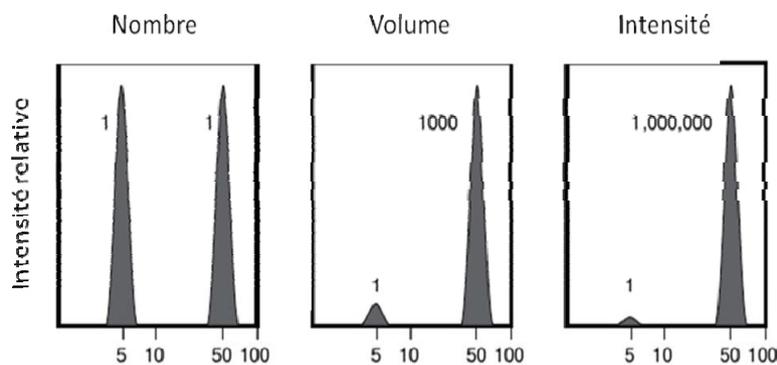


Figure III – 15 : Exemple d'analyses par DLS d'échantillons contenant deux types différents de particules.

Nous avons analysé nos échantillons de micelles de lipide **4** et **5**. Les résultats sont identiques pour les deux lipides et seuls ceux concernant le lipide **4** sont représentés Figure III – 16.

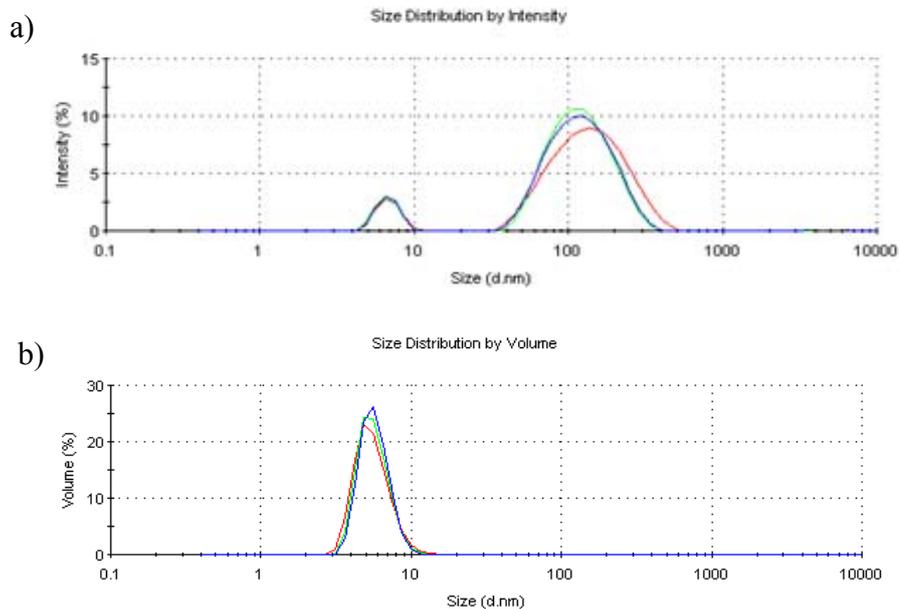


Figure III – 16 : Analyse par DLS des micelles de lipide 4 : a) en intensité ; b) en volume

Les analyses en volume montrent la formation de micelles dont le diamètre est compris entre 5 et 7 nm. Cependant, les analyses en intensité présentent une autre population dont la taille est d'environ 100 nm. Cette population correspond à des agrégats de lipides qui se dissocient difficilement, provenant sans doute de la difficulté à solubiliser le lipide dans la solution aqueuse. L'absence de cette population à 100 nm dans l'analyse en volume indique qu'il y a très peu d'agrégats en solution et que la quasi-totalité de l'échantillon est sous forme de micelles.

Il est à noter que la limite de détection de l'appareil utilisé est de 0,6 nm. Les valeurs des tailles des micelles étant proches de cette valeur, elles sont à prendre avec précaution.

Les micelles polymérisées après 10 heures d'irradiation UV (48W, 254 nm), à une concentration de 5 mg/mL dans la solution de Tris à pH = 11 sont alors analysées par DLS (Figure III – 17).

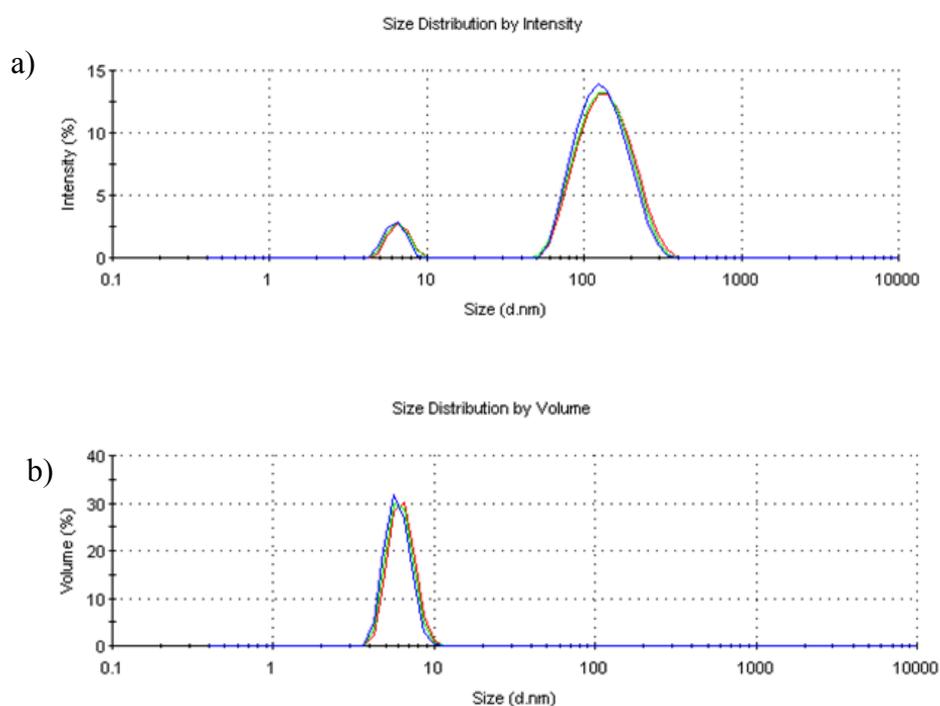


Figure III – 17 : Analyse par DLS des micelles polymérisées de lipide 4 a) en intensité ; b) en volume

Les résultats sont identiques à ceux obtenus pour les micelles non polymérisées. L'échantillon comprend une large quantité de micelles dont le diamètre est compris entre 5 et

7 nm et présente quelques agrégats dont la taille est d'environ 100 nm. La photo-polymérisation ne semble donc pas affecter la structure des micelles.

III – 3 – 3 – 2 : Analyses par MET

Les clichés de MET montrent eux aussi peu de différences entre les échantillons de micelles non polymérisées et de micelles polymérisées dans la solution de Tris (Figure III – 18). Sur l'ensemble de l'échantillon, des arrangements micellaires sont présents avec quelques agrégats provenant soit de l'échantillon lui-même, soit de la mise sous vide dans le microscope qui a tendance à faire s'agréger les objets.

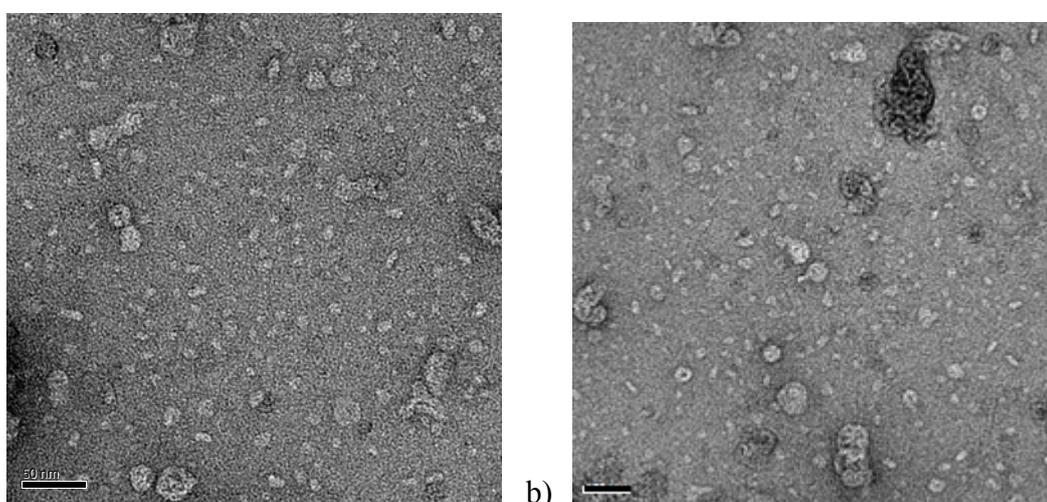


Figure III – 18 : Images MET de micelles de lipide 4: a) avant polymérisation; b) après polymérisation ; barre : 50 nm

III – 3 – 4 : Etude de la CMC des micelles

III – 3 – 4 – 1 : Définition de la CMC

La CMC d'un tensio-actif est la concentration à partir de laquelle des micelles commencent à se former. En effet, à faible concentration, les molécules peu solubles ont tendance à se positionner préférentiellement à l'interface air-eau : la tête polaire dans la solution aqueuse et la queue hydrophobe à l'air, parfaitement libres les unes des autres (Figure III – 19, a). Lorsque la concentration du tensio-actif augmente, les différentes molécules s'auto-organisent de plus en plus à la surface et la concentration au sein du liquide augmente également (Figure III – 19, b) jusqu'à une concentration à partir de laquelle les molécules

vont s'agréger afin de minimiser leur énergie en excluant l'eau. Cette concentration est la CMC. Toutes les chaînes lipophiles sont donc en contact et entourées d'une couronne hydrophile composée des têtes polaires (Figure III – 19, c).⁵⁰ Les chaînes sont généralement désordonnées au sein du cœur hydrophobe. Au-delà de la CMC, plus on ajoute du tensio-actif et plus la concentration en micelles augmente (Figure III – 19, d).

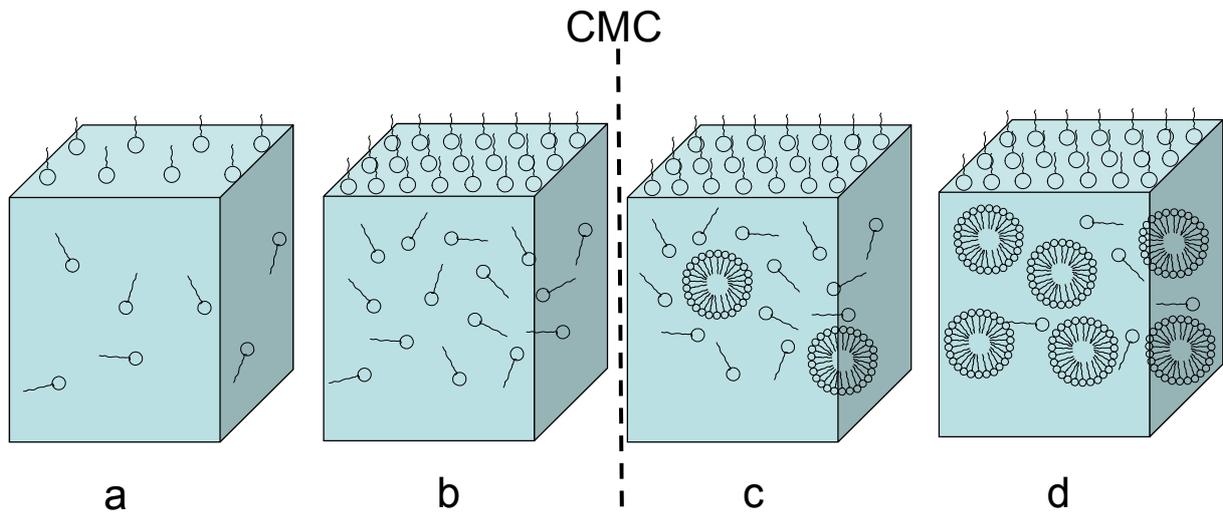


Figure III – 19 : Principe de formation des micelles

De nombreuses méthodes permettent de déterminer la CMC, que ce soit par des méthodes physico-chimiques (généralement par mesure de la tension de surface) ou par encapsulation de molécules fluorescentes comme le pyrène.

III – 3 – 4 – 2 : Présentation de la méthode de détermination de la CMC

La mesure de la tension de surface a été utilisée afin de déterminer les CMC des lipides **4** et **5**. En effet, la tension de surface varie en fonction de la concentration de tensio-actif (Figure III – 20).

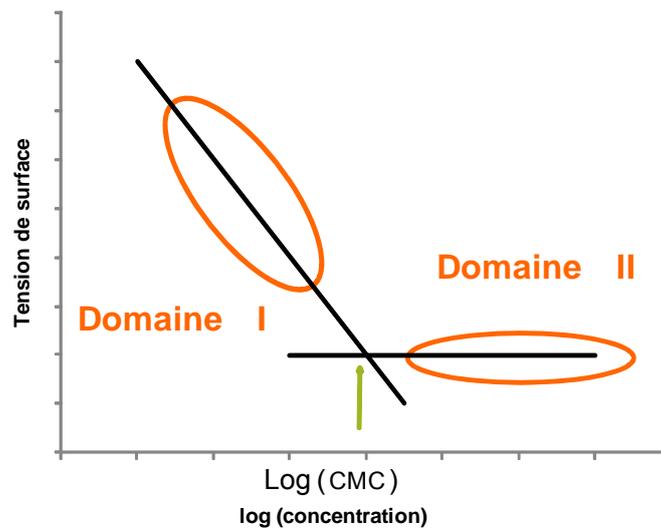


Figure III – 20 : Détermination de la CMC par la mesure de la tension de surface

La tension de surface entre l'eau et l'air étant plus importante que celle entre les chaînes lipophiles et l'air, l'ajout de tensioactifs diminue la tension de surface jusqu'au moment où la CMC est atteinte (domaine I).⁵¹ Au-delà de cette valeur, la surface étant complètement saturée en molécules, l'ajout de tensio-actif ne change pas la tension de surface dont la valeur devient alors constante (domaine II). Le point de rupture de pente indique donc la valeur de la CMC. De plus, la partie linéaire de la courbe permet de déterminer la concentration interfaciale d'une molécule de tensio-actif anionique à l'interface grâce à l'équation de Gibbs :

$$C_i = - \frac{1}{2RT} \frac{dT}{d \ln C_{sol}}$$

où C_i est la concentration interfaciale, T est la tension de surface et C_{sol} est la concentration du tensio-actif en solution.

On peut ainsi en déduire l'aire moléculaire occupée par une molécule de tensio-actif :

$$A = \frac{1}{C_i N_a} \quad \text{où } N_a \text{ est le nombre d'Avogadro.}$$

La mesure de la tension de surface a été réalisée à différentes concentrations en tensio-actif par la méthode de Du Nouy, technique largement répandue et plus communément appelée méthode « de l'anneau » (Figure III – 20).⁵² Dans cette dernière, un anneau est plongé dans le liquide puis remonté lentement à la surface de manière mécanique (Figure III – 20, a). Plus l'anneau est soulevé et plus la force mesurée est importante jusqu'à une hauteur,

nommée h_{max} , où la force est maximale (Figure III – 20, b). Au-delà de cette valeur, la surface de liquide s'étrangle et la force mesurée devient plus faible jusqu'au moment où le film de surface se rompt (Figure III – 20, c). La force maximale observée durant ce déplacement est mesurée et permet alors par calcul l'obtention de la valeur de la tension de surface.

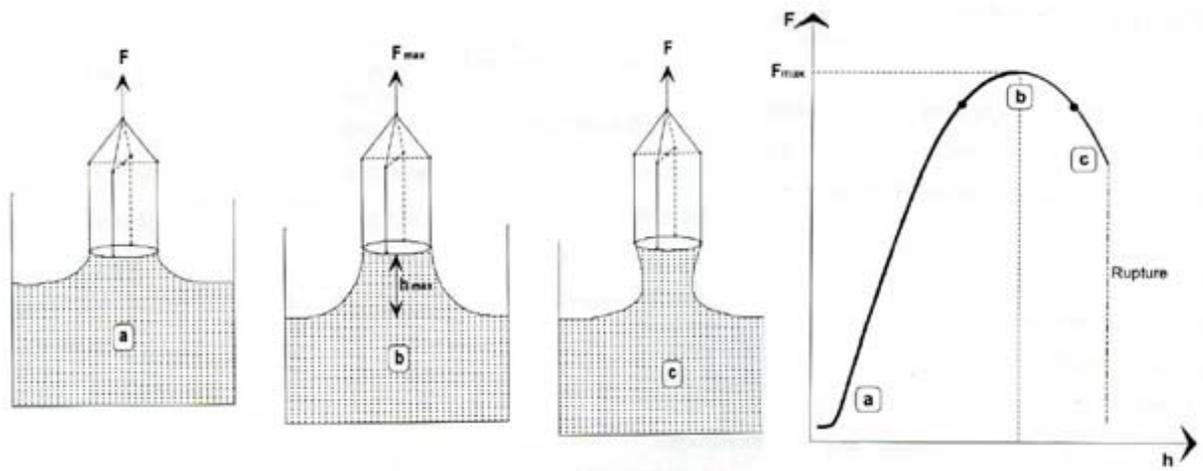


Figure III – 22 : Mesure de la tension de surface par la méthode de Du Nouy

A chaque concentration, la mesure de la tension de surface est effectuée. Les différentes valeurs de tension de surface obtenues sont reportées en fonction de la concentration et la CMC peut alors être déduite de l'intersection des droites.

III – 3 – 4 – 3 : Etude des micelles non polymérisées

Cette technique a été appliquée à nos lipides et les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III – 21.

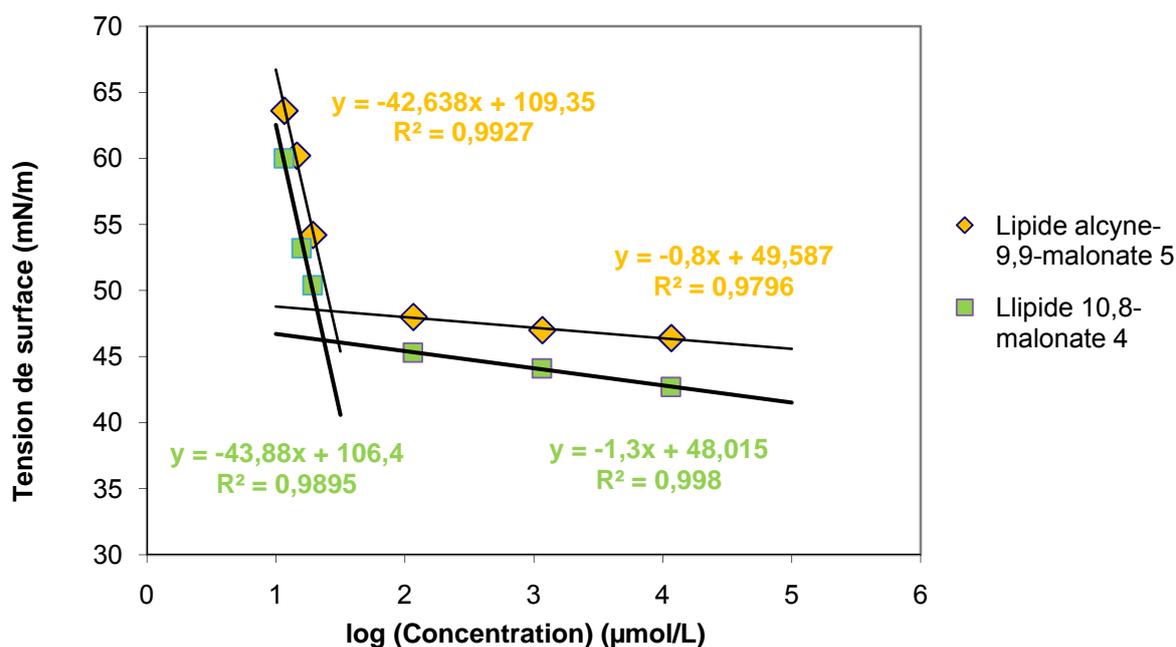


Figure III – 21 : Mesure de la CMC pour les lipides 4 et 5 dans une solution Tris pH = 11

Les deux lipides ont un comportement similaire, les CMC des lipides 10,8-malonate **4** et alcyne-9,9-malonate **5** étant respectivement de 37 $\mu\text{mol/L}$ et 43 $\mu\text{mol/L}$. Compte tenu des incertitudes de mesures, nous pouvons dire que la CMC des lipides est de l'ordre de 40 $\mu\text{mol/L}$. Une étude menée sur des lipides possédant des têtes polaires de type malonate de potassium a montré que la CMC est dépendante de la longueur de la chaîne carbonée. En effet, les CMC vont de 350 mmol/L pour l'octyle malonate (8 atomes de carbone) à 2,3 mmol/L pour l'octadécyle malonate (18 atomes de carbone).⁵³ Nos molécules ayant encore plus d'atomes de carbone dans la chaîne carbonée (26 atomes), il est normal que la CMC soit encore plus faible. A titre de comparaison, le SDS a lui une CMC de 8 mmol/L.⁵⁴ D'autres études menées au laboratoire, notamment sur des lipides possédant comme tête polaire des motifs disaccharides, ont montré des valeurs de CMC similaires de l'ordre de 20 $\mu\text{mol/L}$.

Grâce à l'équation de Gibbs établie au paragraphe précédant, il est possible de déterminer l'aire moléculaire de nos lipides à l'interface air/liquide. Les calculs donnent une valeur d'environ 12 $\text{Å}^2/\text{molécule}$. Nous pouvons désormais avoir une approximation du nombre de molécules contenues dans une micelle. En effet, si l'on considère que l'aire moléculaire à l'interface est la même que l'aire que prend la tête polaire dans une micelle, le nombre d'agrégation peut être obtenu par l'équation suivante :

$$Nag = \frac{\pi R^2}{A}$$

où R est le rayon d'une micelle (en nm) (dont la valeur est connue par DLS) et A est l'aire moléculaire du lipide (en nm²).

Le rayon d'une micelle étant d'environ 3,0 nm d'après les valeurs de DLS, nous obtenons alors un nombre d'agrégation d'environ 230. Cette valeur est à prendre avec précaution, il s'agit ici d'avoir un ordre de grandeur du nombre de lipides constituant une micelle et nullement d'obtenir une valeur précise.

III – 3 – 4 – 4 : Etude des micelles polymérisées

Nous nous sommes ensuite intéressés aux micelles polymérisées. La stabilisation engendrée par la polymérisation devrait diminuer la CMC, comme dans le cas de polymères amphiphiles.⁵⁵ Les résultats obtenus avec les micelles polymérisées de lipide 4 et 5 sont reportés dans la Figure III – 22.

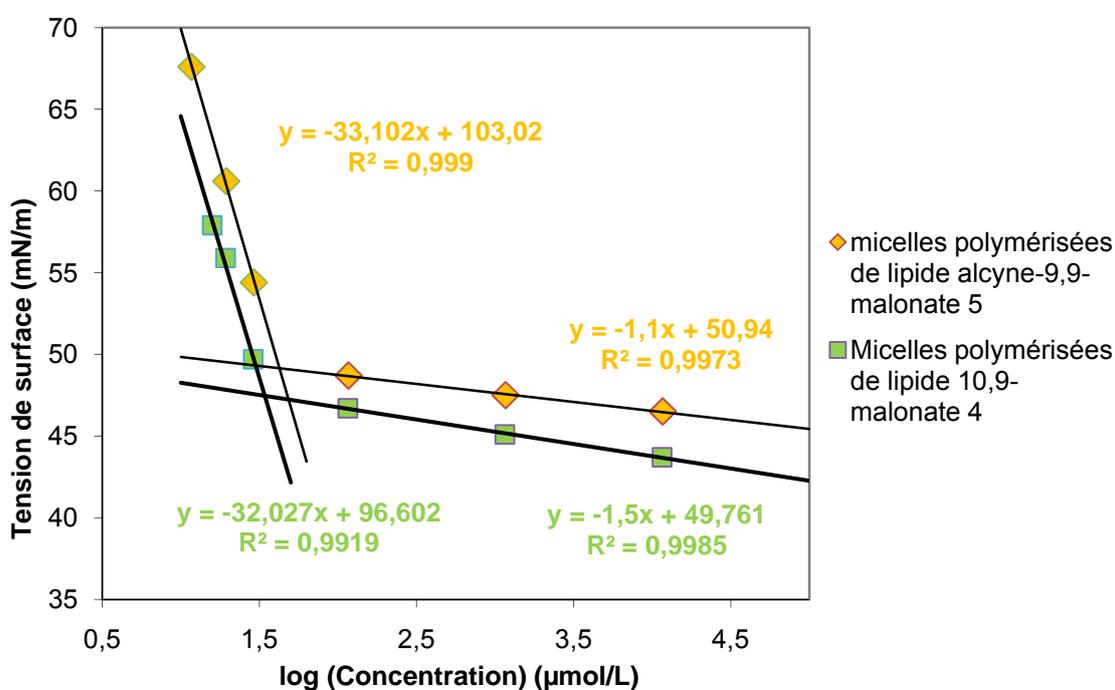


Figure III – 22 : Détermination de la tension de surface pour les micelles polymérisées

Les CMC sont de 24 $\mu\text{mol/L}$ pour les micelles polymérisées de lipide **5** et 29 $\mu\text{mol/L}$ pour les micelles polymérisées de lipide **4**. Une nouvelle fois, le comportement des deux amphiphiles est similaire. Cependant les valeurs obtenues sont plus faibles que dans le cas des micelles non polymérisées. Cette diminution laisse à penser que ces micelles polymérisées sont davantage stabilisées que les micelles non polymérisées. Ceci est généralement observé dans le cas des micelles de polymère où la réticulation apporte une augmentation de la stabilité.⁵⁶

En conclusion, les micelles, qu'elles soient polymérisées ou non, ont une taille comprise entre 5 et 7 nm. Les CMC obtenues pour les lipides **4** et **5** sont de l'ordre de 40 $\mu\text{mol/L}$. La photo-polymérisation engendre une stabilisation des micelles et les CMC sont de l'ordre 25 $\mu\text{mol/L}$.

Maintenant que les micelles ont été caractérisées, le protocole de formation des CLP va pouvoir être abordé.

III – 4 : Mise au point du procédé de formation de CLP avec les lipides possédant une tête polaire malonate

L'arrangement du lipide sous forme d'hémi-micelles le long des nanotubes est à présent réalisé avec les lipides **4** et **5** synthétisés précédemment. Comme nous l'avons vu, la formation des arrangements supramoléculaires reste sensible et une optimisation du procédé d'obtention est donc nécessaire. Un rappel de l'ensemble du procédé est présenté Figure III – 23. Comme il a été mentionné précédemment, toute l'étude sera réalisée avec des MWNTs de la société n-Tec.

Chaque étape du procédé sera donc discutée séparément dans la suite du manuscrit. La première étape consiste à solubiliser le lipide dans le milieu aqueux puis à adsorber le lipide sur les nanotubes de carbone. Puis une étape de photo-polymérisation est réalisée suivie d'une purification. Finalement, l'extraction et le conditionnement de ces nano-objets seront effectuées. Les conditions mises au point avec le lipide 10,8-malonate **4** seront appliquées au lipide alcyne-9,9-malonate **5**.

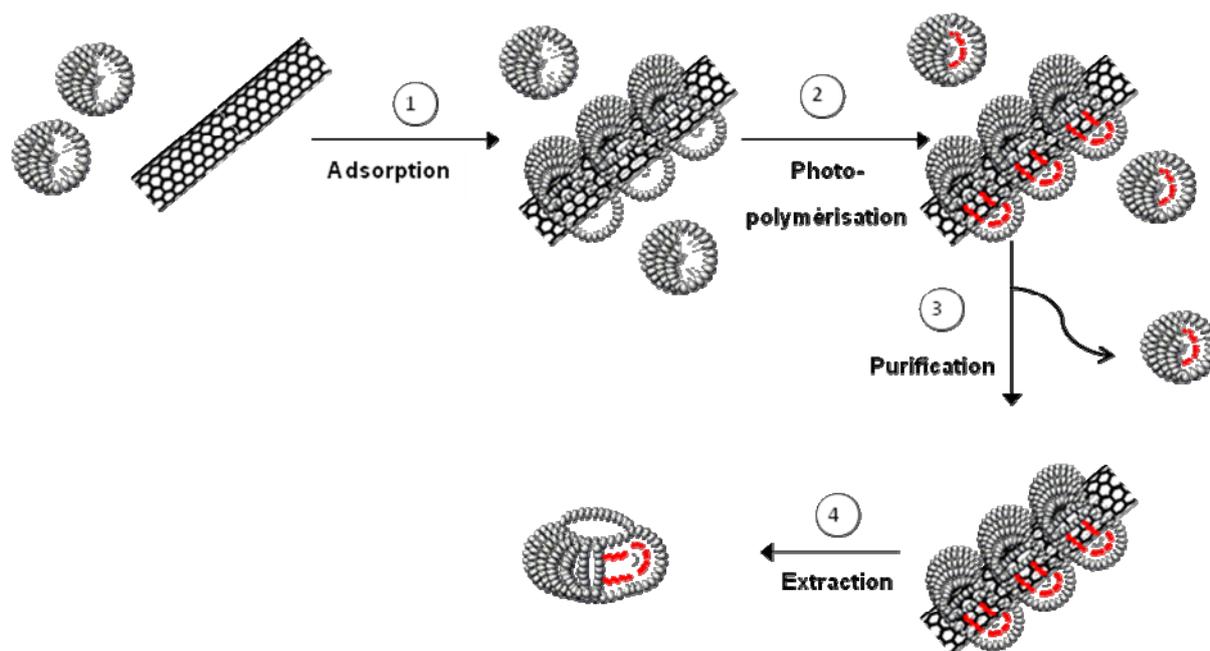


Figure III – 23 : Rappel du protocole complet permettant la formation de CLP

III – 4 – 1 : Adsorption du lipide 4 sur les nanotubes de carbone

Précédemment, lors des travaux avec le lipide 11,8-NTA **1**, il a été montré que l'adsorption du lipide sur les nanotubes de carbone variait selon le ratio lipide/nanotubes. Il s'agit ici de trouver le ratio (lipide/nanotubes) permettant l'adsorption la plus importante.

Pour ce faire, le lipide **4** est solubilisé dans une solution Tris pH = 11 (5 mg/mL) par sonication, puis une quantité variable de nanotubes de carbone est ajoutée. Le milieu est soniqué 30 minutes puis polymérisé sous irradiation UV (254 nm, 48W, 10h). Après centrifugation, le surnageant contenant le lipide non adsorbé est dosé par titration UV-Visible à 285 nm ce qui nous permet d'accéder par différence au pourcentage d'adsorption (Figure III – 24).

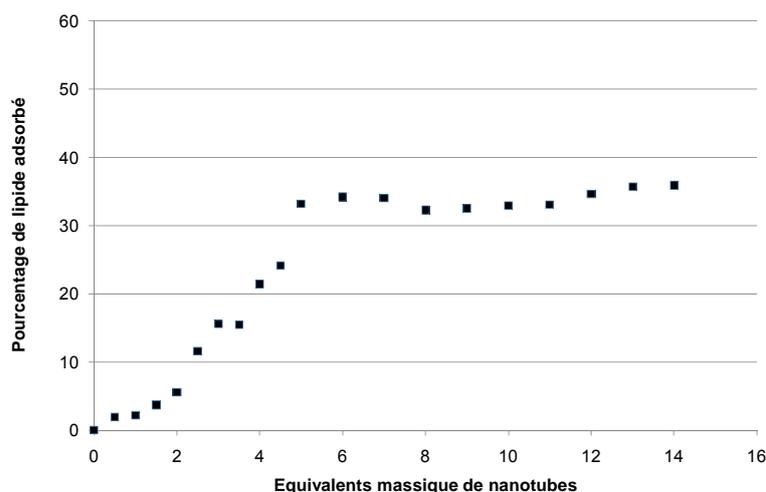


Figure III – 24 : Etude de l'adsorption du lipide **4** sur les MWNTs *n-Tec* à une concentration initiale de 5 mg/mL en lipide dans la solution de Tris pH = 11

La tendance est comparable à celle obtenue avec le lipide 11,8-NTA **1**. En effet, au départ, l'adsorption du lipide augmente avec la quantité de nanotubes ajoutée jusqu'à l'apparition d'un palier. Ce palier est obtenu à partir d'un ratio lipide/nanotubes de 1/5 pour une valeur d'adsorption d'environ 35%. Rappelons que pour le lipide 11,8-NTA **1**, cette valeur limite de l'adsorption était de 55%. La baisse observée pour le lipide **4** peut s'expliquer par un comportement différent de ce nouveau lipide. Une valeur de 10 équivalents a été choisie afin de favoriser au maximum l'adsorption du lipide.

Les analyses MET à un ratio lipide/nanotubes de 1/10 présentées en Figure III – 25 montrent bien la formation d'arrangements héli-micellaires le long des nanotubes de carbone ainsi que la présence de lipide **4** non adsorbé en excès.

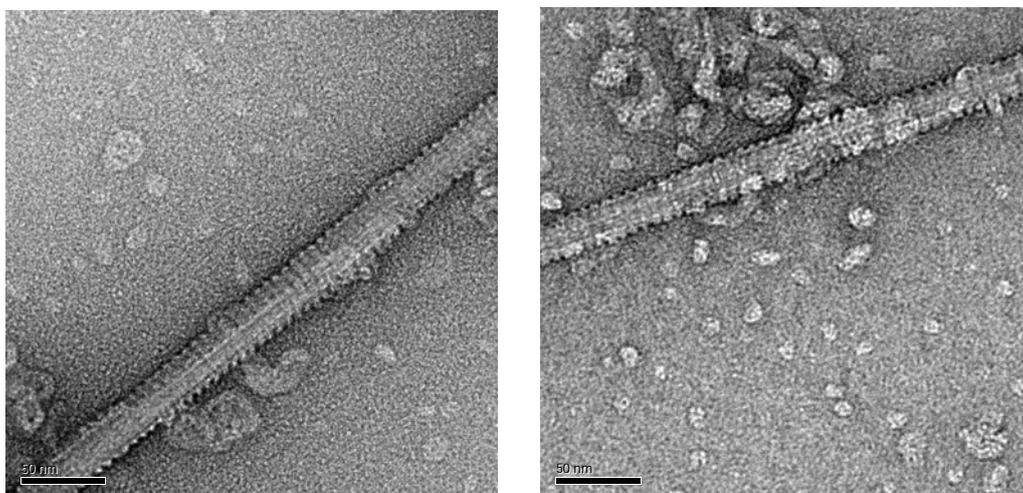


Figure III – 25 : Images MET d'un échantillon de nanotubes de carbone recouverts de lipide

Barre : 50 nm

Maintenant que ces auto-arrangements ont observés, nous allons étudier l'étape de photo-polymérisation.

III – 4 – 2 : Photo-polymérisation de l'échantillon

Lors de l'étude sur la photo-polymérisation des micelles, une durée de 10 heures a été choisie afin de polymériser au mieux les micelles. Cette valeur a été retenue pour la polymérisation des échantillons contenant les auto-arrangements lipidiques autour des nanotubes de carbone.

Une fois la polymérisation effectuée, une étape de purification par centrifugation permet d'éliminer l'excès de lipide présent dans l'échantillon.

III – 4 – 3 : Purification des nanotubes de carbone couverts de lipide 4

Une étude a été effectuée afin de connaître le nombre de cycles de centrifugation nécessaire pour permettre l'élimination de la totalité du lipide ne participant pas aux auto-assemblages autour des nanotubes de carbone.

A 100 mg de lipide en solution dans 20 mL d'une solution de Tris pH = 11, est ajouté 1,00 g de nanotubes de carbone. L'ensemble est soniqué 30 minutes puis polymérisé 10 heures. Après une première centrifugation à 14250*g pendant 10 minutes, le surnageant est prélevé puis analysé par DLS.

Dans une deuxième étape, le surnageant est acidifié afin de faire précipiter les agrégats de lipide puis de l'acétate d'éthyle est ajouté afin d'extraire ces derniers. Une fois la phase organique séparée et évaporée, la quantité de lipide extrait est alors pesée. 20 mL de solution de Tris pH = 11 sont alors ajoutés au culot contenant les nanotubes, le milieu est ensuite soniqué (80W, 5 minutes) et le procédé est réitéré 2 fois. Les résultats sont présentés dans le Tableau III – 4.

Purification	Taille des objets observés par DLS (en volume)	Masse de lipide extraite
1	5-7 nm	70 mg
2	80 nm	15 mg
3	-	< 1mg

Tableau III – 4: Analyses des surnageants lors des différents cycles de purification

D'après les analyses, le premier surnageant contient majoritairement des micelles dont la taille est de 5-7 nm. La masse de lipide extraite correspond à 70% de la quantité de lipide introduite initialement. Ceci correspond approximativement aux valeurs précédemment trouvées par dosage UV qui donnait environ 35% de lipide adsorbé à la surface des nanotubes (Figure III – 24). Lors du deuxième cycle de purification, 15% de la quantité de lipide de départ est récupérée. Cette quantité de lipide ne correspond plus à des micelles d'après la taille de 80 nm. Nous pouvons penser que les micelles ont été totalement éliminées lors de la première purification. Il s'agirait ici soit de polymères de lipides qui n'étaient pas totalement adsorbés à la surface des nanotubes soit de lipides qui étaient adsorbés sur du carbone amorphe. Lors de la troisième extraction, le lipide n'est plus extrait et les nanotubes sont purifiés. Les images de microscopie sont alors beaucoup plus propres et les arrangements de lipide le long des nanotubes sont nettement plus visibles. Une comparaison des clichés de microscopie avant et après ces trois cycles de purification montre très bien l'importance de cette dernière étape (Figure III – 26).

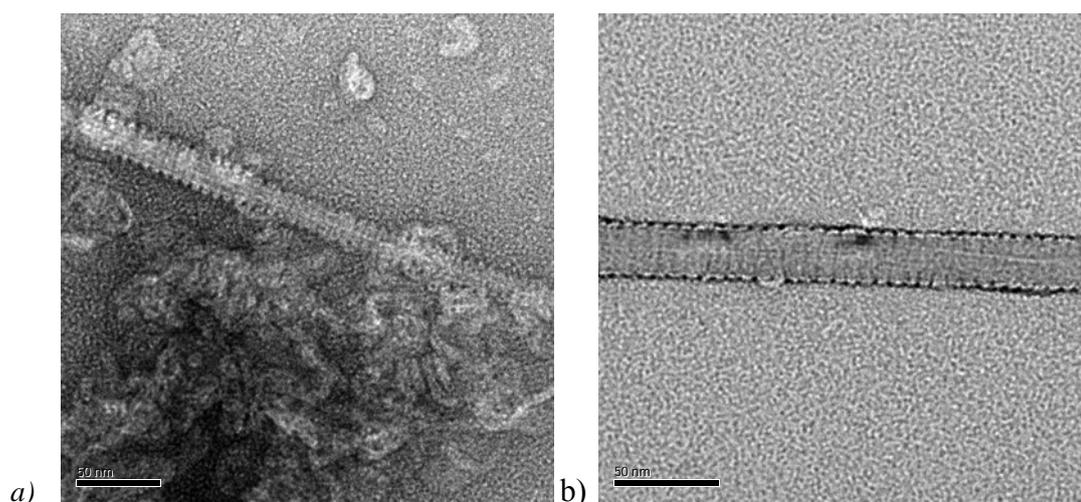


Figure III – 26 : Images MET de nanotubes de carbone recouverts de lipide : a) avant la purification, b) après 3 cycles de purification ; barre : 50 nm

Maintenant que cette étape de purification est effectuée, l'extraction des CLP peut être envisagée.

III – 4 – 4 : Extraction des CLP

L'étape d'extraction, développée précédemment au laboratoire,⁵⁷ consiste en une étape d'ultra-sonication dans un mélange éther diisopropylique/Tris : 1/1 (V/V).

L'éther diisopropylique avait initialement été choisi car il permettait d'obtenir de bons résultats d'extraction. Lorsque la phase organique est ajoutée à la solution de nanotubes, la séparation des phases se fait aussitôt (Figure III – 27, a). Les nanotubes de carbone recouverts de lipides restent dans la phase aqueuse, le lipide entourant ces derniers leur conférant un caractère hydrophile. Le mélange est alors ultra-soniqué pendant 1h à une puissance de 240W à l'aide d'une sonde à ultra-sons (mode pulse : 9,9s on, 5,0s off). Une fois le mélange revenu à température ambiante, une séparation des phases s'opère (Figure III – 27, b). Cette fois-ci, c'est la phase organique qui contient les nanotubes de carbone et la phase aqueuse qui est limpide.

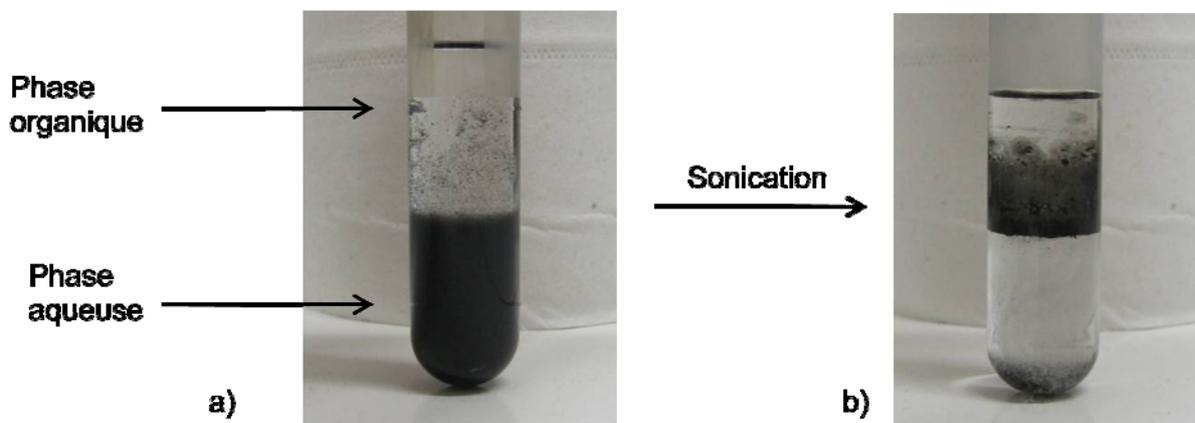


Figure III – 27 : Photographies : a) avant ; b) après extraction par ultra-sonication

L'analyse par MET montre que la phase aqueuse contient les CLP extraites (Figure III – 28).

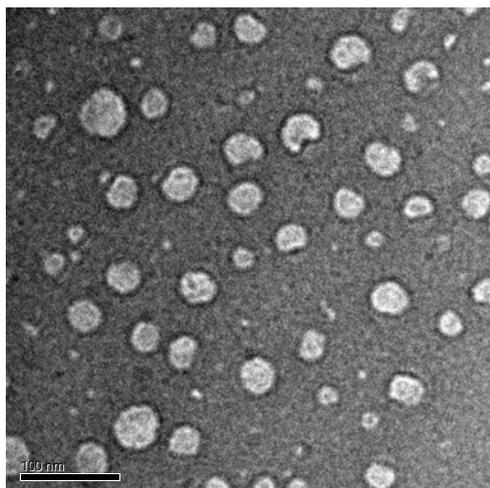


Figure III – 28 : Images MET après ultra-sonication de la phase aqueuse ; barre : 100 nm.

Les clichés de microscopie montrent que la phase organique ne contient que des nanotubes dépourvus de lipides à leur surface. De plus, une population d'arrangements lipidiques dont la taille est d'environ 30-40 nm est observée dans la phase aqueuse.

Afin de compléter la caractérisation de ces nano-objets, des analyses par DLS ont été effectuées et sont représentées dans la Figure III – 29.

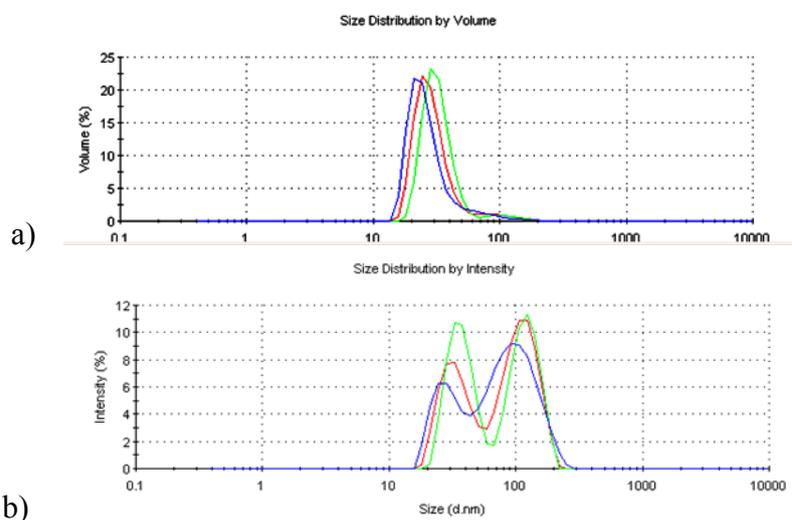


Figure III – 29 : Analyses par DLS des CLP : a) en volume ; b) en intensité

Une répartition homogène en volume des nano-objets avec une taille centrée vers 30-40 nm a été observée (Figure III – 29, a). Ceci concorde avec l'analyse par microscopie. En revanche, l'analyse par intensité (Figure III – 29, b) montre deux populations d'intensité relative égale : l'une vers 30 nm et l'autre vers 100 nm. Ces analyses montrent que les

échantillons obtenus contiennent en grande majorité des CLP dont la taille est de 30-40 nm, avec une présence faible de quelques auto-arrangements de taille plus élevée pouvant correspondre à des agrégats.

Cependant, la représentation idéalisée d'une CLP formant un demi-tore n'apparaît pas sur les clichés de microscopie, mais des assemblages sphériques sont formés. A partir de la taille d'un arrangement hémi-micellaire observé sur les nanotubes de carbone, nous sommes en mesure de calculer le volume qu'occupe le lipide (Figure III – 30).

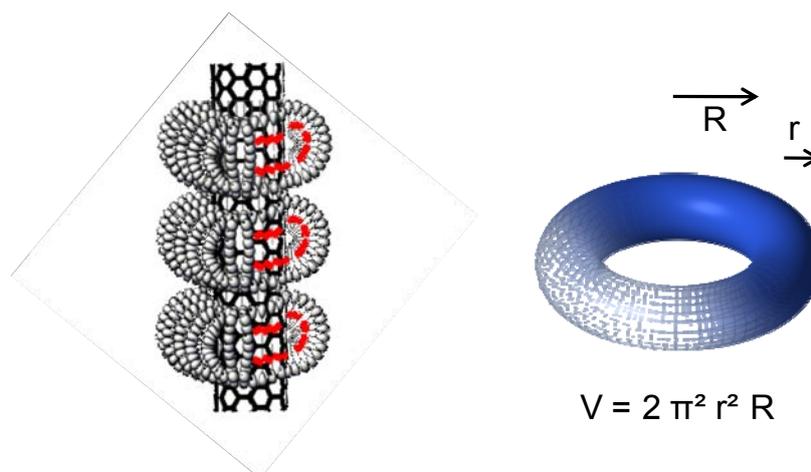


Figure III – 30 : Représentation idéalisée d'un CLP et calcul de son volume

Si l'on prend l'exemple du cliché de la Figure III – 26, les valeurs sont de : r (longueur du lipide) = 3 nm et R (rayon du nanotube - longueur du lipide) = 10 nm. Le volume du tore considéré serait d'environ 1800 nm³. La représentation idéalisée d'une CLP formant un demi-tore, le volume V d'une CLP idéalisée serait d'environ 900 nm³. Comme les clichés de microscopie montrent plutôt des objets sphériques, nous pouvons rapporter le volume obtenu au volume d'une sphère dont le rayon R₁ serait $R_1 = \sqrt[3]{3 * V / (4\pi)}$. Cette valeur de R₁ est alors de 6,0 nm. Un arrangement hémi-micellaire a donc un volume correspondant à une sphère dont le rayon est de 6,0 nm, valeur deux fois plus élevée que nos micelles dont le rayon est d'environ 3 nm. Cette valeur est très éloignée des valeurs observées par microscopie. Nous pouvons donc penser que les arrangements lipidiques observés après extraction correspondent à une agrégation des arrangements hémi-micellaires précédemment observés. Afin d'obtenir des objets dont la taille coïncide avec celle observée en microscopie et en DLS, il faudrait qu'une vingtaine d'arrangements hémi-micellaires se réorganisent pour former une construction lipidique photo-polymérisée.

A la vue des résultats obtenus, il semble donc que les CLP obtenues soient en réalité une réorganisation du lipide lors de l'étape d'extraction. La structure idéalisée des CLP proposée au début des travaux est remise en question à la vue de ces clichés de microscopie. De plus, un inconvénient important de cette synthèse de CLP est la non-reproductibilité des résultats de cette étape d'extraction par ultra-sonication. En effet, il peut arriver que cette dernière ne produise aucun effet et que les CLP ne soient pas du tout extraites. Nous avons cependant poursuivi le procédé jusqu'à l'étape d'isolement des CLP.

III – 4 – 5 : Isolement des CLP

La dernière étape du procédé consiste à récupérer les CLP sous forme solide. Pour ce faire, la solution aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec une solution d'acide chlorhydrique à 37%. Un précipité se forme alors. En effet, la protonation des acides carboxyliques rend insolubles les auto-assemblages lipidiques formés dans la solution aqueuse. Les composés sont alors extraits par du chloroforme et après évaporation, les CLP sont obtenus sous forme solide.

La resolubilisation ultérieure des CLP à une concentration de 1 mg/mL dans la solution de Tris pH = 11 est assez difficile et une heure de sonication est nécessaire afin d'obtenir une solution limpide. L'analyse MET montre alors un échantillon dont la population extrêmement homogène présente une taille centrée à 30-35 nm (Figure III – 31)..

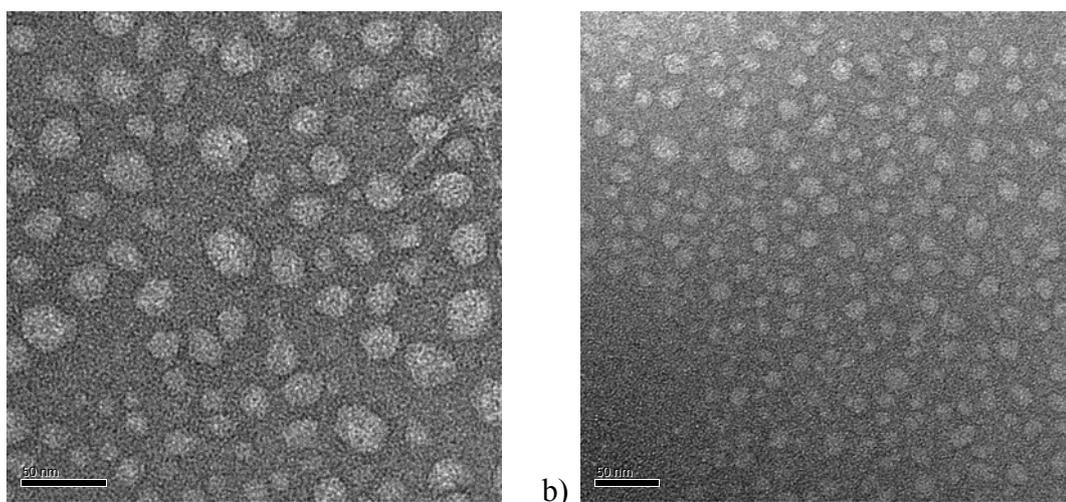


Figure III – 31 : Images MET de CLP re-solubilisées dans la solution de Tris pH = 11

La stabilité des échantillons de CLP a alors été évaluée par DLS en analysant un même échantillon au cours du temps. Les résultats sont représentés dans le Tableau III – 5.

Temps	Taille observée (en volume)
T ₀	25 nm
3 heures	23 nm
1 jour	30 nm
3 jours	35 nm
7 jours	42 nm
14 jours	83 nm

Tableau III – 5 : Observation de la taille des CLP en fonction du temps

Ces observations montrent que les CLP ont une forte tendance à s'agréger au fur et à mesure du temps. En effet, la taille des CLP augmente de 25 nm à 83 nm en 14 jours. Des essais de sonication des échantillons n'ont pas permis dans tous les cas de désagréger les assemblages lipidiques. En comparaison, les solutions de micelles polymérisées ont été observées sur plus de deux mois et aucune agrégation n'a été observée. Il est donc préférable de former les CLP dès que l'on en a besoin et de les utiliser aussitôt. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les CLP seraient issus de la réorganisation des chaînes lipidiques.

Le protocole permettant la formation des CLP au départ du lipide **4** possédant un méthyle terminal est donc le suivant :

- Des nanotubes de carbone sont ajoutés dans un ratio lipide/nanotubes 1/10 à une solution de lipide dissout dans une solution de Tris à pH = 11 à une concentration de 5 mg/mL. Le mélange est alors soniqué au bain à ultra-sons pendant 30 minutes.
- Le mélange ainsi obtenu est alors placé sous irradiation UV (10h, 48W, 254 nm) afin de polymériser les arrangements lipidiques.
- Le mélange subit un cycle de trois purifications successives (centrifugation à 14250g et mise en suspension des nanotubes de carbone dans la solution Tris pH = 11) afin d'éliminer l'excès de lipide.

- Le milieu est ensuite ultra-soniqué dans un mélange Tris/éther diisopropylique : 1/1 (V/V) (maximum 4 mL de solution imposé par la taille de la sonde) pendant 1h à une puissance de 240W à l'aide d'un doigt à ultra-sons (mode pulse : 9,9s on, 5,0s off). La phase organique est ensuite éliminée puis la phase aqueuse est centrifugée afin de récupérer les CLP en solution.

Dès lors que les CLP à partir du lipide **4** possédant le méthyle terminal ont été formées et le procédé optimisé, le protocole a été appliqué au lipide **5** possédant des alcynes à l'intérieur de la cavité hydrophobe pour la formation des CLP.

III – 4 – 6 : Formation des CLP-alcyne

Le procédé précédemment mis au point est réalisé au départ du lipide **5** possédant l'alcyne terminal. Le comportement du lipide **5** s'est révélé être le même que son homologue **4** : les taux d'adsorption sur les nanotubes de carbone sont identiques (35%), le temps de polymérisation est élevé, 3 cycles de purification par centrifugation sont également nécessaires, et l'extraction par ultra-sonication s'est déroulée à l'identique. Les images MET des différentes étapes sont rapportées dans la Figure III – 32.

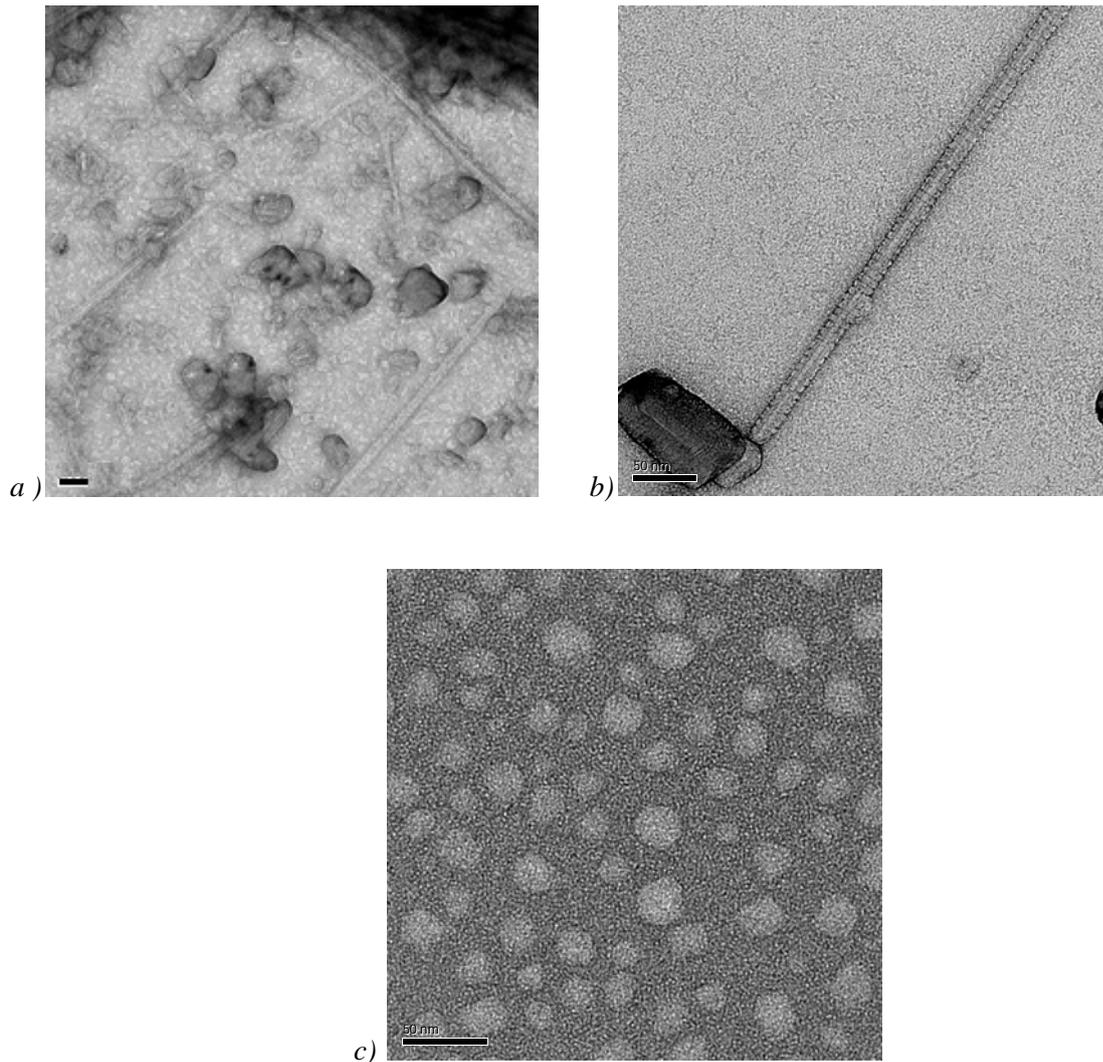


Figure III – 32 : Images MET de: a) nanotubes recouverts de lipide avant purification ; b) nanotubes recouverts de lipide après purification ; c) de CLP-alcyne après acidification et resolubilisation ; barre : 50 nm.

III – 5 : Conclusion

Lorsque des nanotubes de carbone sont mélangés aux lipides en solution, des auto-arrangements héli-micellaires se forment le long de la paroi des nanotubes. La polymérisation des lipides permet de stabiliser les arrangements ainsi formés. Des suspensions stables de nanotubes de carbone en solution aqueuse sont alors obtenues et pourraient être utilisées dans de nombreuses applications notamment dans le renforcement de matériaux. De plus, ces nanotubes de carbone recouverts de lipide ont également servi à la

formation d'auto-assemblages lipidiques en solution lors d'une étape d'extraction par ultra-sonication.

Différents échantillons de CLP ont été obtenus, que ce soit avec le lipide 10,8-malonate **4** ou avec le lipide alcyne-9,9-malonate **5**. L'extraction par ultra-sonication ne s'effectue que sur de petits volumes fournissant donc de très faibles quantités de CLP. De ce fait, l'étude du greffage interne de composés a tout d'abord été réalisée au cœur de micelles lipidiques polymérisées ou non, étant donné que ces dernières sont plus faciles à obtenir.

Bien que tous les phénomènes d'obtention des CLP ne sont actuellement pas compris, nous arrivons cependant à former des nano-objets lipidiques particuliers. D'autres études de caractérisation des CLP sont envisagées, notamment des expériences permettant de mesurer la concentration d'association critique de ces arrangements lipidiques afin de comparer les valeurs obtenues avec celles des micelles polymérisées mais aussi des études de chromatographie d'exclusion stérique, ou encore des expériences permettant d'observer la dynamique de ces arrangements, comme par exemple la fluorescence et plus particulièrement l'inhibition de fluorescence.

Références bibliographiques du Chapitre III :

- ¹ Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318*, 162-163.
- ² Prinzbach, H.; Weiler, A.; Landenberger, P.; Wahl, F.; Wörth, J.; Scott, L. T.; Gelmont, M.; Olevano, D.; Issendorff, B. V. *Nature* **2000**, *407*, 60-63.
- ³ Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P. C. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press: San Diego CA, **1996**.
- ⁴ Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.
- ⁵ Hamada, N.; Sawada, S.; Oshiyama, A. *Physical Review Letters* **1992**, *68*, 1579-1581.
- ⁶ Wildoer, J. W. G.; Venema, L. C.; Rinzler, A. G.; Smalley, R. E.; Dekker, C. *Nature* **1998**, *391*, 59-62.
- ⁷ Mintmire, J. W.; White, C. T. *Physical Review Letters* **1998**, *81*, 2506-2509.
- ⁸ Daenen, M.; de Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J. in *The wondrous world of carbon nanotubes*, Eindhoven University of Technology: **2003**.
- ⁹ Ebbesen, T. W.; Ajayan, P. M. *Nature* **1992**, *358*, 220-222.
- ¹⁰ Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; De Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazequez, J.; Beyers, R. *Nature* **1993**, *363*, 605-607.
- ¹¹ Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* **1993**, *363*, 603-605.
- ¹² Journet, C.; Maser W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A. *Nature* **1997**, *388*, 217-223.
- ¹³ Guo, T.; Nikolaev, P.; Thess, A.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. *Chemical Physical Letters* **1995**, *243*, 49-54.
- ¹⁴ 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* **1996**, *273*, 483-486.
- ¹⁵ Endo, M.; Takeuchi, K.; Igarashi, S.; Kobori, K.; Shiraishi, M.; Kroto, H. W. *Journal of Physics and Chemistry Solids* **1993**, *54*, 1841-1848.
- ¹⁶ Ren, Z. F.; Huang, Z. P.; Xu, J. W.; Wang, J. H.; Bush, P.; Siegal, M. P.; Provencio, P. N. *Science* **1998**, *282*, 1105-1107.
- ¹⁷ Nikolaev, P.; Bronikowski, M. J.; Bradley, R. K.; Rohmund, F.; Colbert, D. T.; Smith, K. A.; Smalley, R. E. *Chemical Physical Letters* **1999**, *313*, 91-97.
- ¹⁸ Bonard, J.-M.; Stora, T.; Salvetat, J.-P.; Maier, F.; Stockli, T.; Duschl, C.; Forro, M.; De Heer, W. A.; Chatelain, A. *Advanced Materials* **1997**, *9*, (10), 827-831.

- ¹⁹ Marquis, R.; Greco, C.; Sadokierska, I.; Lebedkin, S.; Kappes, M. M.; Michel, T.; Alvarez, L.; Sauvajol, J.-L.; Meunier, S.; Mioskowski, C. *Nano Letters* **2008**, *8*, 1830-1835.
- ²⁰ Marquis, R.; Kulikiewicz, K.; Lebedkin, S.; Kappes, M. M.; Mioskowski, C.; Meunier, S.; Wagner, A. *Chemistry : A European Journal* **2009**, *15*, 11187-11196.
- ²¹ Coleman, J. N.; Khan, U.; Gun'ko, Y. K. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 689-706.
- ²² Regev, O.; B. Elkati, P. N.; Loos, J.; Koning, C. E. *Advanced Materials* **2004**, *16*, 248-251.
- ²³ Singh, P.; Campidelli, S.; Giordani, S.; Bonifazi, D.; Bianco, A.; Prato, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 2214-2230.
- ²⁴ Coleman, J. N.; Cadek, M.; Blake, R.; Nicolosi, V.; Ryan, K.P.; Beltan, C.; Fonseca, C.; Nagy, J. B.; Gun'ko, Y. K.; Blau, W. J. *Advanced Functional Materials* **2004**, *14*, 791-798.
- ²⁵ Ménard-Moyon, C.; Izard, N.; Doris, E.; Mioskowski, C. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6552-6553.
- ²⁶ Ménard-Moyon, C.; Dumas, F.; Doris, E.; Mioskowski, C. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14764-14765.
- ²⁷ Zhang, Q.; Rastogi, S.; Chen, D.; Lippits, D.; Lemstra, P. J. *Carbon* **2006**, *44*, 778-785.
- ²⁸ Shin, J.-Y.; Premkumar, T.; Geckeler, K. E. *Chemistry: A European Journal* **2008**, *14*, 6044-6048.
- ²⁹ Islam, M. F.; Rojas, E.; Bergey, D. M.; Johnson, A. T.; Yodh, A. G. *Nano Letters* **2003**, *3*, 269-273.
- ³⁰ Vaisman, L.; Marom, G.; Wagner, H. D. *Carbon* **2006**, *16*, 357-363.
- ³¹ Barraza, H. J.; Pompeo, F.; O'Rear, E. A.; Resasco, D. E. *Nano Letters* **2002**, *2*, 797-802.
- ³² Moore, V.C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E. *Nano Letters* **2003**, *3*, 1379-1382.
- ³³ Nish, A.; Hwang, J.-Y.; Doig, J.; Nicholas, R. J. *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*, 640-646.
- ³⁴ Assali, M.; Pernia Leal, M.; Fernandez, I.; Baati, R.; Mioskowski, C.; Khier, N. *Soft Matter* **2009**, *5*, 948-950.
- ³⁵ Balavoine, F.; Schultz, C.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1912-1915.
- ³⁶ Khier, N.; Pernia Leal, M.; Baati, R.; Ruhlmann, C.; Mioskowski, C.; Schultz, P.; Fernandez, I. *Chemical Communications* **2009**, 4121-4123.
- ³⁷ Contal, E.; Morere, A.; Thauvin, C.; Perino, A.; Meunier, S.; Mioskowski, C.; Wagner, A. *Journal of Physical Chemistry : Part B*, 2010, DOI : 10.1021/jp1010007

- ³⁸ Duesberg, G. S.; Burghard, M.; Muster, J.; Philipp, G.; Roth, S. *Chem. Commun.* **1998**, 435–436.
- ³⁹ Lauher, J. W.; Fowler, F. W.; Goroff, N. S. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1215-1229.
- ⁴⁰ Frankel, D. A.; O'Brien, D. F. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 10057-10069.
- ⁴¹ Jose, D. A.; Stadlbauer, S.; König, B. *Chemistry: A European Journal* **2009**, *15*, 7404-7412.
- ⁴² Deckert, A. A.; Horne, J. C.; Valentine, B.; Kiernan, L.; Fallon, L. *Langmuir* **1995**, *11*, 643-649.
- ⁴³ Kang, S. H.; Jung, B. M.; Chang, J. Y. *Advanced Materials* **2007**, *19*, 2780-2784.
- ⁴⁴ Dautel, O. J. ; Robitzer, M. ; Lère-Porte, J.-P. ; Serein-Spirau, F. ; Moreau, J. J. E. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16213-16223.
- ⁴⁵ Lee, J.; Kim, H.-J.; Kim, J. *Advanced Materials* **2009**, *21*, 3674–3677
- ⁴⁶ Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775-778.
- ⁴⁷ Kanicky, J. R.; Shah, D. O. *Langmuir* **2003**, *19*, 2034-2038.
- ⁴⁸ Lee, J.; Kim, H.-J.; Kim, J. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, *130*, 5010-5011
- ⁴⁹ Choi, H.; Bae, Y.-M.; Yu, G. S.; Huh, K. M.; Choi, J. S. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2008**, *8*, 5104-5108.
- ⁵⁰ Tanford, C. Chapter 6: micelles, in *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, John Wiley and sons, **1991**, p 42.
- ⁵¹ Evans, F.; Wennerstrom, H. Chapter 1: solute and solvents, self-assembly of amphiphiles. *Colloidal domain-where physics, chemistry and biology meet*, Wiley VCH, **1999**, 1-43.
- ⁵² Patist, A. Chapter 13 : Determining Critical Micellar Concentration. *Handbook of applied surface and colloid chemistry*, Wiley, Ed. **2002**, Vol. 2, 239-249.
- ⁵³ Shinoda, K. *Journal of Physical Chemistry* **1955**, *59*, 432-435.
- ⁵⁴ Hines, J. D. *Journal of colloid and Interface Science* **1996**, *180*, 488-492.
- ⁵⁵ Kim, H. K.; Park, T. G. *Macromolecular Rapid Communications* **2002**, *23*, 26-31.
- ⁵⁶ Yanga, T.-F.; Chenb, C.-N.; Chena, M.-C.; Laic, C.-H.; Lianga, H.-F.; Sunga, H.-W. *Biomaterials* **2007**, *28*, 725-734.

⁵⁷ Thauvin, C. *Thèse de l'Université de Strasbourg*, **2009**.

Chapitre 4

-

*Fonctionnalisation interne des micelles
par réaction «click» à l'aide d'une
sonde fluorescente*

Notre objectif étant la fonctionnalisation interne des CLP, dont la structure possède un cœur hydrophobe et une surface hydrophile, les micelles polymérisées ont été choisies comme système modèle. Elles possèdent les mêmes caractéristiques, à savoir un cœur hydrophobe et une surface hydrophile, et sont en revanche plus faciles d'accès. A notre connaissance, la fonctionnalisation de micelles lipidiques constituées de motifs polydiacétylènes n'a pas été étudiée. La mise au point du greffage covalent permettra d'utiliser le même protocole pour la fonctionnalisation des CLP.

Nous allons donc à présent nous intéresser à la fonctionnalisation interne des micelles.

IV – 1 : Mise au point de la réaction « click »

Afin de mettre au point la réaction « click », nous avons décidé de greffer une sonde fluorescente au sein des micelles polymérisées. En effet, les nanoparticules fluorescentes présentent de nombreuses applications dans le domaine de la biologie, tant au niveau de l'analyse, sur des phénomènes cellulaires, que dans le diagnostic médical. De plus, le suivi de la réaction pourra être effectué par fluorescence.

IV – 1 – 1 : Définition de la fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).¹ Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors dans un état électroniquement excité, généralement un état singulet, que l'on note S₂ (Figure IV – 1). Après retour à l'état excité de plus basse énergie (S₁), le retour à l'état fondamental (S₀) peut alors s'effectuer de différentes manières. L'une d'elles est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence. La longueur d'onde du photon ré-émis par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande. Le fait que la longueur d'onde d'émission soit plus grande que celle d'absorption s'explique par le retour à l'état fondamental de la molécule à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité, en particulier dans les milieux liquides.

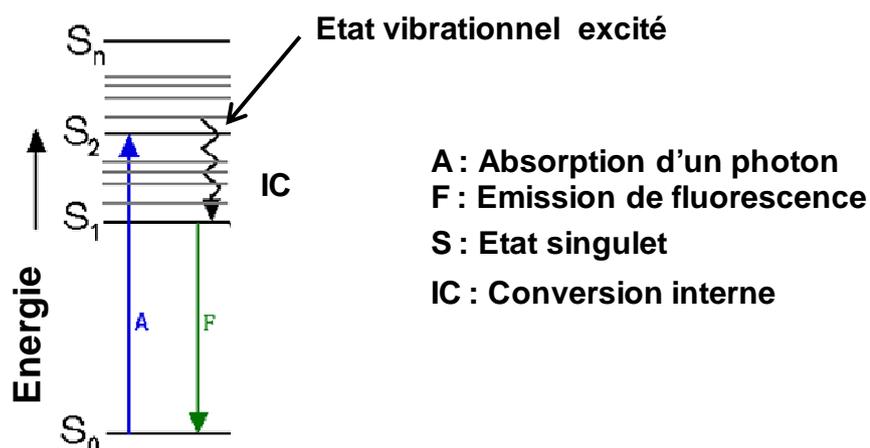


Figure IV – 1 : principe de la fluorescence

IV – 1 – 2 : Choix de la sonde fluorescente

Dans un premier temps, la sonde fluorescente a été choisie. Le greffage ayant lieu dans le cœur hydrophobe des micelles, il est intéressant d'utiliser pour le greffage une molécule qui soit sensible au caractère hydrophobe de son environnement proche afin de mieux caractériser la localisation de la sonde. Notre choix s'est alors orienté sur le groupement 5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamide plus couramment appelé dansyl (Figure IV – 2). En effet, de par sa structure, ce fluorophore permet d'obtenir des informations sur le caractère hydrophobe du milieu où se trouve la sonde.² Lorsque le dansyl est situé dans un environnement hydrophobe, le motif *N*-diméthyle adopte une conformation coplanaire au noyau naphthalène. Ceci se traduit par une émission de fluorescence vers 430 nm. En revanche, lorsqu'il est placé dans un environnement hydrophile, le *N*-diméthyle forme un angle avec le noyau aromatique provoquant un déplacement de la longueur d'onde d'émission vers 520 nm.³ La valeur de cette longueur d'onde d'émission de fluorescence permet donc d'obtenir des renseignements sur l'environnement local de la sonde.

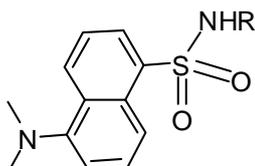


Figure IV – 2 : Structure du dansyl

De plus, dans le but d'obtenir un greffage interne, le dansyl apparaît comme un fluorophore de choix puisqu'il devrait aisément se retrouver au cœur des chaînes lipidiques de par sa nature hydrophobe et sa petite taille qui n'entraveraient pas la diffusion dans les micelles. Enfin, l'écart entre son absorption UV-visible (environ 330 nm) et son émission (vers 500 nm), appelé déplacement de Stokes, est suffisamment important pour éviter le phénomène d'auto-inhibition de fluorescence (« self-quenching » en anglais), puisqu'une multi-fonctionnalisation de nos micelles aura lieu. Il a récemment été montré lors de la fonctionnalisation en surface de dendrimères que des fluorophores comme la fluorescéine, la rhodamine, la coumarine-343 ou encore la NBD perdent par ce phénomène leur fluorescence lorsque plusieurs molécules sont greffées (Figure IV – 3).⁴ En effet, si une molécule fluorescente absorbe à une longueur d'onde λ et émet à $\lambda + \delta$, la molécule voisine également greffée peut absorber ce rayonnement pour émettre de la fluorescence qui sera elle aussi absorbée. De ce fait, plus le nombre de molécules greffées augmente et moins la fluorescence est importante.

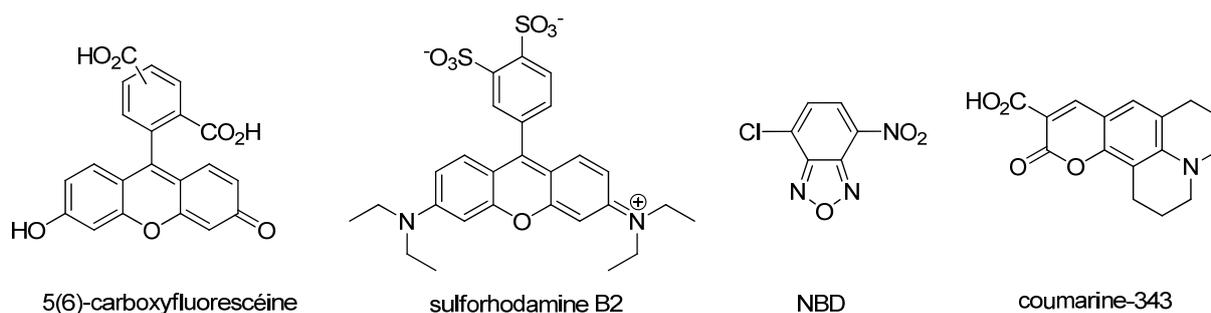


Figure IV – 3 : Différentes sondes fluorescentes utilisées

De par ces différences de longueur d'onde d'absorption et d'émission, le groupement dansyl s'avère approprié pour assurer un suivi de la réaction de fonctionnalisation des micelles par fluorescence. Afin de greffer le dansyl dans les micelles, la molécule **39** possédant à la fois le groupement dansyl et une fonction azoture a été synthétisée (Schéma IV – 1). La formation de la fonction sulfonamide du composé **38** s'effectue avec un bon

rendement de 83% à partir du chlorure de dansyl commercial. La substitution du brome par l'azoture permet quant à elle d'obtenir le composé **39** avec un très bon rendement de 88%. Cet azoture sera appelé dans la suite du manuscrit dansyl-N₃.

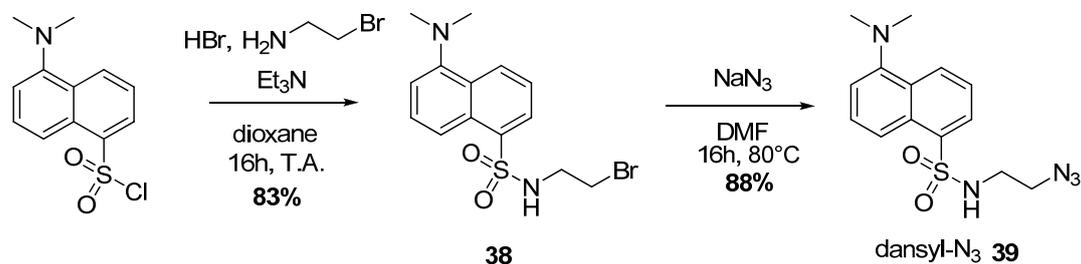


Schéma IV – 1 : Synthèse du dansyl-N₃ **39**

IV – 1 – 3 : Etude de la fluorescence du dansyl-N₃ **39**

Cette sonde de fluorescence, sensible au caractère hydrophobe de son environnement proche, va nous permettre de mieux connaître après greffage, le caractère hydrophobe de l'environnement de la sonde et donc sa localisation au sein de la micelle. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'étude de l'absorption UV-Visible de ce composé (Figure IV – 4). Le dansyl-N₃ **39** a été dilué dans l'éthanol puis analysé par spectroscopie UV-Visible. Il présente un pic d'absorbance à 336 nm caractéristique des composés possédant le groupement dansyl, dont l'absorbance est comprise généralement entre 330 et 340 nm.

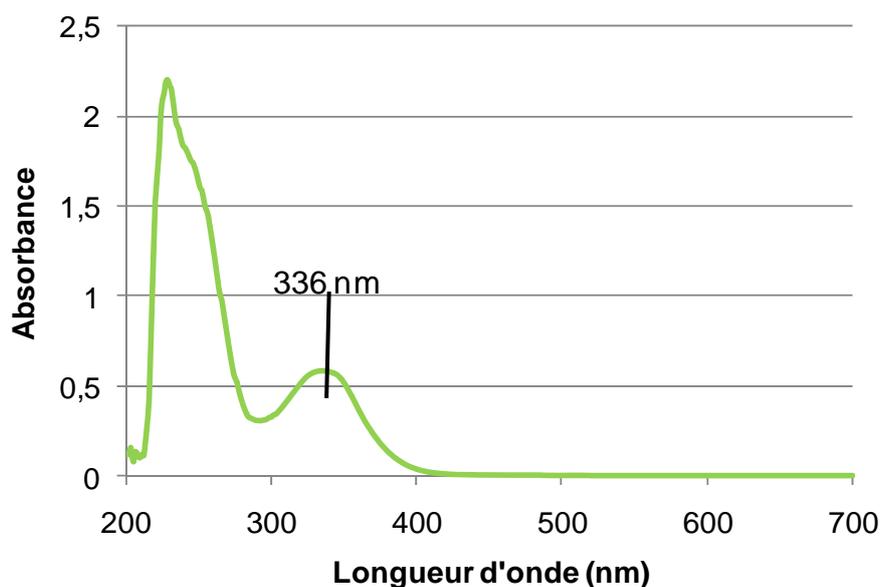


Figure IV – 4 : Spectre UV-Visible du dansyl-N₃ **39** dans l'éthanol

Nous avons ensuite effectué des spectres de fluorescence du dansyl- N_3 **39** dans différents solvants à une longueur d'onde d'excitation fixée à 330 nm (Figure IV – 5).

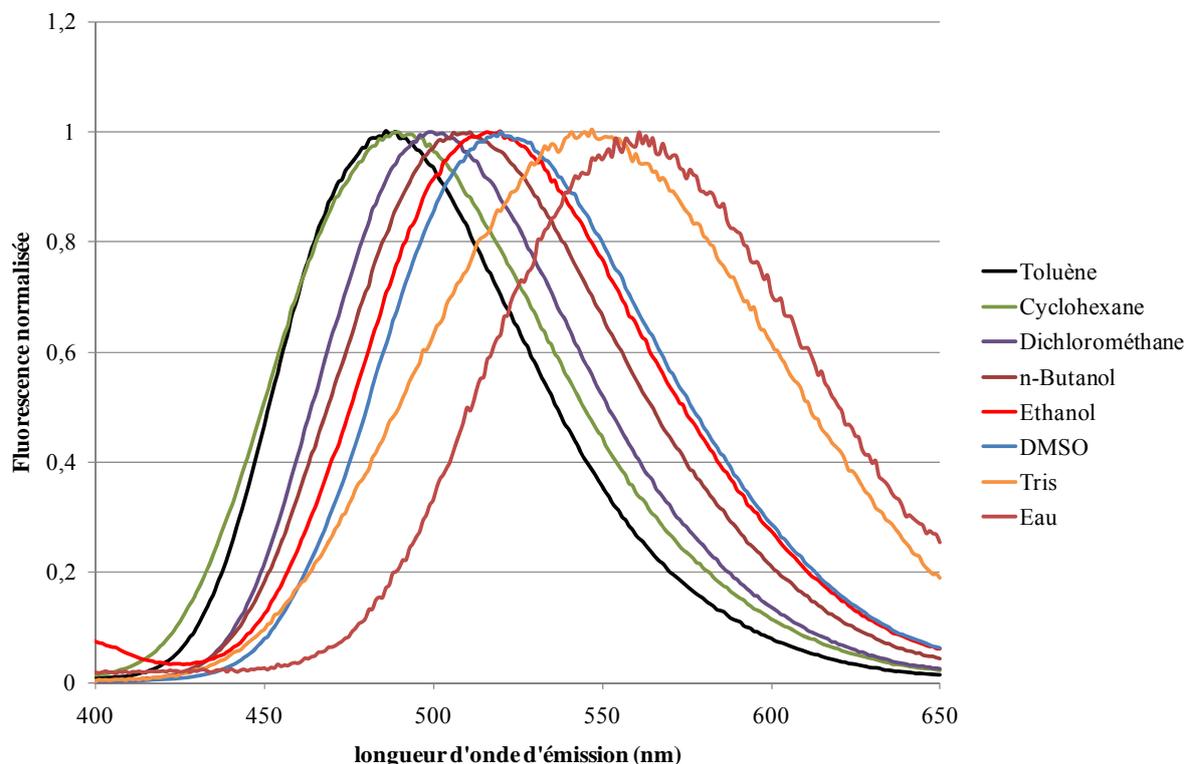


Figure IV – 15 : Spectres de fluorescence normalisés du dansyl- N_3 dans différents solvants
 $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} M$

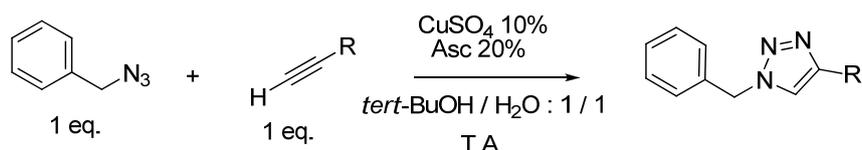
Le signal de fluorescence se situe entre 450 nm et 600 nm et est dépendant du solvant utilisé. L'émission de fluorescence est de 485 et 490 nm lorsque la mesure est effectuée dans le toluène et le cyclohexane. Un déplacement du maximum est observé à 500 nm dans le dichlorométhane et à 510 nm dans le *n*-butanol. Le décalage de l'émission de fluorescence s'accroît encore dans l'éthanol et le DMSO dans lesquels le maximum d'émission est centré vers 515 nm et 520 nm respectivement. Enfin, les décalages les plus importants sont obtenus dans la solution de Tris et dans l'eau dans lesquels le maximum d'émission est centré vers respectivement 545 nm et 560 nm.

Par conséquent, plus l'environnement local de la sonde est hydrophobe, plus le maximum d'émission de fluorescence se déplace vers le bleu, de 560 nm pour l'eau à 485 nm pour le toluène et le cyclohexane.

Il nous sera donc possible d'évaluer l'hydrophobie de l'environnement local de la sonde fluorescente et donc de déduire où elle se situe au sein de la micelle.

IV – 1 – 4 : Essais préliminaires de réaction « click »

Afin d'étudier le greffage du dansyl-N₃ **39** sur les micelles, la réaction a tout d'abord été testée avec l'azoture de benzyle sur différents substrats commerciaux possédant un alcyne terminal dans des conditions classiques,⁵ à savoir un mélange eau/*tert*-butanol en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium (Tableau IV – 1).



Entrée	Alcyne	Produit	Temps	Rendement (%)
1			4h	70
2			4h	62
3			4h	25
4			24h	49
5			4h	18
6			24h	40

Tableau IV – 1 : Essais de réaction entre l'azoture de benzyle et des alcynes commerciaux

La réaction mettant en jeu le pent-1-yne permet la formation du 1,4-triazole désiré **40** avec un rendement satisfaisant de 70% après 4 heures de réaction (entrée 1). L'introduction d'une fonction alcool, augmentant ainsi le caractère hydrophile de l'alcyne, n'a aucune influence sur le rendement et la conversion de l'alcyne puisque **41** est isolé avec un rendement

de 62% au bout de 4 heures de réaction (entrée 2). Lorsque la chaîne carbonée est allongée de 2 à 8 atomes de carbone, la réactivité diminue. En effet, après 4 heures de réaction, la conversion est incomplète (visualisation par CCM) et la molécule **42** est obtenue avec un rendement faible de 25% (entrée 3). L'augmentation du temps de réaction permet d'améliorer significativement la conversion et **42** est isolé avec un rendement de 49% (entrée 4). L'introduction d'une fonction acide carboxylique terminale, renforçant encore le caractère hydrophile de l'alcyne, entraîne une diminution de la réactivité puisque **43** est obtenu avec un rendement moyen de 40%, dû à une conversion incomplète (entrée 5). L'augmentation du temps de réaction n'a pas permis d'améliorer de manière significative le rendement (entrée 6).

Devant le manque de réactivité des chaînes carbonées, nous avons décidé de tester la réaction sous irradiation micro-ondes pour la formation du 1,4-triazole **43** (Schéma IV – 2).^{6,7} Après 10 minutes à 100°C, le composé **43** est isolé avec un rendement de 78%. Le rendement de formation de **43** est donc largement amélioré sous irradiation micro-ondes. Ces conditions seront donc utilisées pour le greffage des micelles par la suite.

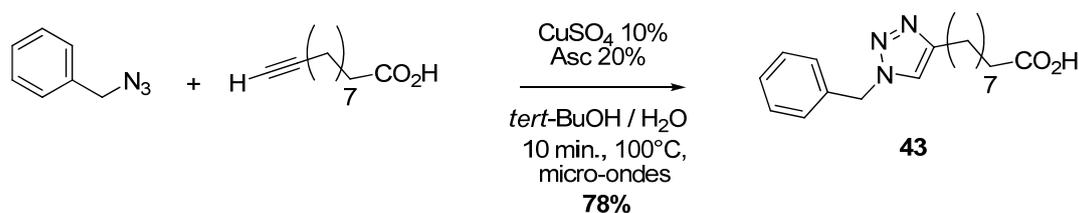
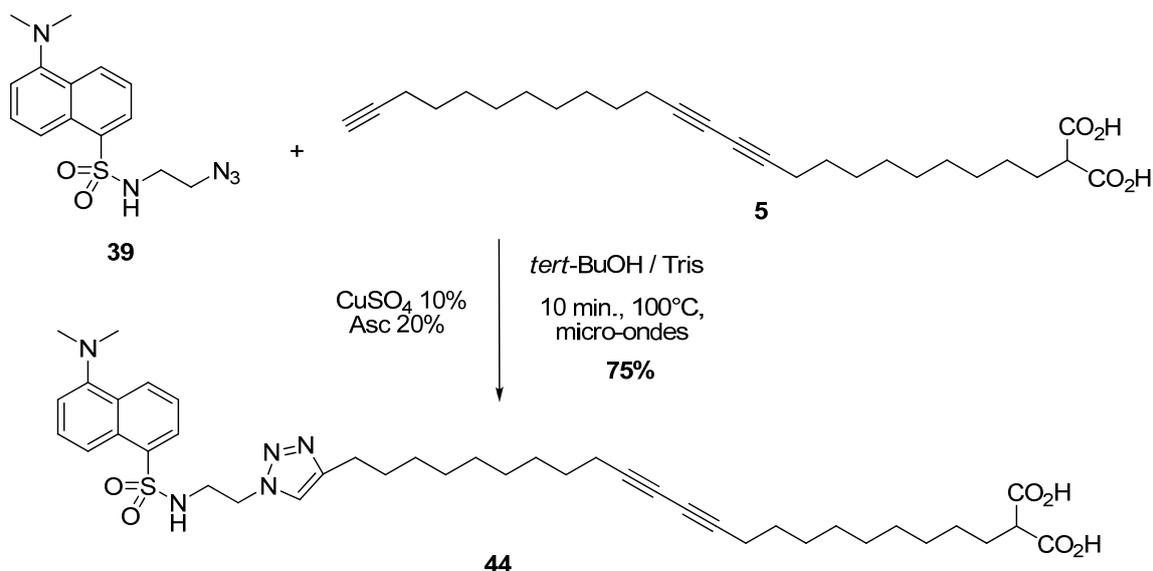


Schéma IV – 2 : Réaction « click » sous irradiation micro-ondes

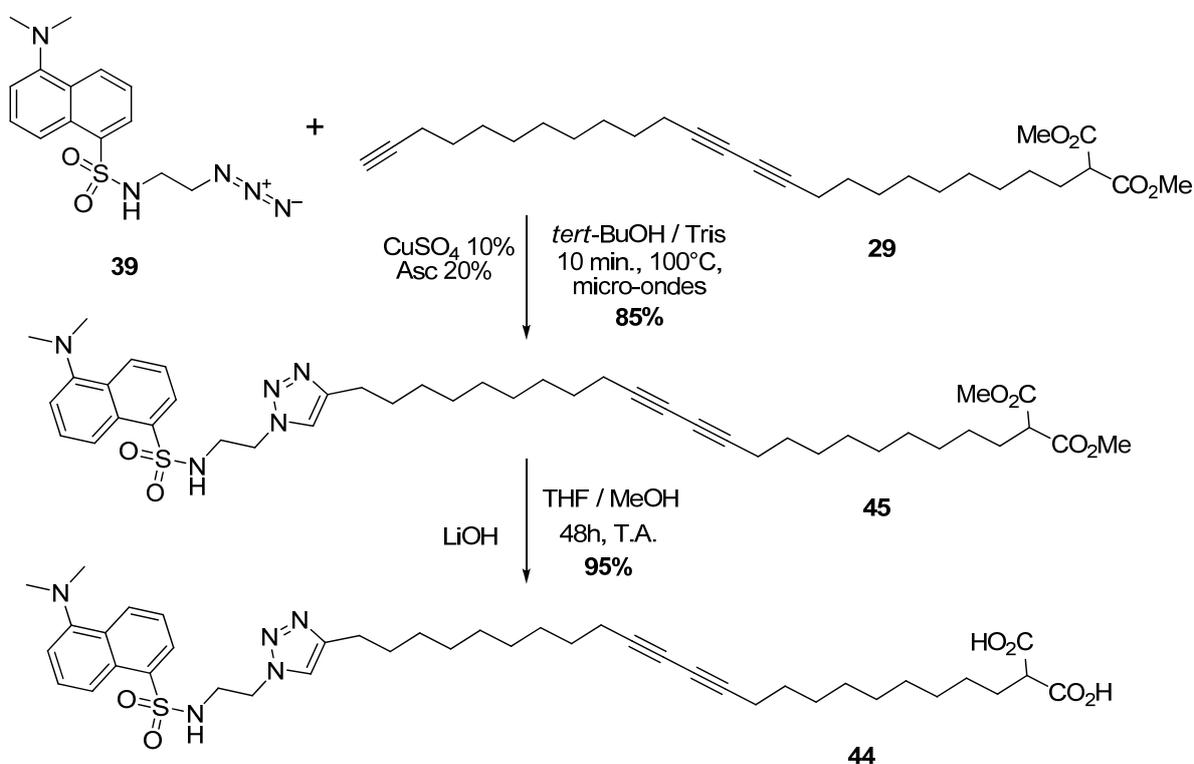
IV – 2 : Essais de réactions « click » avec des micelles polymérisées

IV – 2 – 1 : Essai de réaction « click » avec le lipide 5

Les conditions réactionnelles précédemment établies ont été appliquées à la réaction entre le dansyl-N₃ **39** et le lipide **5** afin de former le composé **44** (Schéma IV – 3). Le lipide est préalablement solubilisé dans le *tert*-butanol puis la solution de Tris est ajoutée pour obtenir un mélange 1/1 où le lipide est à une concentration de 5 mg/mL. Après purification, le rendement de formation du composé **44** de 73%. Ce lipide servira à l'étude de fluorescence de façon à vérifier l'influence de la formation du motif triazole sur les propriétés de fluorescence et sur la formation des micelles.

Schéma IV – 3: Réaction entre le dansyl- N_3 **39** et le lipide **5** sous irradiation micro-ondes

Le composé **44** formé étant très difficilement séparable du lipide **5** par chromatographie sur gel de silice, nous avons décidé de former ce composé par une méthode plus simple (Schéma IV – 4). Une réaction « click » entre l'alcyne vrai **29** possédant les fonctions esters et le dansyl- N_3 **39** a été réalisée pour obtenir le composé **45** avec un rendement de 85%. Ce dernier est alors saponifié afin de fournir le composé **44** avec un rendement de 95%.

Schéma IV – 4 : Synthèse du composé **44**

IV – 2 – 2 : Etude de fluorescence du dansyl-lipide **44**

Le composé **44** formé est solubilisé dans une solution de Tris pH = 11 à une concentration de 5 mg/mL. Les analyses par DLS et par microscopie électronique montrent la formation d'agrégats dont la taille est centrée vers 200 nm (Figure IV – 5). Ce composé n'arrive donc plus à former des micelles.

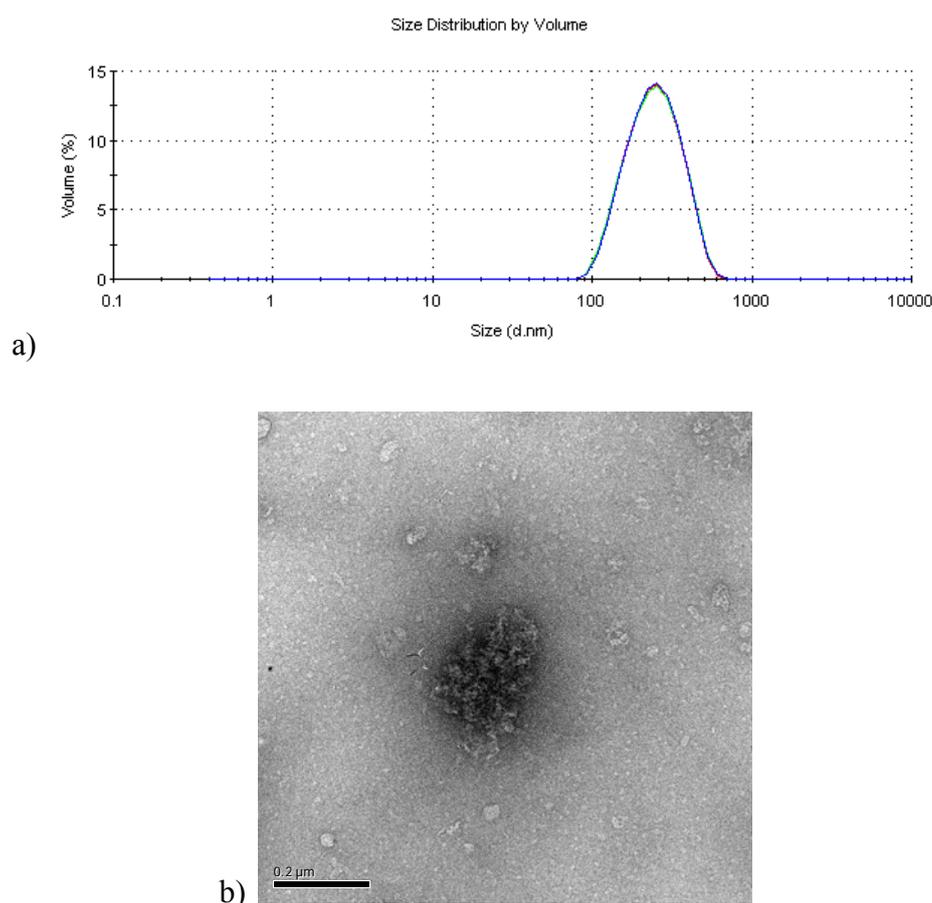


Figure IV – 5 : Analyses du composé **44** solubilisé dans la solution de Tris : a) par DLS ; b) par MET

Le composé **44** a alors été analysé par fluorescence en le comparant au composé **39** (Figure IV – 6). Pour cela, des quantités identiques (en nombre de moles) de **44** et de **39** ont été dissoutes dans la solution de Tris et dans de l'éthanol. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm.

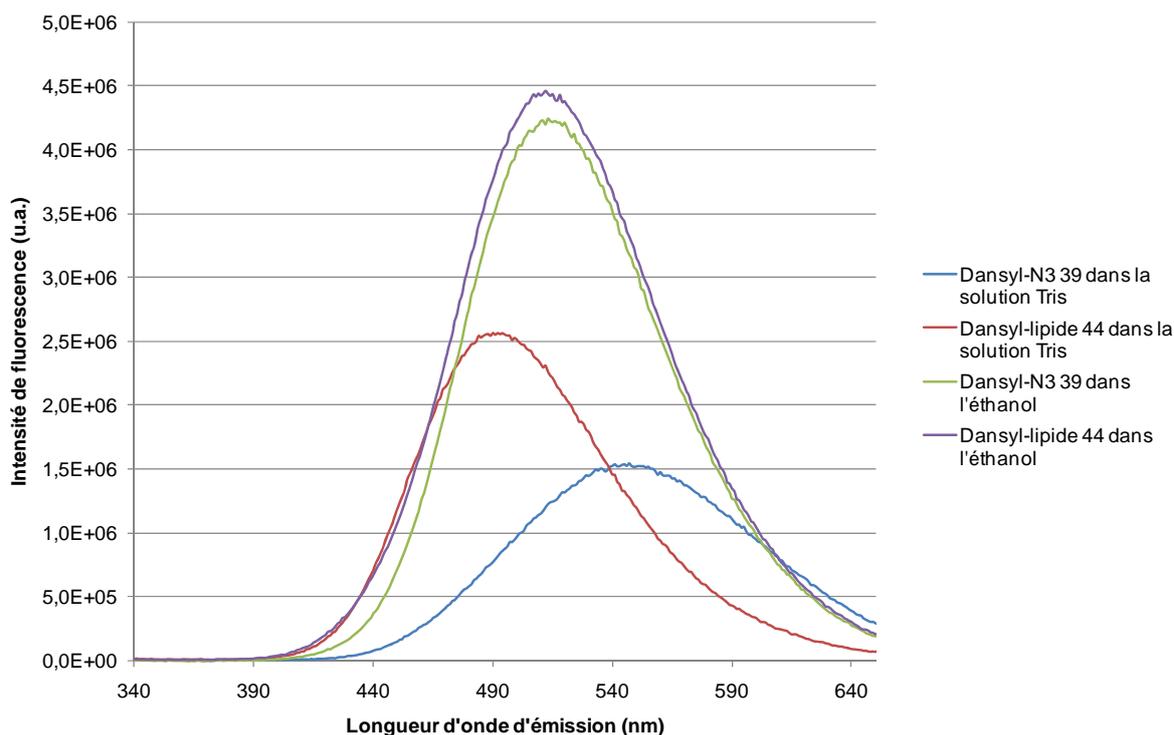


Figure IV – 6 : Spectres de fluorescence des composés **39** et **44** dans la solution Tris pH = 11 et dans l'éthanol ; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Dans l'éthanol, les spectres des composés **39** et **44** sont quasiment identiques avec un maximum vers 510 nm. Ceci signifie que le fluorophore n'est pas influencé par le changement de la fonction azoture en fonction triazole. En revanche, lorsque les composés se retrouvent en solution aqueuse, des différences sont observées. Le dansyl-N₃ a un maximum d'émission à 545 nm, ce qui correspond à la valeur précédemment observée. En effet, en solution aqueuse, le dansyl-N₃ est solubilisé de manière homogène et le fluorophore est donc dans un environnement hydrophile. Le dansyl-lipide **44** dans la solution de Tris pH = 11, lui, a son maximum à 490 nm. Cette valeur, décalée vers le bleu, témoigne d'une hydrophobie importante. Ceci s'explique par le fait que dans ce cas, le composé forme des agrégats et le fluorophore est emprisonné dans une matrice très hydrophobe constituée des chaînes lipidiques. En effet, les agrégats observés avec la molécule **44** sont détruits dans l'éthanol et les molécules sont alors dissociées dans la solution.

Le motif triazole ne perturbe pas la fluorescence du groupement dansyl. En revanche, l'arrangement du lipide en solution influence fortement la fluorescence.

IV – 2 – 3 : Traitement des réactions « click » avec les micelles polymérisées

Lors de la réaction « click » entre l'azoture de dansyl **39** et le lipide **5**, nous avons vu que le rendement était de 75% et du dansyl-N₃ était encore présent à la fin de la réaction. Dans le cas de la fonctionnalisation des micelles, il n'est pas envisageable d'éliminer l'azoture n'ayant pas réagi par chromatographie sur gel de silice comme ce fut le cas précédemment. Nous avons alors mis au point un procédé de purification des micelles permettant d'évaluer les rendements de greffage et de séparer les micelles du dansyl en excès (Figure IV – 7).

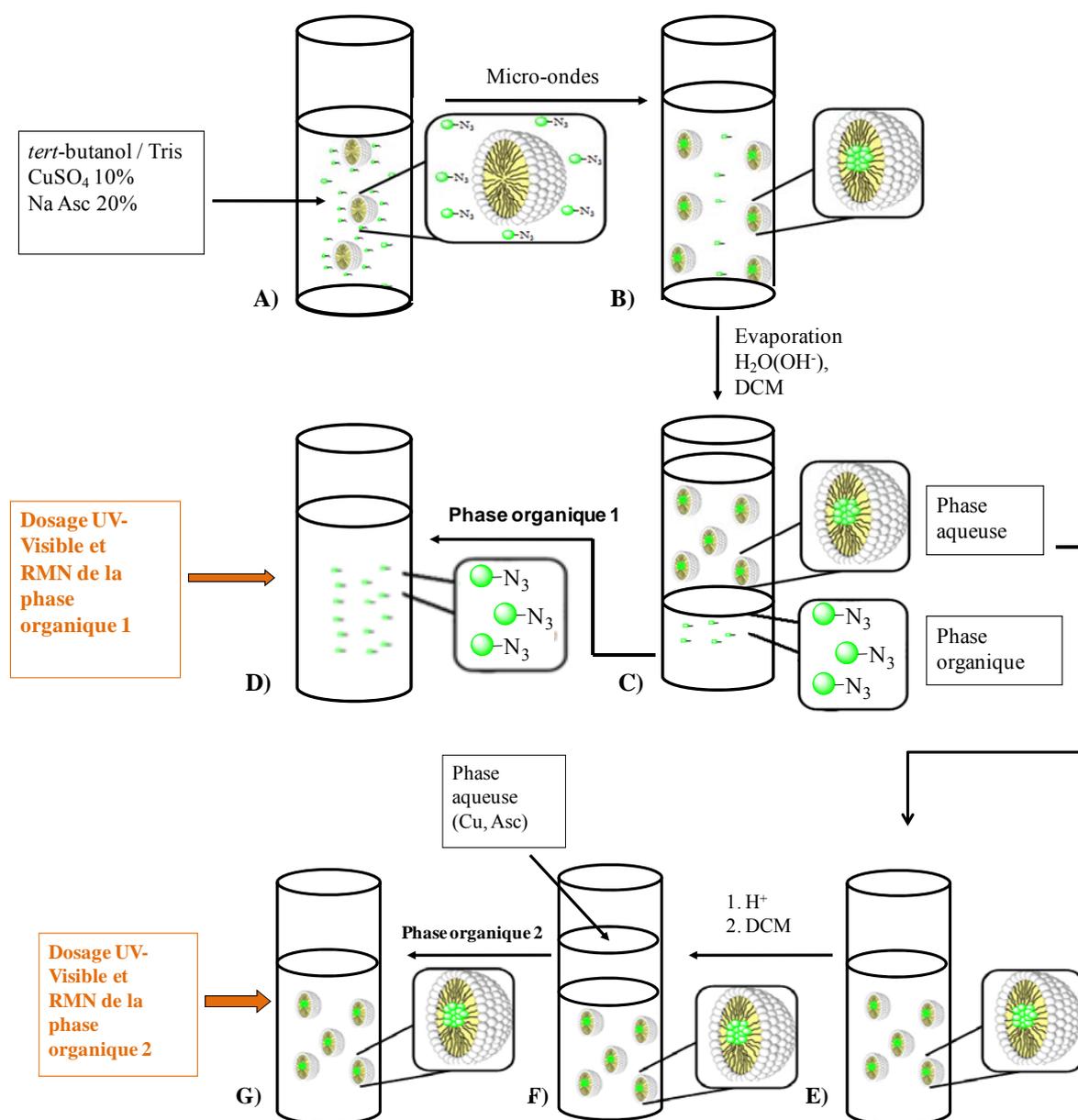


Figure IV – 7 : Protocole utilisé pour le suivi de la réaction de greffage des micelles

A une solution de micelles polymérisées dans le Tris à pH = 11, sont ajoutés le dansyl-N₃, le sulfate de cuivre et l'ascorbate de sodium. Du *tert*-butanol est ajouté afin d'obtenir un mélange *tert*-butanol/Tris 1/1 (A). La réaction se déroule sous irradiation micro-ondes et le mélange obtenu contient des micelles fonctionnalisées et du le dansyl-N₃ (B). Le milieu est alors évaporé puis repris dans du dichlorométhane auquel est ajoutée une solution de soude à 0,5 M (C). L'azoture de dansyl passe en phase organique, appelée phase organique 1, tandis que les micelles, fonctionnalisées ou non, restent en phase aqueuse (D et E). Dans un premier temps, la phase organique est concentrée puis reprise dans un volume précis d'éthanol. Cette solution sera alors dosée par spectroscopie UV-Visible. Puis dans un deuxième temps, la phase aqueuse est acidifiée puis du dichlorométhane est ajouté (F). Les micelles, qui possèdent des groupements acides carboxyliques en surface, passent dans la phase organique appelée phase organique 2 (G). Après séparation et évaporation, les micelles sont reprises dans un volume précis d'éthanol. Cette solution pourra alors être dosée par spectroscopie UV-Visible. Des courbes de calibration de l'azoture **39** et du composé **44** dans l'éthanol ont tout d'abord été réalisées ce qui permettra par la suite d'évaluer l'efficacité de la réaction « click » (cf : Partie expérimentale).

Avant de commencer l'étude de fonctionnalisation, nous allons nous intéresser à la stabilité des micelles lors des conditions réactionnelles puis lors de la purification.

Un essai de traitement a été réalisé après réaction entre le lipide **5** et le dansyl-N₃ **39**. Le rendement a été évalué par titration UV-Visible de l'azoture restant présent dans la phase organique 1 (Figure IV – 7). Après évaporation de la phase organique et re-solubilisation dans un volume précis d'éthanol, le dosage du dansyl-N₃ restant donne une conversion de 75% du dansyl-N₃, valeur similaire à l'estimation du rendement obtenu au Schéma IV – 4.

IV – 3 : Stabilité des micelles lors de la réaction

Les conditions de réaction « click » étant plutôt rudes, des essais préalables de stabilité des micelles ont été conduits par DLS.

IV – 3 – 1 : Stabilité des micelles polymérisées dans le mélange solution *tert*-butanol / Tris

L'étape de greffage par « click » réaction précédemment mise au point s'effectue dans un mélange *tert*-butanol / Tris : 1 / 1 sous irradiation micro-ondes. Nous avons donc voulu observer le comportement des micelles polymérisées dans un tel mélange à température ambiante. Une analyse par microscopie électronique montre que les micelles sont restées stables dans ce mélange contenant 50% de *tert*-butanol (Figure IV – 8).

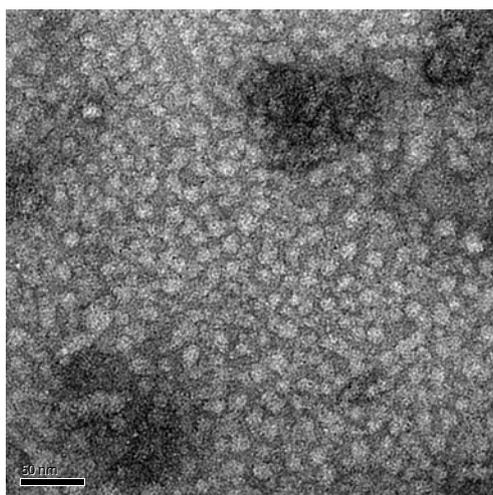


Figure IV – 8 : Image MET de micelles polymérisées dans le mélange *tert*-butanol/Tris ;
barre : 50 nm.

Dans le mélange *tert*-butanol/Tris, les analyses par DLS montrent une population centrée vers 5 - 7 nm. Cette valeur est identique à celle des micelles dans la solution de Tris. Les analyses par DLS montrent elles aussi que les micelles polymérisées sont stables dans le mélange *tert*-butanol/Tris à température ambiante.

IV – 3 – 2 : Stabilité des micelles polymérisées sous irradiation micro-ondes et lors de l'extraction en solvant organique

Nous avons par la suite vérifié la stabilité des micelles lors des conditions réactionnelles. Pour ce faire, un échantillon de micelles polymérisées dans un mélange *tert*-butanol / Tris est placé sous irradiation micro-ondes pendant 10 minutes à 100°C.

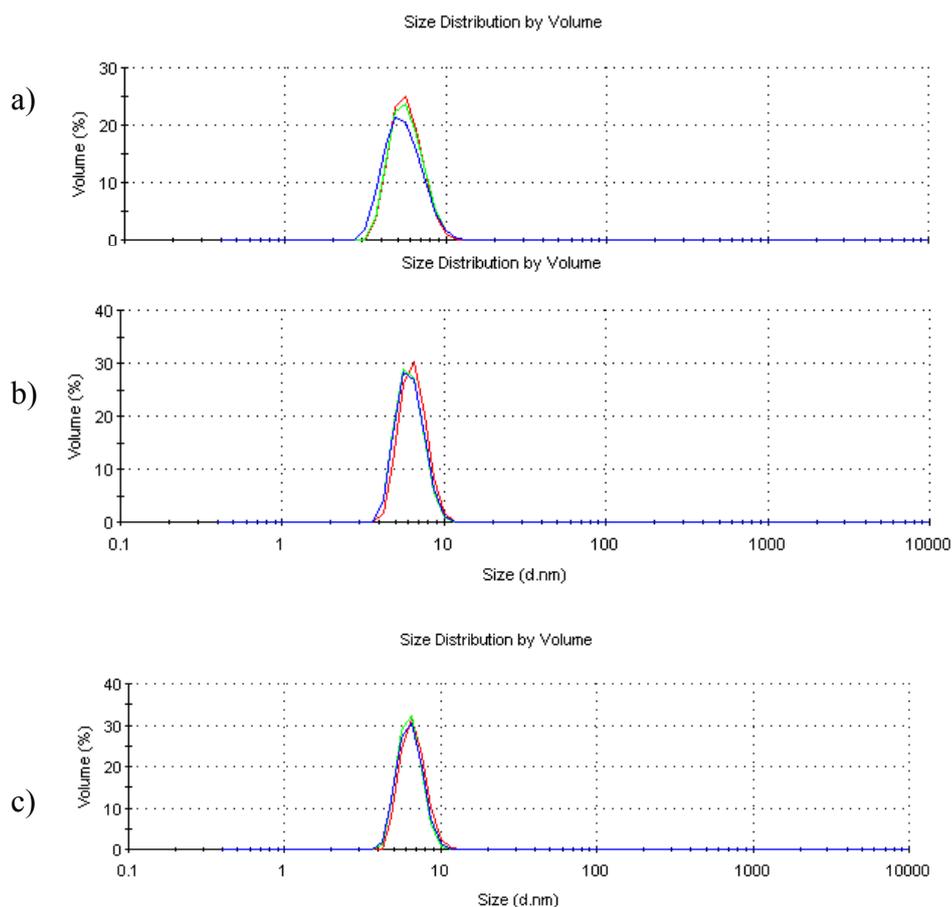


Figure IV – 9 : Analyses DLS des micelles polymérisées : a) après micro-ondes ; b) après évaporation et re-solubilisation ; c) après extraction organique (dichlorométhane)

L'analyse par DLS montre que les micelles résistent au chauffage par micro-ondes (Figure IV – 9, a). Le procédé est alors poursuivi et le solvant est évaporé puis repris dans la solution de Tris.

Là encore, les micelles sont préservées (Figure IV – 9, b). La dernière étape d'extraction par incorporation de solvant organique est alors réalisée. De nombreux solvants ont été testés (acétate d'éthyle, dichlorométhane, cyclohexane, éther diéthylique, pentane ou

encore toluène). Dans tous les cas, les micelles sont encore présentes dans la phase aqueuse après extraction (Figure IV – 9, c).

Il semble donc que les micelles polymérisées soient résistantes à l'ensemble du procédé utilisé. La stabilité des micelles fonctionnalisées va maintenant être étudiée.

IV – 3 – 3 : Stabilité des micelles polymérisées lors de la fonctionnalisation

Lors de la réaction, le dansyl est greffé à l'intérieur des micelles. Nous avons alors réalisé la réaction avec une quantité de 10% de dansyl par rapport aux chaînes lipidiques, puis le brut réactionnel est analysé par DLS et MET (Figure IV – 10).

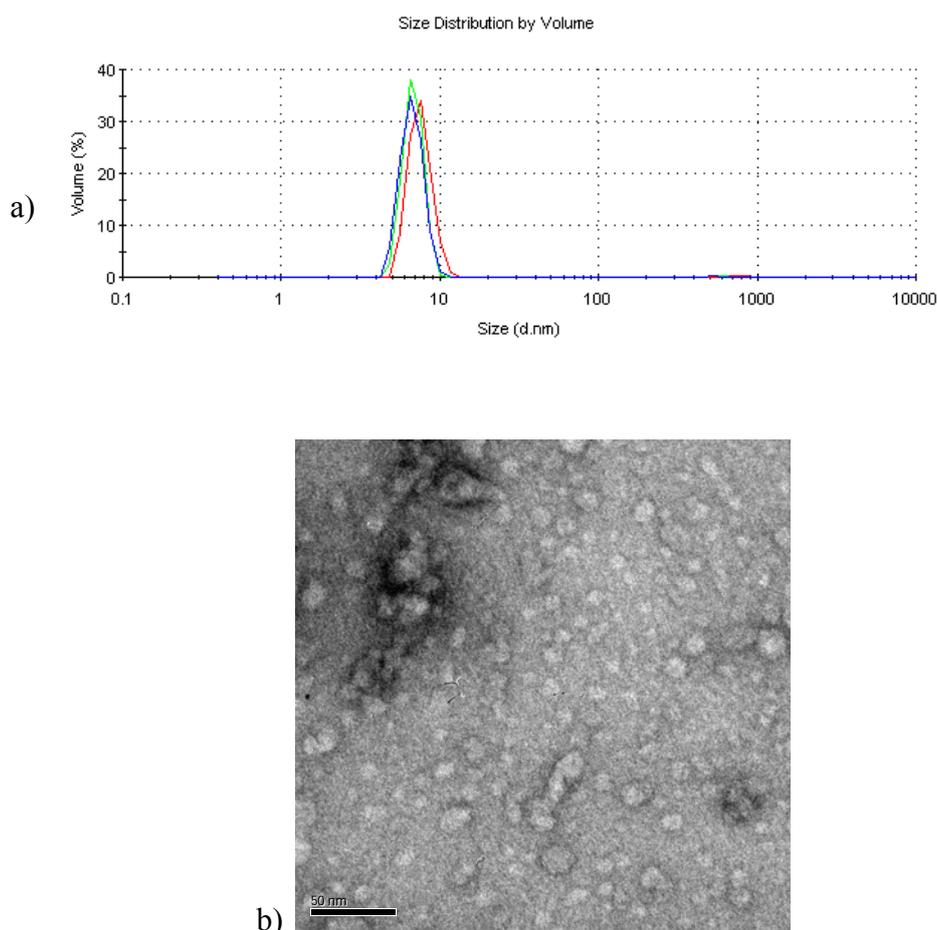


Figure IV – 10 : Analyses à la fin de l'étape de fonctionnalisation : a) par DLS ; b) par MET

A la vue des résultats obtenus, nous pouvons donc conclure que cette étape de fonctionnalisation ne déforme pas les micelles. Nous avons donc poursuivi le procédé en étudiant l'étape d'extraction par un solvant organique mimant l'étape fournissant la phase organique 2 (Figure IV – 11). Les solvants testés sont l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le cyclohexane, l'éther diéthylique, le pentane ou encore le toluène).

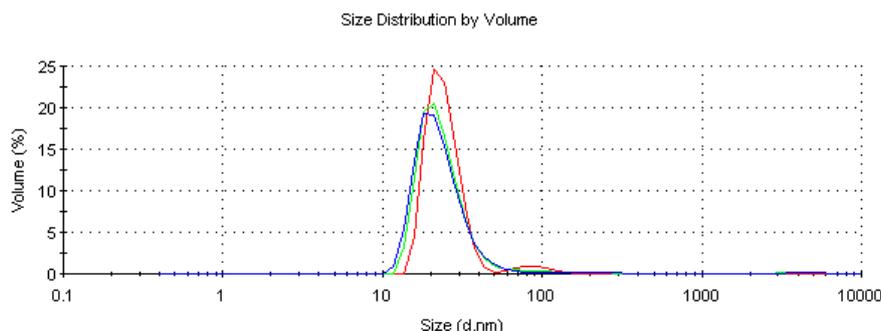


Figure IV – 11 : Analyses DLS des micelles polymérisées après extraction organique (dichlorométhane)

Quelque soit le solvant utilisé, des arrangements vers 20-30 nm sont obtenus et les micelles ne sont plus présentes. Cette étape d'extraction permettant d'éliminer le dansyl en excès pose problème car les micelles se désagrègent. De ce fait, par la suite, nous devons adapter les conditions réactionnelles afin que la fonctionnalisation soit quantitative et permettre de supprimer l'étape d'élimination du dansyl n'ayant pas réagi.

Des études complémentaires de stabilité des micelles polydiacétyléniques ont également été effectuées au laboratoire avec des micelles de lipide 11,8-NTA **1**.⁸

IV – 4 : Optimisation des réactions « click » avec les micelles polymérisées de lipide **5**

IV – 4 – 1 : Etude des conditions micro-ondes

La réaction a ensuite été réalisée avec les micelles polymérisées de lipide **5** dans diverses conditions micro-ondes, à une concentration en micelles de 2,5 mg/mL avec un équivalent de dansyl-N₃ par rapport aux micelles (Tableau IV – 2).

Le pourcentage d'azoture restant a été évalué par titration UV-Visible dans la phase organique 1.

Entrée	Conditions micro-ondes	Pourcentage d'azoture 39 restant ^a
1	10 min, 100°C	25,9
2	20 min, 100°C	25,5
3	10 min, 80°C	25,2
4	10 min, 60°C	24,0
5	5 min, 100°C	25,7
6	5 min, 80°C	24,9
7	5 min, 60°C	25,1

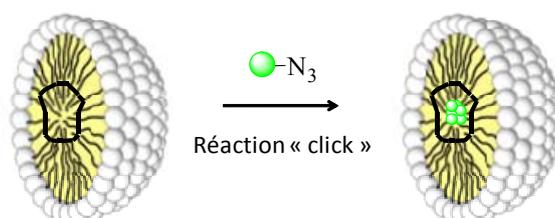
a : Dosage du dansyl-N₃ restant après traitement dans la phase organique 1 (Figure IV – 7)

Tableau IV – 2 : Mises au point des conditions micro-ondes

Dans les conditions précédemment mises au point, à savoir 10 minutes à 100°C, le dansyl-N₃ **39** est récupéré à hauteur de 25,9 % (entrée 1). La conversion de l'azoture est identique à celle obtenue auparavant. L'augmentation du temps de réaction (entrée 2) ne permet pas d'améliorer cette conversion qui semble être limitée à 75% lorsque la réaction se déroule dans des conditions stœchiométriques. Plusieurs essais ont alors été réalisés afin de rendre les conditions plus douces. Ni la diminution de la température (entrées 3 et 4), ni la diminution du temps de réaction (entrées 5, 6, 7) n'influencent la réaction et une conversion de 75% est obtenue dans tous les cas. La réaction étant très dépendante de la qualité de l'ascorbate de sodium, il a été choisi par précaution que les conditions réactionnelles de la fonctionnalisation interne des micelles seront de 10 minutes à 80°C sous irradiation micro-ondes.

IV – 4 – 2 : Etude de la concentration

Des essais de fonctionnalisation ont été réalisés à différentes concentrations en gardant toujours un rapport stœchiométrique des réactifs afin de tenter d'améliorer la conversion en azoture (Tableau IV – 3).



Entrée	Concentration en micelles (mg/mL)	Pourcentage d'azoture restant dans la phase organique 1 (%)
1	5	24,8
2	2,5	25,5
3	1	25,2
4	0,5	24,7

Tableau IV – 3 : Influence de la concentration

Dans la gamme utilisée, la concentration n'a aucune influence sur la réaction. Dans tous les cas, le dansyl est récupéré à hauteur de 25%. Ceci montre bien la reproductibilité à la fois de la réaction, et de la purification. Dans la suite, la concentration sera fixée à 1 mg/mL.

Le traitement du milieu réactionnel a ensuite été réalisée jusqu'à la fin du traitement afin de quantifier tous les composés présent. Après réaction, le procédé de séparation est réalisé comme expliqué Figure IV – 7. La réaction est réalisée à 1 mg/mL avec des quantités molaires équivalentes de réactifs. Le dosage de la phase organique 1 montre encore une fois que 25% de l'azoture n'a pas réagi. Cependant, le dosage UV-Visible de la phase organique 2, donne une valeur de seulement 8% de dansyl ayant réagi pour former le triazole, alors que 75% étaient attendus. Les deux échantillons ont alors été analysés par RMN ^1H (Figure IV – 12).

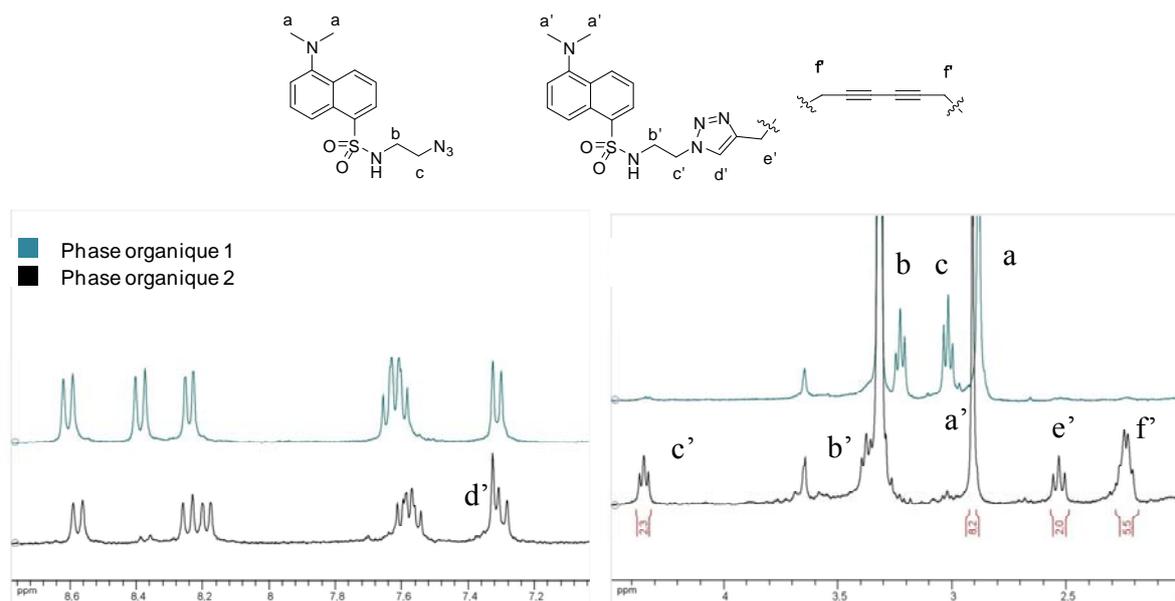


Figure IV – 12 : RMN ^1H des deux phases organiques

Les spectres RMN ^1H montrent que le seul composé présent dans la phase organique 1 est bien le dansyl- N_3 **39**. En revanche, le spectre RMN ^1H de la phase organique 2 révèle l'absence du dansyl- N_3 et la formation d'un nouveau composé dont le spectre présente les signaux caractéristiques du motif 1,4-triazole (c' , d' , e') présents dans le spectre du composé **44**. Le rapport entre les signaux du motif triazole et les signaux de la chaîne lipidique (e' et f') montre la présence d'environ 80% de triazole. Cette valeur est en accord avec les taux de conversion de dansyl- N_3 de 75%. Le dosage du dansyl- N_3 restant est donc bon. Il apparaît donc qu'il existe un phénomène particulier au niveau du dosage du motif dansyl dans les micelles. La première explication serait une perte de micelles, fonctionnalisées ou non, au cours du traitement, ce qui tendrait à faire diminuer l'absorbance. Une autre explication pourrait être que le dansyl présent à forte concentration dans le cœur hydrophobe des micelles perturberait le signal UV-Visible.

IV – 4 – 3 : Etude de l'influence de la quantité d'azoture

Les conditions précédentes n'ayant pas permis un greffage quantitatif de l'azoture, des essais de greffage ont alors été effectués en faisant varier la quantité de dansyl- N_3 . En effet, nous avons vu que notre traitement permettant l'élimination du dansyl n'ayant pas réagi détruisait les micelles. Il nous faut donc trouver des conditions où tout le dansyl- N_3 **39** réagit.

Nous avons alors effectué différentes réactions à une concentration de 1 mg/mL en micelles polymérisées en faisant varier la quantité d'azoture introduit. Après réaction, l'azoture n'ayant pas réagi a été dosé par spectroscopie UV-Visible (Tableau IV – 4).

Entrée	azoture / alcyne	% de dansyl-N ₃ restant ^a
1	1/1	25,3
2	6/10	0,9
3	4/10	0,6
4	2/10	0,0
5	1/10	0,0

A : Dosage du dansyl-N₃ restant après traitement dans la phase organique 1

Tableau IV – 4 : Dosage du dansyl-N₃ pour différents ratios azoture/alcyne

L'utilisation de dansyl-N₃ en défaut permet une réaction totale ou quasi-totale. Ces conditions permettent donc de s'affranchir de l'étape d'élimination du dansyl-N₃. Nous avons vérifié à ce stade que tous les échantillons formaient bien des micelles.

IV – 5 : Etude approfondie de la fonctionnalisation interne des micelles⁹

La consommation du dansyl-N₃ peut être totale ou quasi-totale pour des valeurs allant jusqu'à 0,6 équivalents de dansyl-N₃ par rapport aux chaînes lipidiques. Ceci permet donc de s'affranchir de l'étape d'élimination du dansyl-N₃ détruisant les micelles. Une étude systématique a alors été effectuée avec des quantités de dansyl-N₃ de 0 ; 0,02 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,40 et 0,60 équivalents par rapport aux chaînes lipidiques pour des micelles formées du lipide **5** polymérisées et non polymérisées. Les expériences de contrôle ont été réalisées avec les micelles provenant du lipide **4** possédant le groupement méthyle terminal.

Le comportement de la sonde fluorescente devrait nous permettre de mieux caractériser la fonctionnalisation.

IV – 5 – 1 : Caractérisation par électrophorèse

Le traitement appliqué précédemment aux micelles a tout d'abord été réalisé afin de vérifier que la fonctionnalisation était bien totale de 0 à 0,6 équivalents de dansyl- N_3 . L'intégrité des micelles a également été vérifiée par DLS. De plus, nous avons réalisé des expériences d'électrophorèse. L'électrophorèse est largement utilisée dans le domaine de la biologie, notamment pour la séparation de protéines ou d'ADN. Elle repose sur la propriété qu'ont les molécules chargées à migrer dans un gel sous l'influence d'un champ électrique extérieur : une molécule migrera plus ou moins vite selon son poids moléculaire et sa charge.^{10,11} En effet, plus la molécule est chargée, plus elle sera entraînée facilement par le courant électrique. De plus, la séparation s'effectue également selon le poids moléculaire de la molécule, les molécules de grande taille étant plus retenues par le gel que les molécules de petite taille. Les gels principalement utilisés sont soit l'agarose soit l'acrylamide.

L'électrophorèse sur gel d'agarose avait été précédemment utilisée au laboratoire pour séparer les nanotubes de carbone des CLP (Chapitre I). Nous avons donc utilisé ce type de gel pour analyser les brut réactionnels à un rapport masse agarose / volume de solution de 1%. Les analyses par électrophorèse ont été réalisées sur des échantillons de micelles greffées par des taux de dansyl de 10% (ou un nombre de moles identique pour le composé **44**) sur des micelles non polymérisées de lipide **5** et sur des micelles non polymérisées de lipide **4** comme contrôle (Figure IV – 13). Les gels ont été réalisés avec ou sans SDS.

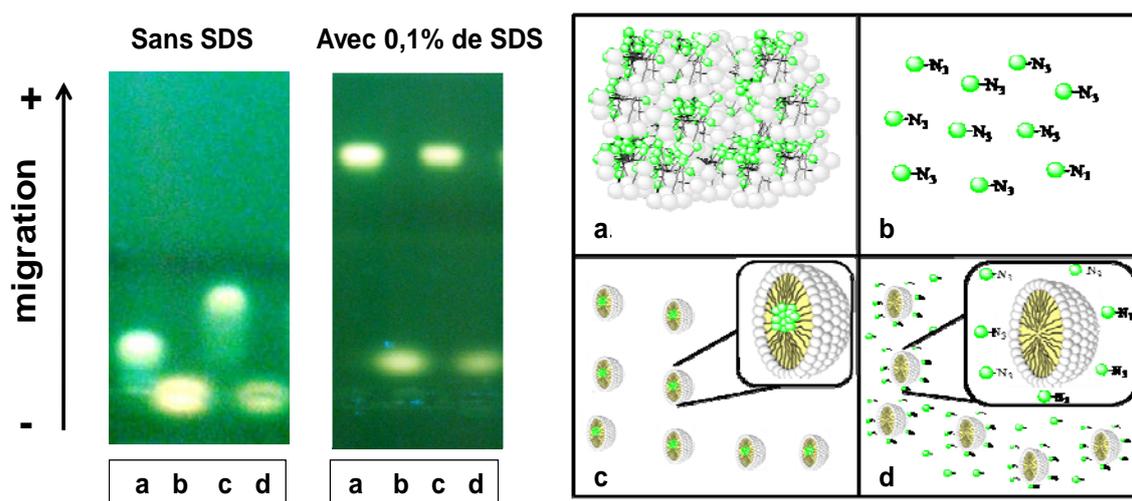


Figure IV – 13: Electrophorèse sur gel d'agarose. a) Lipide-dansyl **44** en agrégats ; b) dansyl- N_3 **39** en solution ; c) Mélange après réaction avec des micelles de lipide **5** ; d) Mélange après réaction avec des micelles de lipide **4**.

Dans les expériences sans SDS (gel de gauche), le dansyl-N₃ n'a pas migré (piste b). Ceci est dû au fait que la molécule n'est pas chargée et ne peut donc pas être entraînée par le courant électrique. Les analyses montrent de plus qu'après réaction entre les micelles de lipide **5** et l'azoture **39**, une nouvelle bande fluorescente est apparue et la bande correspondant au dansyl **39** a disparu (piste c). Ceci indique bien qu'il n'y a plus de dansyl libre et donc que la fonctionnalisation est totale. En revanche, avec le lipide **4** ne possédant pas d'alcyne terminal, aucun changement ne s'opère et la bande correspondant au dansyl-N₃ est retrouvée inchangée (piste c). Nous pouvons également noter que la mobilité de la nouvelle bande formée après réaction est plus forte que celle correspondant au lipide-dansyl **44** pur qui se trouve sous forme d'agrégats (piste a). Ceci peut s'expliquer par le fait que les micelles sont de plus petite taille et migrent donc plus facilement dans le gel d'agarose.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la même expérience en présence de SDS (gel de droite). Ce dernier a la propriété de dissocier tous les auto-assemblages, micelles ou agrégats, en leur constituant propre. De ce fait, une nouvelle bande est apparue en front d'éluion pour les deux échantillons (pistes a et c) comportant les micelles et le composé **44** en agrégats. Celle-ci correspond à la molécule **44** libre en solution. En effet, les groupements malonates étant chargés, la molécule est attirée par le pôle positif sous la force du courant. La molécule étant de petite taille, elle migre aisément à travers le maillage du gel.

Lors de ces expériences, une double ségrégation s'opère. Une première différenciation a lieu selon la charge électrique des composés, les molécules neutres ne migrant pas ou peu. Puis, parmi les molécules ayant une migration, une seconde séparation a lieu selon le poids des assemblages formés, les assemblages les plus gros ayant le plus de difficulté à migrer.

Nous avons alors entrepris les mêmes expériences, mais cette fois-ci avec les micelles polymérisées (Figure IV – 13).

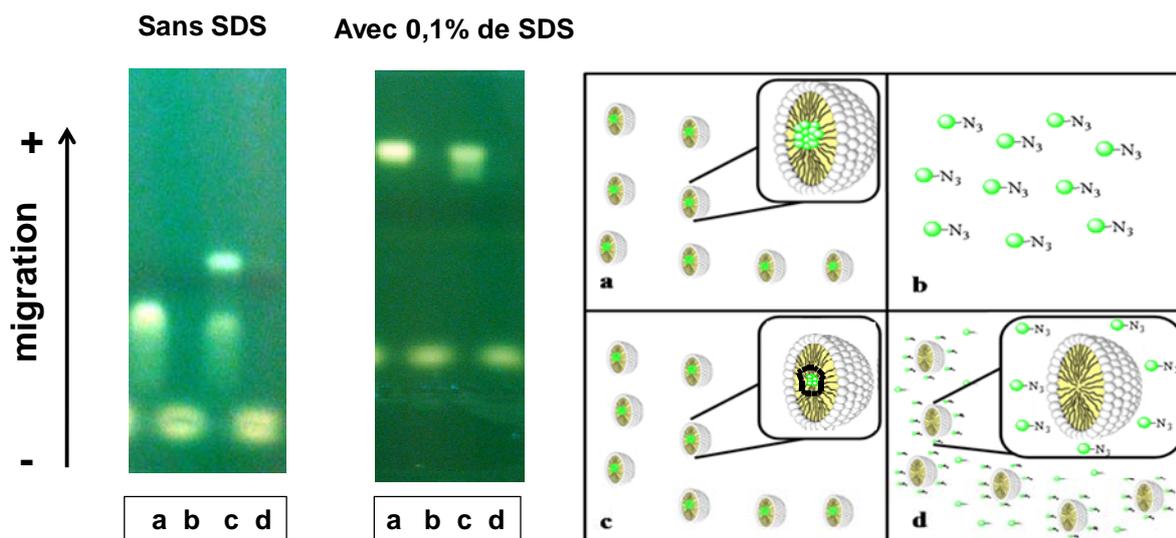


Figure IV – 13: Electrophorèse sur gel d'agarose. a) Mélange après réaction avec des micelles non polymérisées de lipide 5; b) dansyl- N_3 **39** en solution; c) Mélange après réaction avec des micelles polymérisées de lipide 5; d) Mélange après réaction avec des micelles polymérisées de lipide 4.

Les micelles polymérisées de lipide **4** ne permettent pas l'incorporation du dansyl au sein des micelles et l'azoture est retrouvé intact. En revanche, lorsque des micelles de lipide **5** sont utilisées, le dansyl- N_3 a entièrement réagi. Cependant, une différence est observée entre les micelles non polymérisées et les micelles polymérisées. En effet, dans le cas des micelles non polymérisées, une seule bande apparaît, alors que dans le cas des micelles polymérisées, deux bandes sont formées. La première, de plus faible intensité, est identique à celle des micelles non polymérisées fonctionnalisées. La deuxième, dont l'intensité est plus forte, a une mobilité plus élevée, signifiant que l'arrangement est de poids moléculaire plus faible. Nous pouvons également observer que la bande correspondant aux micelles non polymérisées et fonctionnalisées est diffuse alors que la nouvelle bande est fine. La première correspondrait aux micelles non polymérisées. La deuxième correspondrait aux micelles polymérisées qui sont plus rigides et ne se déforment pas lors de l'élution. La différence d'élution pourrait provenir d'une différence de poids moléculaire entre les micelles non polymérisées et les micelles polymérisées.

A la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'échantillon de micelles polymérisées contient en grande partie des micelles polymérisées, et une faible proportion de micelles qui ne sont pas totalement polymérisées. Chaque échantillon après réaction a été par la suite analysé par spectroscopie de fluorescence afin de déterminer l'environnement de la sonde.

IV – 5 – 2 : Analyses de la fonctionnalisation des micelles par fluorescence

Toutes les expériences ont été réalisées sur les micelles polymérisées et non polymérisées des lipides **4** et **5** avec des quantités dansyl-N₃ **39** variant de 0 à 0,6 équivalent (Figure IV – 14). Les milieux réactionnels sont dilués 20 fois dans une solution de Tris afin de réaliser les expériences de fluorescence. Nous avons tout d'abord analysé les échantillons correspondant à 0,1 équivalent de dansyl-N₃ par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm.

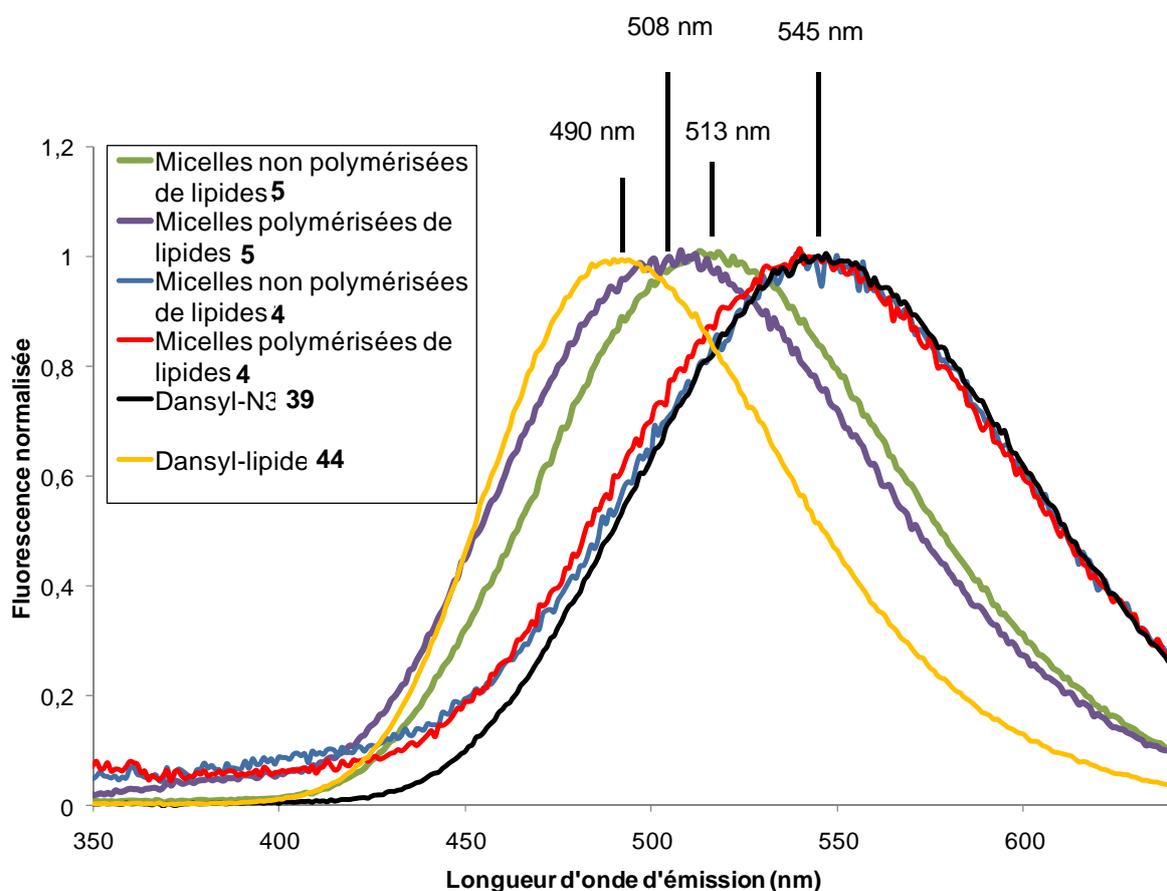


Figure IV – 14 : Spectres de fluorescence normalisés des différents échantillons dans la solution de Tris pH = 11; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Pour les micelles non polymérisées de lipide **5**, une diminution de la longueur d'onde d'émission de 32 nm est observée par rapport au dansyl-N₃ en solution aqueuse. Comme nous l'avons vu précédemment, cette sonde fluorescente est sensible à son environnement. Ce décalage vers le bleu peut être attribué à l'environnement hydrophobe des micelles. Dans le cas des micelles polymérisées de lipide **5**, le déplacement de la longueur d'onde d'émission

est plus important (37 nm) indiquant un environnement hydrophobe encore plus marqué. Concernant les expériences de contrôle avec les micelles de lipide **4**, polymérisées ou non, les spectres sont identiques à celui obtenu pour le dansyl-N₃ **39** en solution. Ceci signifie que lorsque la réaction est impossible du fait de l'absence de la liaison alcyne terminal, le fluorophore se retrouve intact dans la solution aqueuse.

A la vue des déplacements du maximum de la longueur d'onde d'émission de fluorescence du dansyl, il semble que le fluorophore se retrouve dans un environnement dont le caractère hydrophobe se situe entre le milieu aqueux et l'intérieur des agrégats lipidiques très hydrophobes. Ceci correspond bien au caractère hydrophobe de l'intérieur des micelles.

Afin de caractériser l'influence du taux de greffage sur la fluorescence des micelles, nous avons étudié l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité d'azoture utilisé (Figure IV – 15). Les intensités de fluorescence ont été sélectionnées au maximum de chaque courbe, à savoir 545 nm pour le dansyl-N₃ et les réactions de contrôle, 513 nm pour les micelles non polymérisées et 508 nm pour les micelles polymérisées.

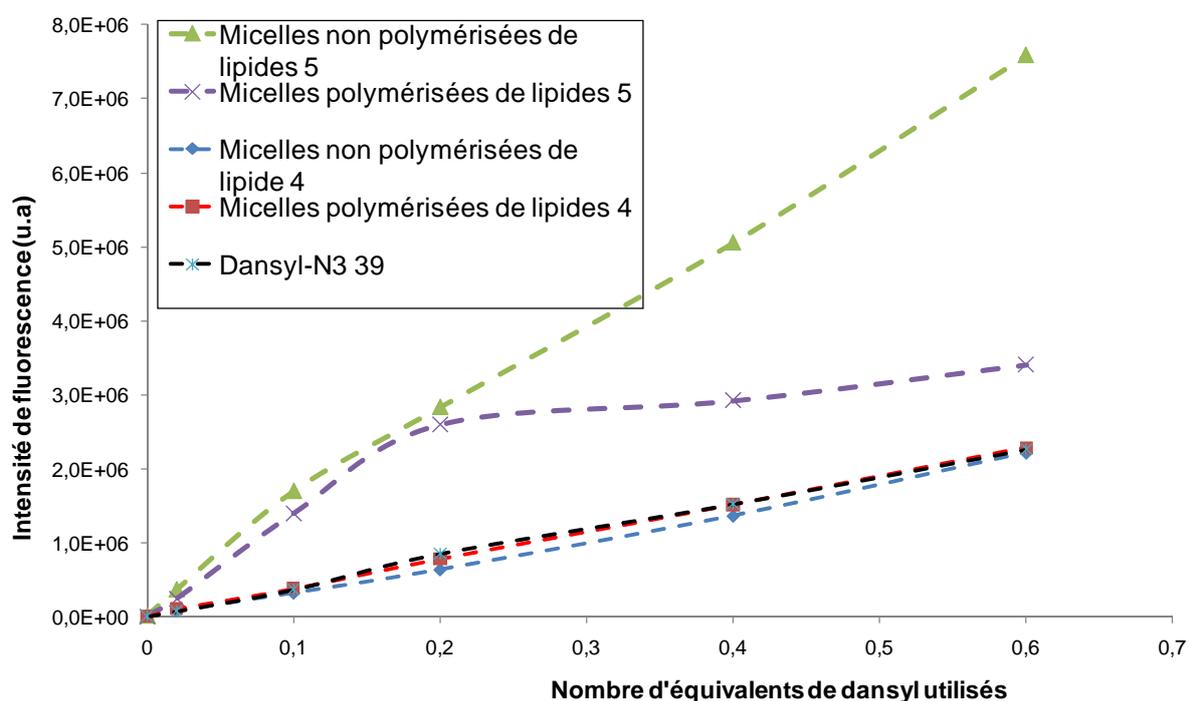


Figure IV – 15 : Intensité de fluorescence des différents échantillons en fonction de la quantité d'azoture dans la solution de Tris pH = 11; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = \text{de } 0 \text{ à } 9,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Premièrement, nous pouvons constater que l'évolution des courbes est différente selon les échantillons. Avec les micelles non polymérisées de lipide **5**, l'intensité de fluorescence

est proportionnelle à la quantité d'azoture **39** impliqué lors de la réaction (courbe verte). En revanche, le comportement des micelles polymérisées est quelque peu différent (courbe bleue). En effet, l'intensité est d'abord proportionnelle avec la quantité de sonde utilisée, jusqu'à une valeur de 20%. Au-delà de cette valeur, l'intensité de fluorescence n'augmente quasiment plus. Une explication pourrait être que dans les micelles polymérisées, les différentes sondes greffées sont très compactées au cœur des micelles provoquant une auto-inhibition de fluorescence. A contrario, dans les micelles non polymérisées, la chaîne lipidique reliée au dansyl greffé est plus flexible et peut éventuellement migrer jusqu'à la couronne hydrophile. Ceci expliquerait également le caractère légèrement plus polaire de l'environnement du dansyl dans les micelles non polymérisées. Dans les expériences de contrôle avec les micelles, polymérisées ou non, de lipide **4**, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'azoture de façon identique au dansyl-N₃ seul en solution. Ceci confirme bien que lorsque la réaction n'a pas lieu, le fluorophore se retrouve de façon homogène en solution.

Nous pouvons noter que les intensités de fluorescence des contrôles réalisés avec le lipide **4** est systématiquement trois fois plus faible environ que dans le cas des micelles fonctionnalisées. Nous avons donc calculé les rendements quantiques des différents composés en utilisant le sulfate de quinine comme référence (Tableau IV – 5).¹²

Entrée	Composés	Solvant	λ_{em} (nm)	Rendement quantique (%)
1	Dansyl-N ₃ 39	EtOH	510	26
2	Dansyl-lipide 44	EtOH	510	27
3	Dansyl-N ₃ 39	Tris	545	5
4	Dansyl-lipide 44	Tris	490	16
5	Micelles non polymérisées fonctionnalisées	Tris	513	15
6	Micelles polymérisées fonctionnalisées	Tris	508	15

Tableau IV – 5 : Rendements quantiques des différents composés

Le dansyl-N₃ **39** et son homologue lipidique **44** ont un rendement quantique dans l'éthanol similaire d'environ 26% (entrées 1 et 2). En solution aqueuse, une nette diminution du rendement quantique est observée pour le dansyl-N₃ **39** avec une valeur de 5% (entrée 3). Ce phénomène est généralement observé pour le dansyl. Le dansyl-lipide **44** a lui un rendement quantique un peu plus élevé de 16% du fait que le dansyl présent au sein des agrégats est préservé de la phase aqueuse. En revanche, lors de la fonctionnalisation interne des micelles, le rendement quantique du fluorophore est d'environ 15% (entrées 5 et 6). Ceci se traduit par une fluorescence trois fois plus importante lorsque la sonde se retrouve au cœur de la micelle que lorsqu'elle est répartie de manière homogène en phase aqueuse. Ce résultat confirme bien que la micelle agit alors un rôle de protection de la sonde fluorescente vis-à-vis de l'eau.

Les différentes analyses suggèrent que la fonctionnalisation par réaction « click » s'effectue bien au cœur des micelles. La capacité de greffage est relativement élevée avec des réactions totales jusqu'à une fonctionnalisation de 60%. A titre de comparaison, nous avons réalisé des tests de solubilisation du dansyl par les micelles, afin d'évaluer l'efficacité du greffage covalent.

IV – 6 : Comparaison entre la fonctionnalisation des micelles par le dansyl-N₃ et la solubilisation du dansyl-N₃ par les micelles

En parallèle de la fonctionnalisation covalente des micelles, nous avons entrepris des tests de solubilisation du dansyl par les micelles. Lors des études précédentes, il a été montré que les micelles avaient la capacité de solubiliser des molécules hydrophobes.¹³ Il nous a paru intéressant de comparer les deux techniques, bien que les conditions ne soient pas tout à fait identiques, notamment au niveau du milieu utilisé, à savoir de la solution de Tris pour la solubilisation et un mélange Tris/*tert*-butanol pour la fonctionnalisation.

IV – 6 – 1 : Etude de solubilisation du dansyl-N₃

De nombreuses techniques permettent la solubilisation de composé par des nano-objets. Parmi elles, nous avons retenu :

- L'agitation mécanique pendant une heure
- La sonication pendant une heure
- L'ultra-sonication pendant 10 minutes

Nous avons utilisé pour toutes les expériences un protocole standard : 10 mg de dansyl-N₃ sont ajoutés à 2 mL d'une solution de micelles, polymérisées ou non, dont la concentration est de 5 mg/mL. Le milieu est alors soit agité par un barreau magnétique, soit soniqué pendant une heure afin de favoriser l'incorporation du dansyl dans les micelles. La solution est ensuite filtrée sur membrane de 0,45 µm ce qui permet d'éliminer l'excès de dansyl non solubilisé. Un dosage de la solution aqueuse obtenue par spectroscopie UV-Visible est réalisé. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dansyl-N₃ solubilisé par rapport à la quantité initialement introduite (Tableau IV – 6).

Méthode de dispersion utilisée	Contrôle (Tris)	Solubilisation par les micelles non polymérisées	Solubilisation par les micelles polymérisées
Sonication au bain (80 W)	1%	4%	3%
Sonde à ultra-sonication (240 W)	2%	10%	8%
Agitation	2%	13%	10%

Tableau IV – 6 : Pourcentage de dansyl-N₃ solubilisé par rapport au dansyl-N₃ initial

Les expériences de contrôle montrent que le dansyl est partiellement soluble dans la solution de Tris car 1 à 2% du composé se retrouve dans la phase aqueuse quelle que soit la technique de solubilisation appliquée. En revanche, lorsque des micelles sont ajoutées, le taux de solubilisation varie selon la technique employée. En effet, alors que la sonication n'a que peu d'effet, l'ultra-sonication permet, quant à elle, une amélioration de la solubilisation. Finalement, le meilleur résultat est obtenu par agitation magnétique où 13% du dansyl-N₃ se retrouve solubilisé par les micelles. De manière générale, les résultats sont un peu plus faibles

avec les micelles polymérisées. Ceci pourrait s'expliquer par une plus grande difficulté de la molécule à venir s'insérer dans la micelle polymérisée. Cette dernière étant beaucoup moins dynamique que la micelle non polymérisée, la solubilisation est donc moins efficace.

IV – 6 – 2 : Comparaison avec la fonctionnalisation covalente

Afin de nous retrouver dans des conditions similaires aux essais de fonctionnalisation, différents tests de solubilisation du dansyl-N₃ par les micelles polymérisées ont été réalisés avec des taux de dansyl-N₃ **39** variables de 0,02 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,40 ; 0,60 et 1,00 équivalents par rapport aux chaînes lipidiques à une concentration de 1 mg/mL en micelles. La quantité de dansyl présent dans les micelles est alors mesurée par spectroscopie UV-Visible puis comparée aux résultats obtenus lors de la fonctionnalisation covalente (Figure IV – 16).

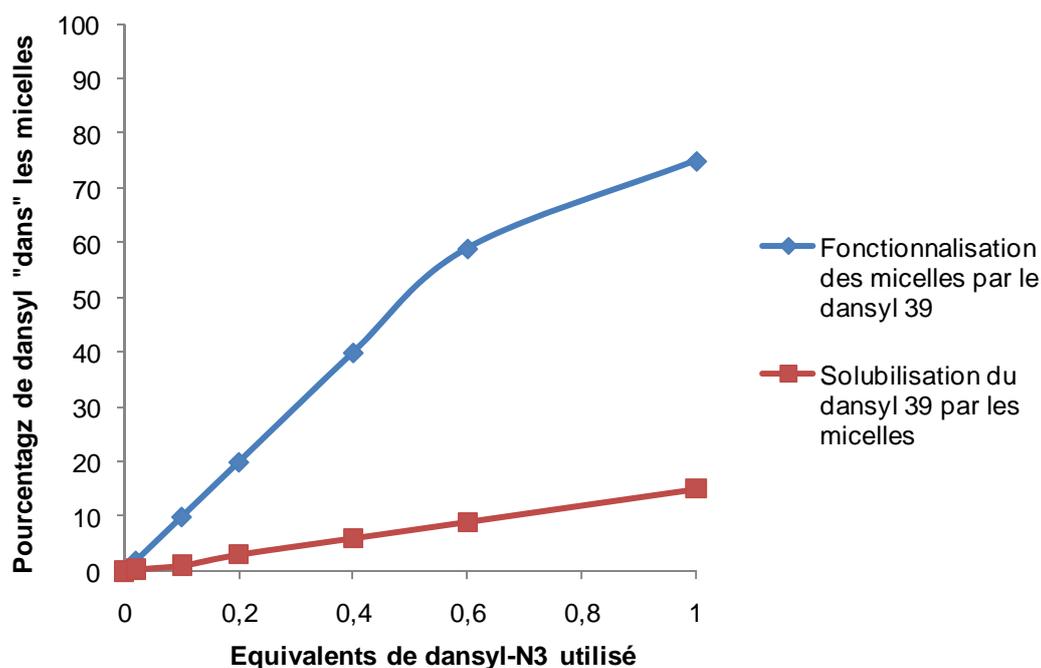


Figure IV – 16 : Efficacité de solubilisation du dansyl dans les micelles en comparaison avec la fonctionnalisation covalente

Dans le cas de la fonctionnalisation covalente, nous avons observé que la réaction était totale jusqu'à une valeur de 0,6 équivalent de dansyl utilisé. Puis, à un équivalent de dansyl par rapport aux chaînes lipidiques, 75% du dansyl se retrouve à l'intérieur des micelles. Dans le cas de la solubilisation, les taux de dansyl présent dans les micelles sont faibles n'excédant pas 13% pour un équivalent de dansyl utilisé.

La fonctionnalisation covalente semble donc plus efficace que l'encapsulation.

Conclusion :

Dans ce chapitre, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la mise au point de la réaction « click » avec le lipide **5**. Pour ce faire, des conditions micro-ondes ont été utilisées. Nous avons par la suite vérifié la stabilité des micelles lors de ces conditions et lors de la purification de l'échantillon. Les micelles sont stables lors de la réaction, mais se désagrègent lors de la purification. Par conséquent, il a fallu adapter les conditions réactionnelles pour que le dansyl soit entièrement consommé. Une étude de fluorescence a suggéré que le dansyl après réaction, était bien présent au cœur des micelles, polymérisées ou non. De plus, les micelles agissent comme agent protecteur de fluorescence en préservant la fluorescence du dansyl en solution aqueuse.

Références bibliographiques du Chapitre IV :

- ¹ Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, Third Edition **2006**, New York.
- ² Holmes-Farley, S. R.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1986**, *2*, 266-281.
- ³ Wang, B.-B.; Zhang, X.; Jia, X.-R.; Li, Z.-C.; Ji, Y.; Yang, L.; Wei, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15180-15194.
- ⁴ Wängler, C.; Moldenhauer, G.; Saffrich, R.; Knapp, E.-M.; Beijer, B.; Schnölzer, M.; Wängler, B.; Eisenhut, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. *Chemistry : a European Journal* **2008**, *14*, 8116-8130.
- ⁵ Rostovtsev, V. V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- ⁶ Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van Der Eycken, E. *Organic Letters* **2004**, *6*, 4223-4225.
- ⁷ Yoon, K.; Goyal, P.; Weck, M. *Organic Letters* **2007**, *9*, 2051-2054.
- ⁸ Perino, A.; Morere, A.; Klymchenko, A.; Contal, E.; Rameau, A.; Guenet, J.-M.; Mely, Y.; Wagner, A. *Macromolecular Rapid Communications*, en préparation.
- ⁹ Contal, E.; Klymchenko, A.; Meunier, S.; Mely, Y.; Wagner, A. *Macromolecules*, soumis
- ¹⁰ Rouessac, F.; Rouessac, A. *Chapitre 8 : Electrophorèse capillaire et électrochromatographie. In Analyse Chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*, Dunod, Ed. **2002**, 527-554.
- ¹¹ Mikkelsen, L. R.; Corton, E. *Chapter 9; Principles of electrophoresis. In Bioanalytical Chemistry*, Wiley, Ed. **2004**, 167-190.
- ¹² Eastman, J. W. *Photochemistry and Photobiology* **1967**, *6*, 55-72.
- ¹³ Thauvin, C.; Rickling, S.; Schultz, P.; Célia, H.; Meunier, S.; Mioskowski, C. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3*, 743-748.

Chapitre V

-

*Diverses applications de la réaction
« click » au cœur de nano-objets
lipidiques*

Le chapitre IV a mis en évidence la fonctionnalisation au sein du cœur hydrophobe de micelles par une sonde fluorescente. Nous allons à présent présenter diverses applications de cette méthodologie de fonctionnalisation interne pour réaliser un double greffage des micelles polymérisées, puis le greffage de nanoparticules d'or dans les micelles et enfin la fonctionnalisation interne des CLP

V – 1 : Double greffage interne des micelles

Le chapitre IV a mis en évidence la fonctionnalisation au cœur des micelles à l'aide de la réaction « click ». Des micelles fluorescentes ont ainsi pu être synthétisées. Différents taux de greffage du dansyl-N₃ **39** par rapport aux chaînes lipidiques ont été envisagés et une consommation totale de la sonde a été possible jusqu'à 0,6 équivalents. L'objectif est ici de voir s'il est possible d'obtenir des micelles bi-fonctionnelles. Pour cela, deux méthodes différentes seront utilisées (Figure V – 1). La première méthode consiste à greffer séquentiellement au sein de la partie hydrophobe deux molécules différentes. La deuxième méthode consiste quant à elle, à greffer séparément les micelles avec des molécules différentes puis de mélanger les échantillons de micelles. Un équilibre s'opère et des micelles mixtes sont formées. Ces micelles mixtes sont alors bi-fonctionnalisées. Dans la première voie, les chaînes de polymères lipidiques sont fonctionnalisées de manière homogène. En revanche, dans la deuxième méthode, au sein d'une même micelle bi-fonctionnelle, les chaînes de polymères lipidiques sont bien distinctes avec des chaînes où la première molécule est greffée exclusivement et des chaînes où la deuxième molécule est greffée exclusivement.

Afin de valider la double fonctionnalisation, les propriétés de fluorescence du dansyl ont été mises à profit. En effet, en présence de certaines molécules, appelées inhibiteurs de fluorescence, un fluorophore perd tout ou une partie de sa fluorescence. Dans une première partie, nous vérifierons l'inhibition de fluorescence en solution aqueuse. Puis, nous appliquerons la méthode de fonctionnalisation développée au chapitre IV pour vérifier que cette molécule d'inhibition de fluorescence est bien greffée aux micelles, pour ensuite réaliser les tests de double fonctionnalisation séquentielle. Enfin, les tests de formation de micelles mixtes seront envisagés. Auparavant, des notions sur le FRET et l'inhibition de fluorescence seront abordées.

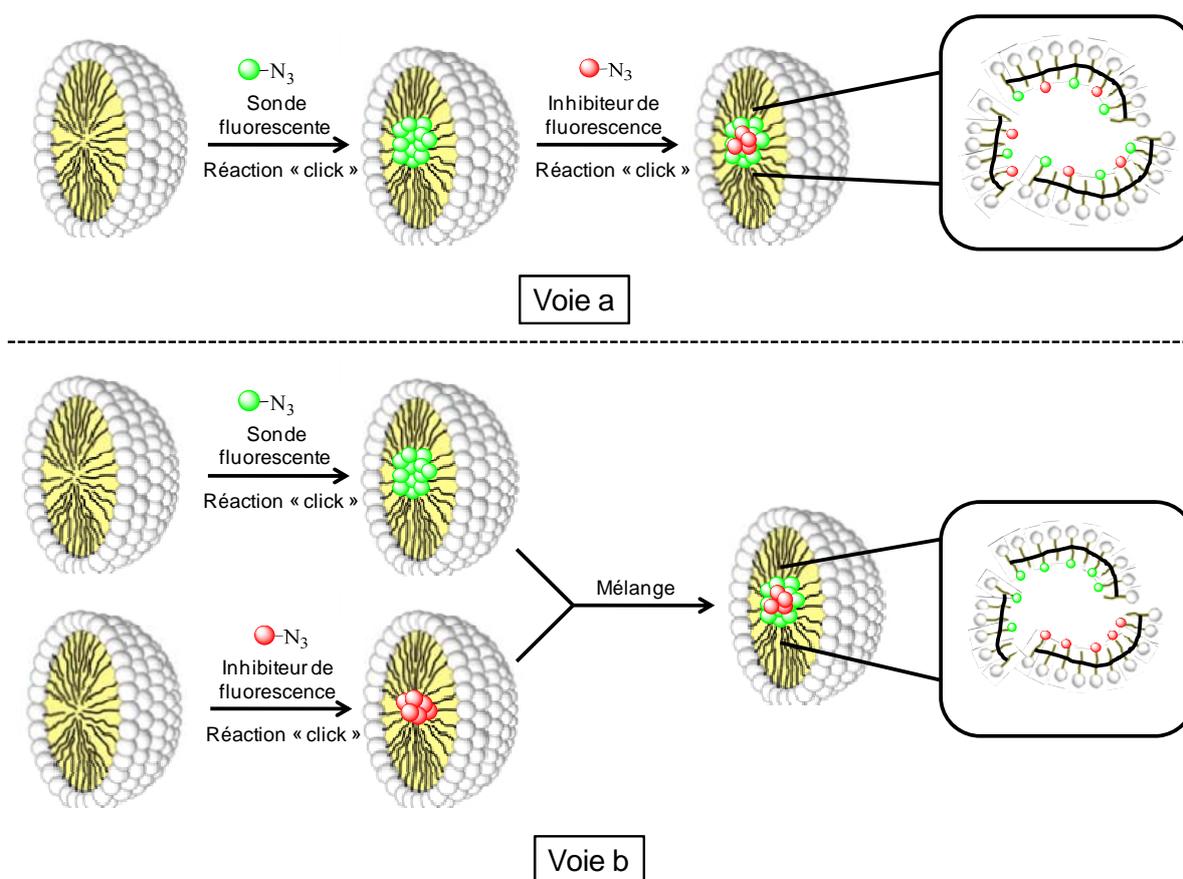


Figure V – 1 : Synthèses de micelles polymérisées bi-fonctionnelles

Dans le chapitre IV, les analyses ont révélées que le taux maximal de greffage était de 0,6 équivalent lorsqu'une réaction totale était souhaitée. Le premier taux de greffage doit être le plus faible possible tout en permettant une fluorescence suffisante. A ce titre, 0,1 équivalent semble être le meilleur compromis. Une fois, le dansyl greffé au sein des micelles, la réaction « click » sera ensuite effectuée avec la deuxième molécule.

V – 1 – 1 : Présentations du FRET et de la notion d'inhibition de fluorescence

FRET est l'acronyme anglais de "Förster Resonance Energy Transfer". On le traduit généralement en français par transfert d'énergie par résonance de type Förster ou transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. Ce phénomène a été décrit pour la première fois dans

les années 1940¹ et son utilisation ne cesse de croître notamment depuis les années 1980. Il s'agit d'une interaction entre deux molécules provoquant un transfert d'énergie non radiatif entre celles-ci. Cette interaction dipôle-dipôle a lieu entre une molécule émettant de la fluorescence appelée molécule-donneur et une molécule capable d'absorber cette fluorescence appelée molécule-accepteur.²

Le phénomène de FRET est présenté ci-dessous de façon schématique. Le donneur présente une fluorescence caractérisée par une longueur d'onde d'émission λ_{Em1} et une longueur d'onde d'excitation λ_{Ex1} (Figure V – 2, schéma a) et l'accepteur par une fluorescence caractérisée par une longueur d'onde d'émission λ_{Em2} et une longueur d'onde d'excitation λ_{Ex2} (Figure V – 2, schéma b). Lorsque les deux molécules sont mélangées (Figure V – 2, schéma c), du FRET peut avoir lieu s'il y a recouvrement des spectres et dans ce cas, lorsque le donneur est excité, c'est l'accepteur qui émet la fluorescence (Figure V – 2, schéma d).

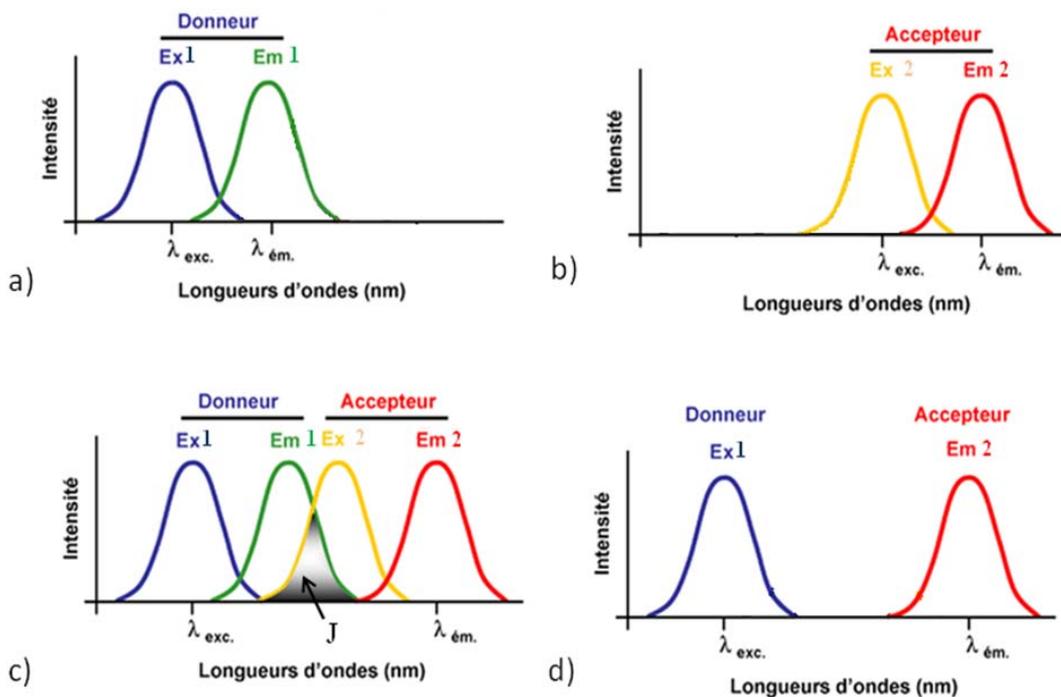


Figure V – 2 : Principe du FRET

Ce phénomène physique dépend principalement de :

- L'orientation relative des moments dipolaires des deux molécules
- La compatibilité énergétique entre les molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption

de l'accepteur. Ce recouvrement des spectres est défini par une intégrale appelée intégrale de recouvrement $J(\lambda)$:

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

où f_D est l'intensité de la fluorescence normalisée émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et ϵ_A le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

- La distance séparant les deux molécules, donneur et accepteur, comme le montre la formule suivante :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

où E est l'efficacité de FRET, R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance donneur - accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%. L'expression mathématique pour le calcul de cette distance s'écrit :

$$R_0^6 = \frac{9 Q_0 (\ln 10) \kappa^2 J}{128 \pi^5 n^4 N_A}$$

où Q_0 est le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur, κ^2 le facteur d'orientation des deux molécules, J le facteur de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu, et N_A le nombre d'Avogadro. κ^2 est généralement assimilé à 2/3 lorsque l'on considère que les molécules sont alignées de façon aléatoire entre elles. Cette distance R_0 est généralement inférieure à 20 nm mais dépend de chaque couple donneur-accepteur.

De très nombreuses revues traitent de ce phénomène notamment en science des matériaux, en biochimie ou en biologie moléculaire.^{3,4,5,6}

Le phénomène d'inhibition de fluorescence, ou « quenching » en anglais, est une diminution du rendement quantique d'un fluorophore. Il existe deux types d'inhibition de fluorescence⁷ :

- L'inhibition dynamique, basée sur des interactions transitoires des états excités, soit par FRET soit par formation d'excimères qui sont des dimères à l'état excité.
- L'inhibition statique par « self-quenching » lorsqu'une forte densité de fluorophores est présent dans un lieu confiné.

L'inhibition de fluorescence par FRET est basée sur le fait que l'accepteur ne réémet pas la fluorescence émise par le donneur (Figure V – 3). Le donneur est excité ce qui provoque une émission de fluorescence que le donneur absorbe (Figure V – 3, a). Ce dernier ne réémettant pas de fluorescence, au final, la fluorescence est donc diminuée voire éteinte (Figure V – 3, b).

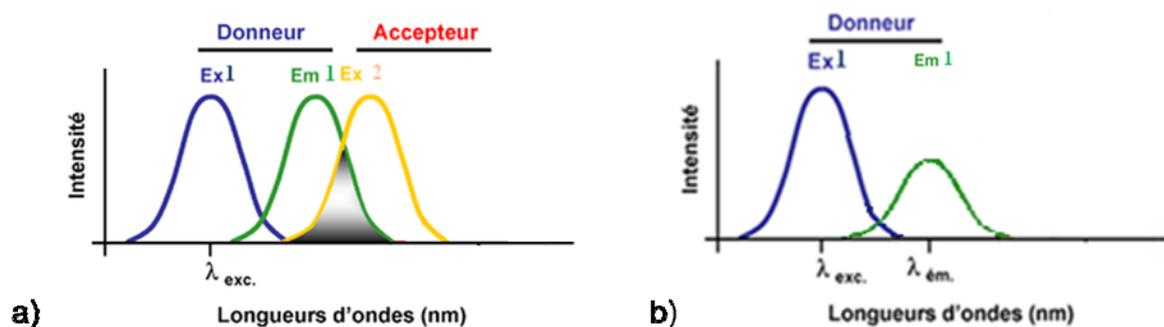


Figure V – 3 : Principe de l'inhibition de fluorescence

De très nombreuses études ont été effectuées sur l'inhibition de fluorescence. Concernant le dansyl, ce phénomène a été utilisé récemment avec des groupements de type azobenzène, les plus connus étant les groupements 4-(diméthylamino)azobenzène-4'-sulfonyle et l'acide 4-[4-(diméthylamino)phenylazo]benzoïque plus connus sous les acronymes de dabsyl et dabcyL. Ce couple dansyl/azobenzène a été employé en catalyse organique, lors de screening de nouvelles réactions,^{8,9,10} ou pour le criblage de ligands du cuivre pour la réaction « click ».¹¹

Pour notre étude, le dabsyl a été choisi comme molécule d'inhibition de fluorescence pour sa capacité à diminuer la fluorescence du dansyl par FRET et son accès synthétique aisé. Lorsque cette molécule sera greffée dans le cœur hydrophobe de la micelle, elle devrait être à

proximité des fluorophores également greffés et donc une diminution du signal de fluorescence devrait se produire.

V – 1 – 2 : Inhibition de fluorescence en solution

Dans un premier temps, nous avons synthétisé la molécule de dabsyl possédant un azoture qui sera utilisée lors de la réaction « click » au cœur des micelles (Schéma V – 4).

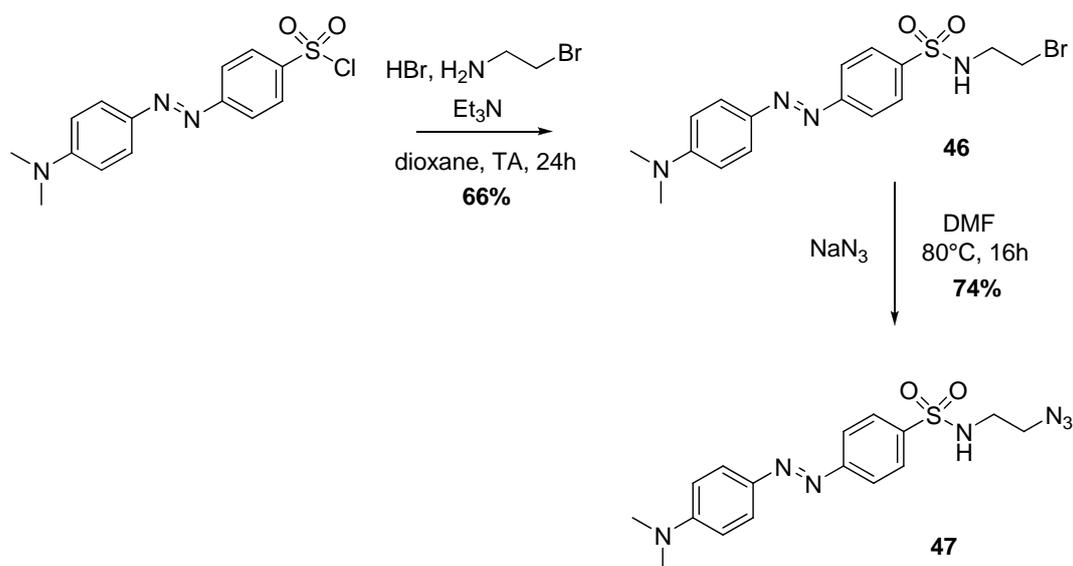


Schéma V – 4 : Synthèse de l'azoture de dabsyl ou dabsyl- N_3

L'analyse par spectroscopie UV-Visible du composé **47** a alors été réalisée. Le maximum d'absorption est à 445 nm. Le recouvrement des spectres d'émission de fluorescence du dansyl et d'absorption du dabsyl a par la suite été vérifié (Figure V – 5).

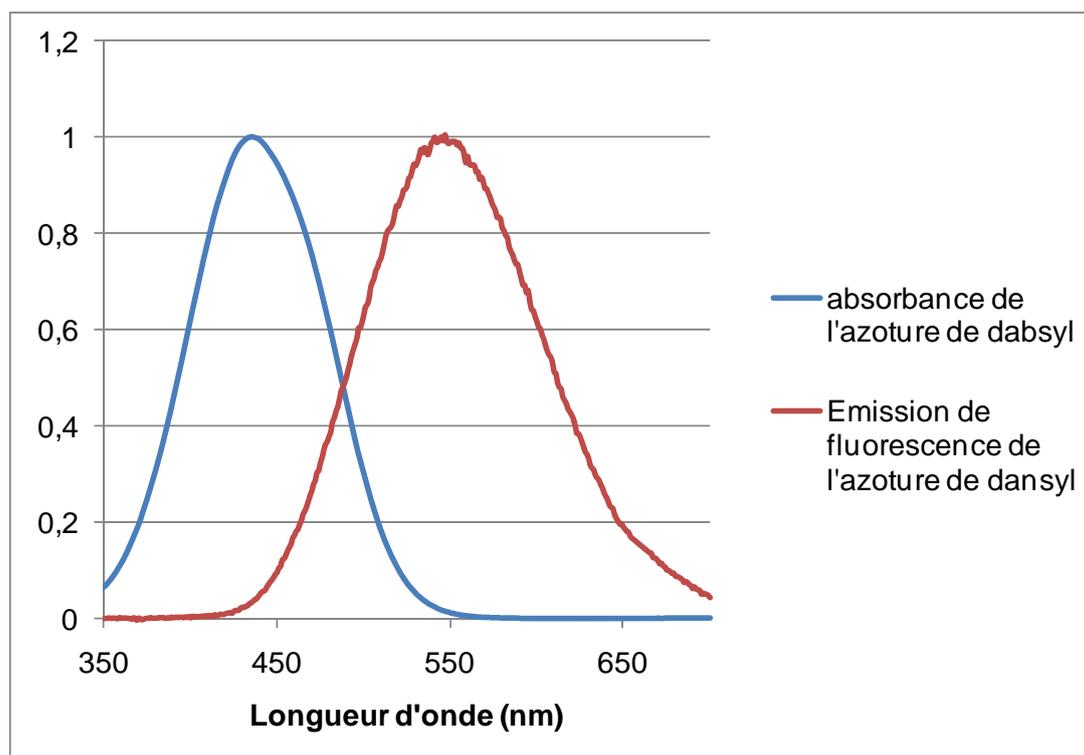


Figure V – 5 : Spectres normalisés d'émission de fluorescence du dansyl-N₃ et d'absorption du dabsyl-N₃

Les deux spectres se recouvrent bien entre 430 nm et 550 nm. La première condition d'inhibition de fluorescence est donc remplie.

Nous avons ensuite testé l'inhibition de fluorescence du dansyl avec le dabsyl en solution. Pour ce faire, les deux azotures correspondant ont été mélangés dans une solution de Tris pH = 11 à différents ratios. 10 µL d'une solution mère de dansyl-N₃ dans le *tert*-butanol à 10 mg/mL sont ajoutés à 500 µL d'une solution de Tris à pH = 11. Du fait de la très faible solubilité du dabsyl, une solution mère de ce composé a été réalisée dans le DMSO à 150 mg/mL et des quantités croissantes de cette solution ont été ajoutées à la solution aqueuse de dansyl (de 0 µL à 150 µL) correspondant à des valeurs allant de 0 à 80 équivalents. Les solutions sont complétées à 1 mL avec la solution de Tris pH = 11. Le dansyl-N₃ **39** est donc à concentration fixe de 0,1 mg/mL et le dabsyl-N₃ a une concentration variable. Les échantillons sont dilués 20 fois dans la solution de Tris et analysés par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm (Figure V – 6).

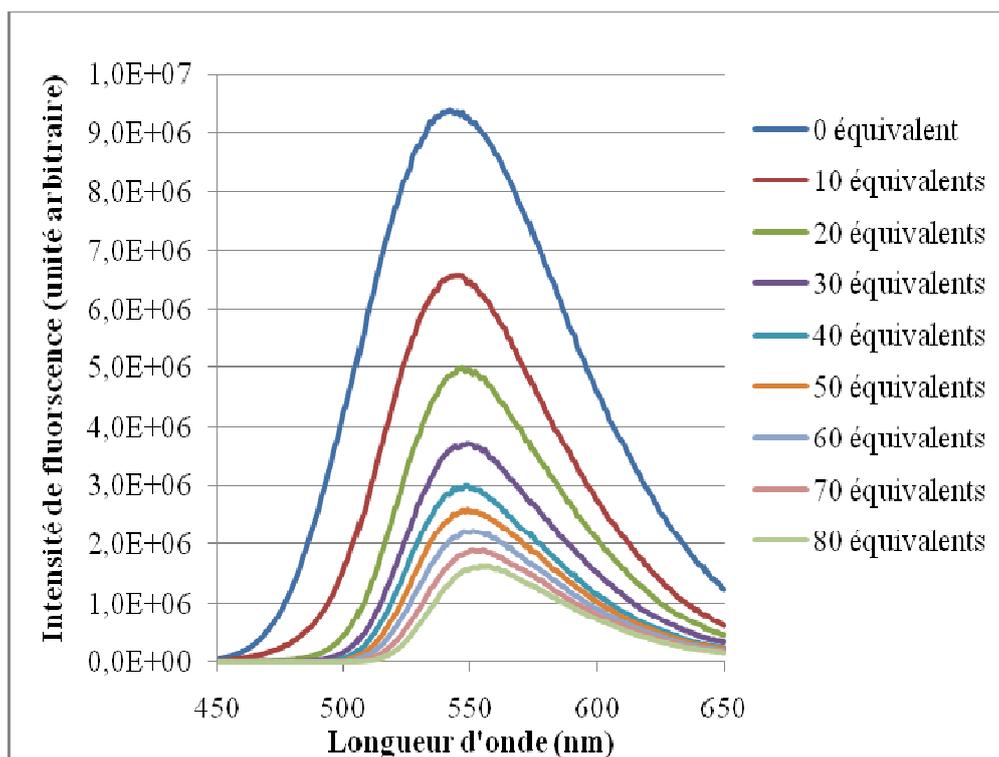


Figure V – 6 : Extinction de fluorescence du dansyl-N₃

par le dansyl-N₃ dans la solution de Tris pH =11 ; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Une diminution de la fluorescence est observée lorsque le dansyl est rajouté. Un phénomène d'extinction de fluorescence a donc bien lieu. Par exemple, lorsque 10 équivalents de dansyl sont ajoutés, le signal est diminué de 30 % et lorsque 30 équivalents sont ajoutés, le signal est diminué de 60%.

Comme le montre la Figure V – 7, cette inhibition de fluorescence suit la relation de Stern-Volmer :

$$I / I_0 = 1 + K [Q]$$

où I_0 est l'intensité de fluorescence sans inhibiteur, I l'intensité de fluorescence et $[Q]$ la concentration en inhibiteur.

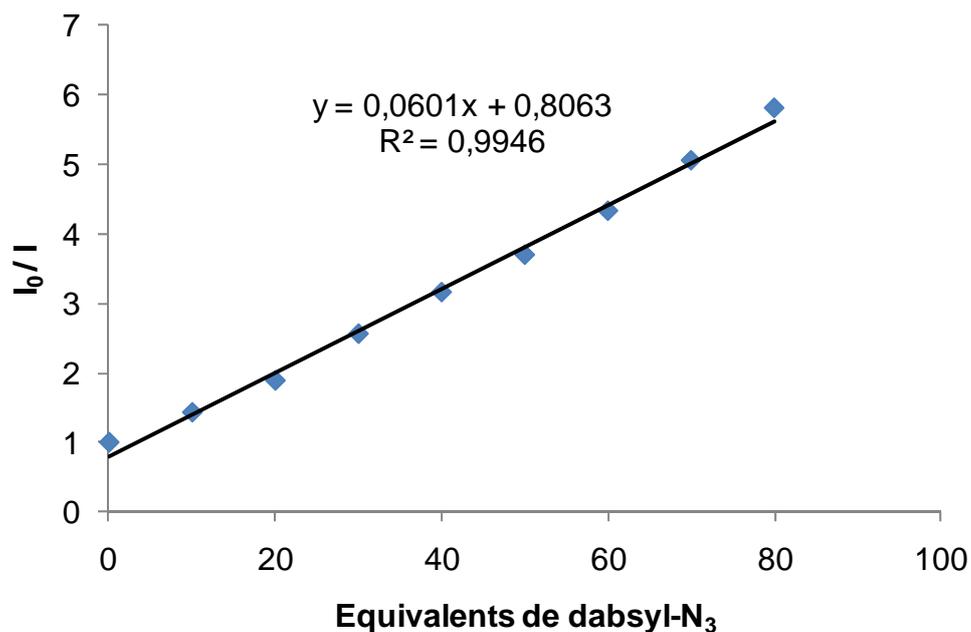


Figure V – 7 : Inhibition de fluorescence du dansyl-N₃ en solution aqueuse ;
 $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Nous avons représenté le rapport des intensités de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents d'inhibiteur de fluorescence. La valeur de la pente donne directement le nombre de fluorophores qu'une molécule inhibitrice peut « quencher ». Dans notre cas, il faut 16 à 17 molécules (i.e. $1/0,0601$) de dansyl-N₃ pour inhiber une molécule de dansyl-N₃.

V – 1 – 3 : Inhibition de fluorescence dans les micelles

V – 1 – 3 – 1 : Réaction « click » avec l'azoture de dansyl dans les micelles non polymérisées

Une fois l'inhibition de fluorescence vérifiée en solution, l'étape suivante consiste donc à réaliser cette inhibition au sein des micelles non polymérisées de lipide alcyne-9,9-malonate **5**. D'après les résultats du chapitre IV, nous savons que la sonde fluorescente est greffée à l'intérieur des micelles. Le greffage de 0,1 équivalent de dansyl-N₃ a donc ici été réalisé afin de vérifier que, dans les mêmes conditions, la réaction « click » avait bien lieu avec ce chromophore. La réaction a donc été effectuée à une concentration en micelle de 1 mg/mL avec 0,1 équivalent de dansyl-N₃ et sous irradiation micro-ondes pendant 10 minutes à 80°C dans un mélange solution *tert*-butanol/Tris. Le même mode opératoire d'extraction d'azoture en excès que celui décrit dans le chapitre IV (Figure IV – 7) a été utilisé. La

solution aqueuse contenant les micelles est devenue UV-active vers 450 nm de par la présence du dansyl, la phase organique 1 contenant éventuellement du dansyl n'ayant pas réagi est devenue quasi incolore et la RMN de la phase organique 2 contenant les micelles montre la présence du greffage sur la chaîne lipidique. Cette absence d'azoture résiduel dans la phase organique 1 (Figure IV – 7) indique une consommation totale de l'azoture lors de la réaction de greffage dans les micelles de lipide 5.

La fonctionnalisation au sein du cœur hydrophobe de la micelle a donc bien lieu avec les deux molécules séparément. La double fonctionnalisation peut donc maintenant être réalisée.

V – 1 – 3 – 2 : Double fonctionnalisation séquentielle des micelles

La réaction « click » est en premier lieu effectuée avec le dansyl (0,1 équivalent par rapport aux chaînes lipidiques) au sein des micelles, à une concentration de 1 mg/mL en micelles dans le mélange *tert*-butanol/Tris. Le milieu réactionnel est alors fractionné, et sur chaque échantillon une deuxième réaction « click » est ensuite effectuée avec le dansyl à différents ratios (par rapport au dansyl). Chaque milieu réactionnel est ensuite analysé par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm (Figure V – 8). Au préalable, nous avons vérifié que le dansyl en solution ne parvenait pas à inhiber la fluorescence du dansyl présent dans les micelles.

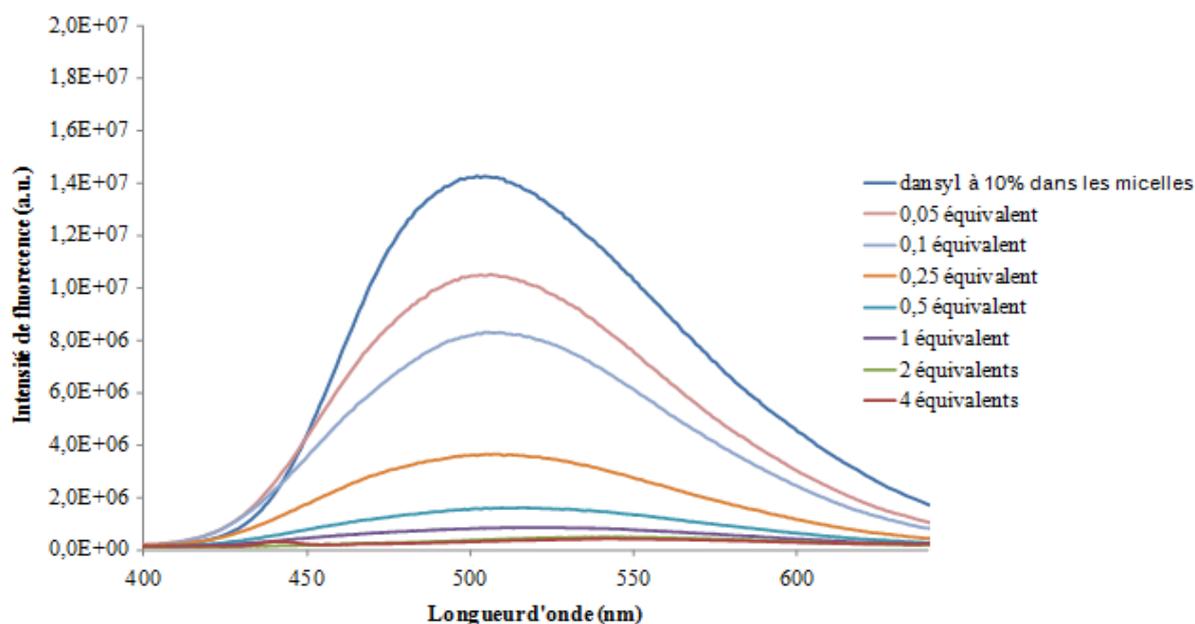


Figure V – 8 : Extinction de fluorescence du dansyl- N_3 par le dansyl- N_3 au sein des micelles ; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

La fluorescence diminue rapidement pour conduire à une extinction de fluorescence de 97% avec un équivalent de dabsyl-N₃ par rapport au dansyl-N₃. L'analyse de ces données montre une grande différence de comportement dans le cas des micelles par rapport à l'inhibition de fluorescence en solution car en solution 80 équivalents ne suffisaient pas à faire disparaître la totalité de la fluorescence. Cette valeur de un équivalent correspond à un taux de greffage de 10% par rapport aux micelles. Ceci est dû au fait que dans cette double fonctionnalisation, les molécules greffées sont très proches.

On peut obtenir une valeur indicative de la distance entre le dansyl et le dabsyl au sein de la micelle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'efficacité de l'extinction de fluorescence est fonction de la distance entre les deux molécules :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

Dans notre cas, la distance entre le donneur (dansyl) et l'accepteur (dabsyl) devrait être inférieure au rayon de Förster R₀, dont la valeur est de 3,3 nm¹² (valeur trouvée pour le couple EDANS—dabsyl). L'efficacité d'extinction de fluorescence étant de 97%, nous obtenons une valeur indicative de la distance moyenne entre les molécules de 1,8 nm. Or, en regardant plus précisément, nous nous apercevons que, dans les 3% de fluorescence restant, le pic de fluorescence s'est décalé vers 540 nm, signifiant qu'il s'agit en partie des traces de dansyl n'ayant pas réagi. On peut donc considérer que dans les micelles, l'efficacité d'inhibition de fluorescence est de l'ordre 98-99%, ce qui donne une distance encore plus faible de 1,5-1,7 nm. Les molécules de dabsyl seraient en moyenne à une distance de 1,8 nm de toutes les sondes fluorescentes présentes dans la micelle. Nos micelles mesurant 6,0 nm de diamètre, ceci appuie bien l'hypothèse que les deux fonctionnalisations ont lieu au cœur des micelles lipidiques.

L'inhibition de fluorescence est donc beaucoup plus efficace dans le cas d'un greffage au sein des micelles qu'en solution aqueuse. Ceci s'explique premièrement par le fait que le donneur et l'accepteur sont confinés au cœur de la micelle après le greffage covalent. Ils se retrouvent par conséquent à une distance très proche l'un de l'autre ce qui favorise le phénomène de transfert d'énergie. De plus, le recouvrement des spectres est meilleur lorsque le dansyl et le dabsyl sont greffés au sein de la micelle (Figure V – 9).

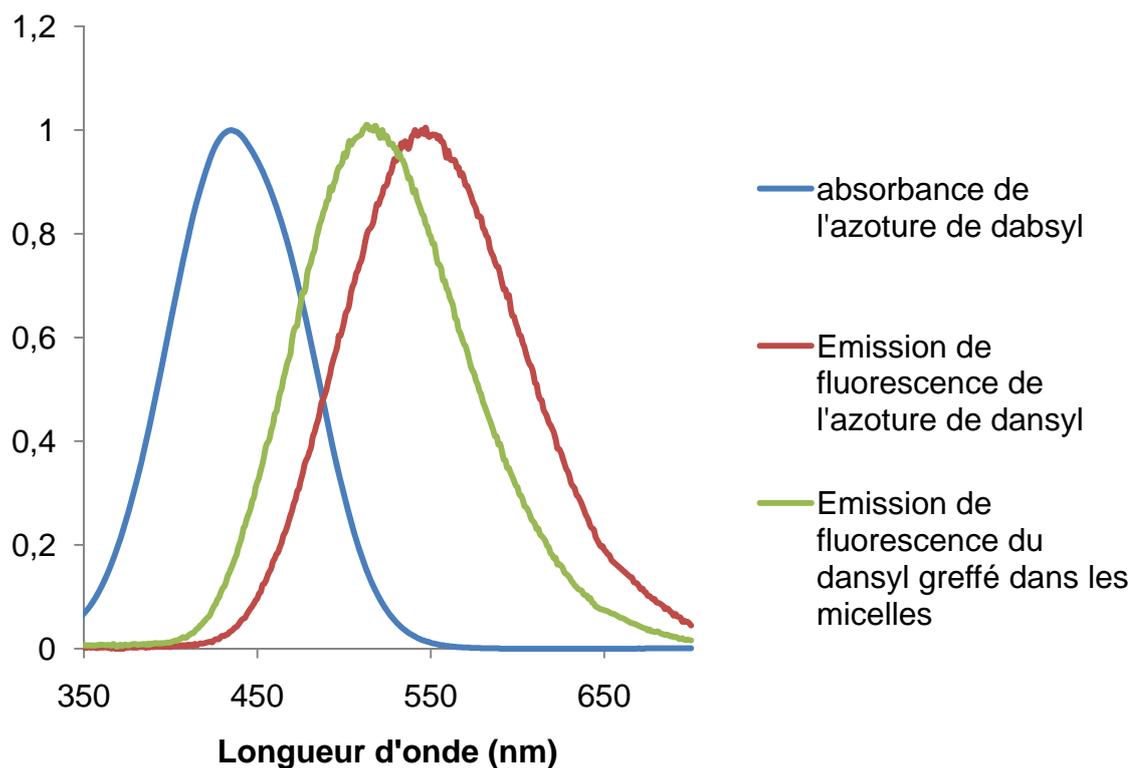


Figure V – 9 : Spectres normalisés d'émission de fluorescence du dansyl et d'absorption de l'azoture de dabsyl. $\lambda_{exc.} = 330 \text{ nm}$.

En effet, après greffage, le spectre d'émission de fluorescence du dansyl est modifié et le maximum passe de 545 nm à 520 nm ce qui le rapproche du spectre d'absorption du dabsyl. De par ces deux phénomènes, l'efficacité d'inhibition de fluorescence est largement améliorée dans les micelles.

V – 1 – 4 : Inhibition de fluorescence dans les micelles polymérisées

La même expérience a été effectuée avec cette fois-ci des micelles polymérisées. Le dansyl est toujours greffé à 10% à l'intérieur des micelles puis des quantités variables de dabsyl sont greffées lors d'une deuxième étape. Le milieu réactionnel est ensuite analysé par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm (Figure V – 10).

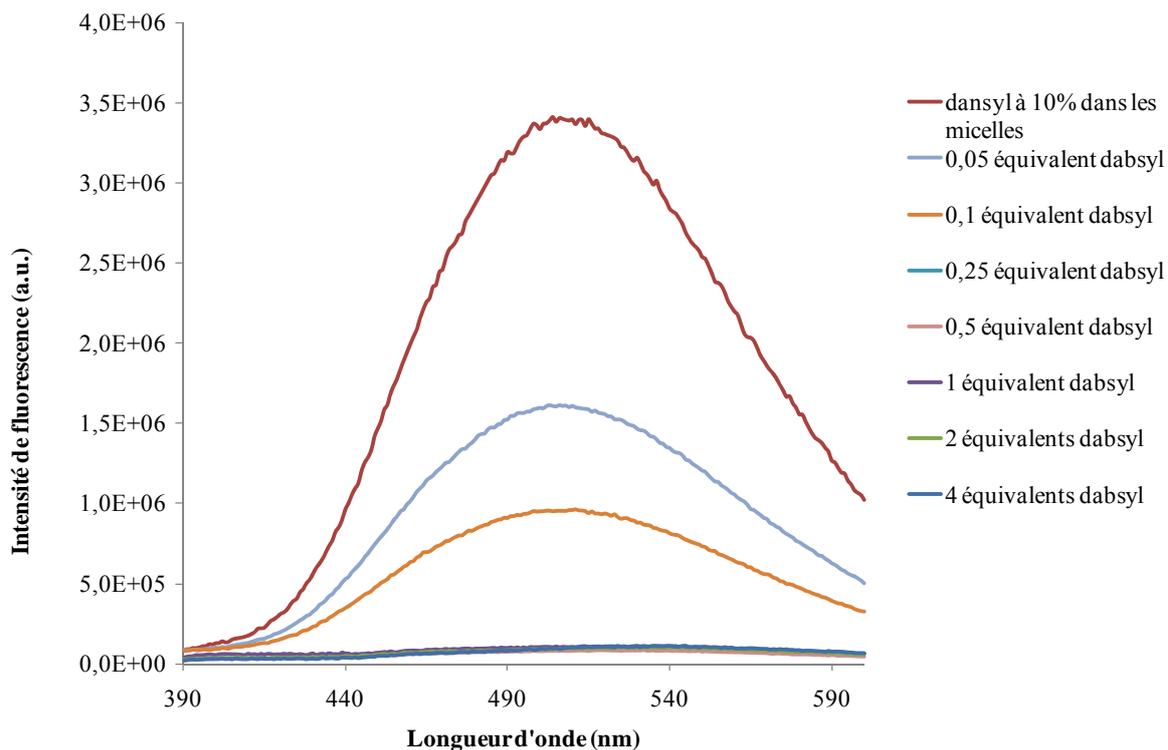


Figure V – 10 : Inhibition de fluorescence dansyl- N_3 par

le dabsyl- N_3 au sein des micelles polymérisées ; $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$; $C = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Le même phénomène que précédemment est observé : une inhibition très rapide de fluorescence a lieu. Cependant le phénomène est ici amplifié et il ne faut que 0,25 équivalent de dabsyl par rapport au dansyl pour éteindre complètement la fluorescence du dansyl au sein des micelles polymérisées. Cette valeur correspond à un greffage de 5 molécules de dabsyl par micelle, une micelle comprenant environ 230 molécules de lipide d'après les expériences réalisées pour le calcul des CMC (cf : Chapitre 3, Paragraphe III – 3 – 4 – 3). Cette valeur est beaucoup plus faible que celle obtenue précédemment pour les micelles non polymérisées. Dans le cas des micelles polymérisées, il suffit de 5 molécules de dabsyl pour inhiber 98% de la fluorescence contenue dans la micelle. En appliquant les mêmes calculs que précédemment, on peut avoir une idée de la distance moyenne entre tous les fluorophores et les 5 molécules de dabsyl, qui est alors de 1,8 nm. Nous pouvons donc conclure que lorsque les micelles sont polymérisées, les molécules sont mieux confinées dans le cœur hydrophobe.

V – 1 – 5 : Etude des échanges inter-micelles par inhibition de fluorescence

Afin d'étudier les échanges entre les micelles, polymérisées ou non, l'inhibition de fluorescence entre le dansyl et le dabsyl observée précédemment a été utilisée.

Différents tests ont été réalisés : le dansyl est tout d'abord greffé à 0,1 équivalent dans les micelles puis 0,1 équivalent de dabsyl (un équivalent par rapport au dansyl) est soit greffé comme précédemment, soit simplement mis en solution. Les deux mêmes expériences ont été réalisées avec le dansyl en solution. Des micelles greffées séparément par le dabsyl et par le dansyl dont les concentrations en micelles sont de 1 mg/mL ont également été mélangées. Les analyses par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm réalisées une heure après le mélange ont montré que le dansyl en solution n'était jamais « quenché ». Les autres résultats sont présentés dans la Figure V – 11.

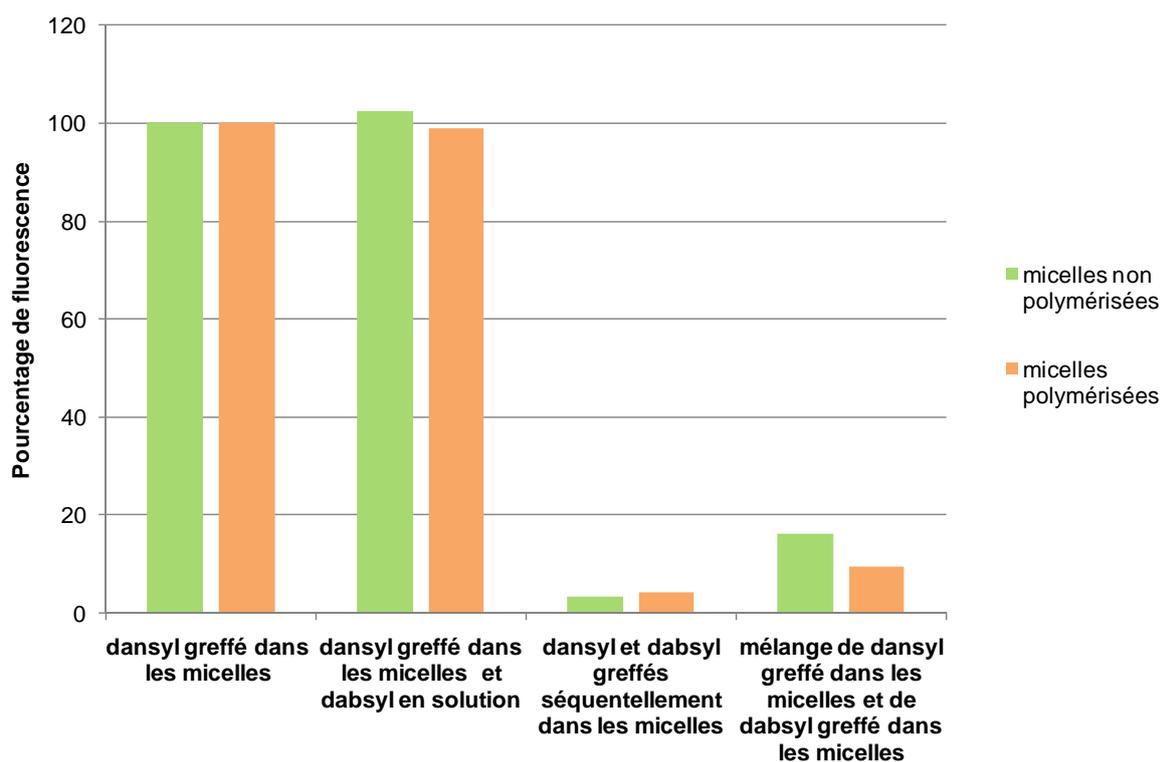


Figure V – 11 : Différents cas d'inhibition de fluorescence pour les micelles

Les résultats obtenus pour les micelles non polymérisées et les micelles polymérisées sont similaires. Le dansyl greffé à 0,1 équivalent dans les micelles sert de référence. Dans les deux cas (micelles polymérisées ou non), la fluorescence du dansyl est intacte lorsque le

dabsyl est en solution. Dans le cas où le dabsyl est lui aussi greffé, il y a inhibition de fluorescence quasi-complète (97%) comme nous l'avons montré précédemment. Lorsque des micelles de dansyl et des micelles de dabsyl sont mélangées en solution aqueuse, l'inhibition de fluorescence a lieu également de façon importante (83% pour les micelles non polymérisées et 91% pour les micelles polymérisées).

Lorsque le dabsyl est en solution, il n'arrive pas à pénétrer pas à l'intérieur des micelles et est alors trop éloigné du dansyl pour pouvoir absorber son rayonnement. De ce fait, l'inhibition de fluorescence ne se produit pas. Lorsque les micelles non polymérisées et fonctionnalisées séparément sont mélangées, des échanges entre chaînes lipidiques interviennent afin d'obtenir des micelles mixtes qui possèdent à la fois le dansyl et le dabsyl. Par les mêmes calculs que précédemment, on peut donc estimer que les fluorophores et les molécules inhibitrices sont à une distance moyenne de 2,5 nm, valeur plus élevée que celle obtenue de 1,8 nm dans le cas de la double fonctionnalisation des micelles non polymérisées. Le même phénomène est observé pour les micelles polymérisées avec une valeur d'inhibition de fluorescence légèrement plus faible de 9%. Ceci donne une distance moyenne de 2,2 nm. Malgré la polymérisation des micelles, la dynamique des micelles ne semble donc pas être altérée et des échanges entre micelles ont lieu. La plus faible efficacité de l'inhibition de fluorescence est sans doute due au fait que lors des réarrangements, les molécules de dansyl et de dabsyl n'arrivent pas à être aussi bien confinées que lors de la double fonctionnalisation séquentielle.

Il serait à ce titre intéressant de suivre la cinétique de diffusion des chaînes lipidiques en examinant l'inhibition de fluorescence du dansyl. Ce phénomène peut être extrêmement rapide dans le cas des micelles de tensio-actifs classiques, de l'ordre de quelques milli-secondes.¹³ Cependant, cette cinétique pourrait être ralentie dans le cas des micelles polymérisées, comme c'est le cas des micelles de copolymères dont la valeur est de quelques secondes.¹⁴ Les premiers résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure quant à la cinétique d'échange des chaînes lipidiques.

V – 1 – 6 : Conclusion

Cette étude a permis de révéler qu'une double fonctionnalisation séquentielle au cœur des micelles était possible. De plus, cette étude nous a révélé que l'échange entre micelles polymérisées était possible afin de fournir des micelles mixtes. Afin de former des micelles polymérisées bi-fonctionnelles, les deux approches envisagées sont alors possibles.

Ce phénomène d'échange entre polymères lipidiques pourrait être étudié dans le cas des CLP. En effet, nous avons vu que les CLP semblaient être issus d'un réarrangement des chaînes lipidiques lors de l'extraction. La méthode d'inhibition de fluorescence pourrait être un bon moyen d'étudier la dynamique de ces objets.

V – 2 : Fonctionnalisation interne des micelles par des nanoparticules d'or

Parmi les nombreuses applications des nanoparticules d'or, nous nous sommes intéressés à leur application potentielle comme traceurs d'imagerie et notamment en microscopie électronique. Nous avons alors décidé d'utiliser des nanoparticules d'or pour fonctionnaliser nos micelles lipidiques.

V – 2 – 1 : Synthèse des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont généralement formées par réduction de l'aurochlorate par un agent chimique, en général du citrate ou du NaBH_4 ,¹⁵ en présence de thiol pour transformer le complexe en nanoparticule stabilisée par les ligands soufrés (Figure V – 12). La taille de ces nanoparticules est relativement faible (de 1 à 100 nm) et peut être modulée lors de leur synthèse, notamment par le ratio ligand soufré/complexe aurique.¹⁶

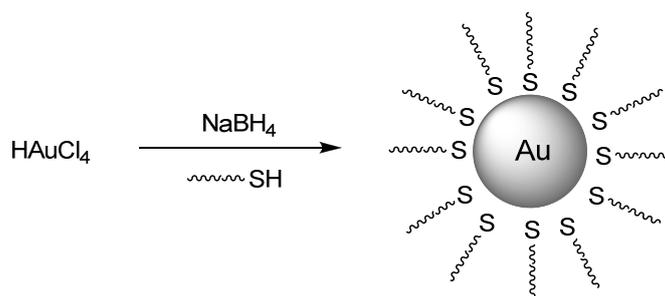


Figure V – 12 : Synthèse de nanoparticule d'or

Cette méthode de formation *in situ* de nanoparticules est relativement aisée à mettre en œuvre ce qui explique notamment son importante utilisation.¹⁷ De nombreux nano-objets ont été utilisés avec des nanoparticules d'or que ce soient des dendrimères,^{18,19} des polymères,²⁰ ou des nanoclusters de porphyrines et de fullerènes.²¹

V – 2 – 2 : Fonctionnalisation des micelles lipidiques

Pour réaliser la fonctionnalisation de nos micelles, des nanoparticules commerciales Nanogold® possédant une fonction NHS à leur surface et dont la taille est de 1,4 nm ont été utilisées. Un motif azoture a été introduit sur ces particules grâce à un lien peptidique. La réaction « click » devrait alors avoir lieu entre la nanoparticule d'or et le cœur de la micelle polymérisée (Figure V – 13).

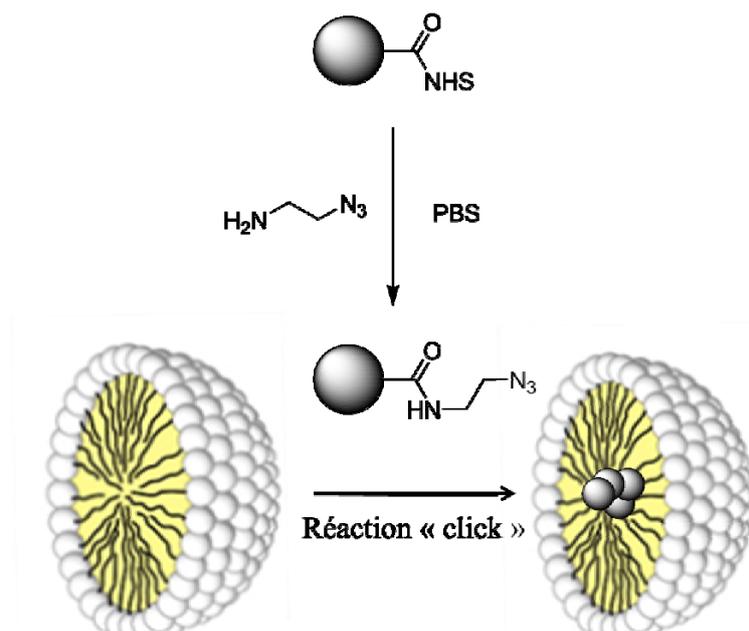


Figure V – 13 : Fonctionnalisation interne des micelles par des nanoparticules d'or

La réaction de greffage s'est effectuée avec une valeur de 0,01 équivalent de nanoparticules d'or. Les nanoparticules ayant un coût relativement élevé, la réaction s'est effectuée avec des quantités très faibles de réactifs. 6 nmol de clusters d'or sont en premier lieu dissouts dans 0,2 mL (protocole du fabricant) et mis à réagir avec l'azidoethylamine. Le milieu réactionnel est alors engagé avec 600 nmol de micelles polymérisées pour fournir un mélange 1/1 *tert*-butanol/PBS de 0,4 mL. La concentration en micelles est alors de 1,5 $\mu\text{mol/L}$, valeur inférieure à la CAC. Après avoir ajouté le cuivre et l'ascorbate de sodium (10% et 20% par rapport aux 6 nmol d'or), le milieu réactionnel est alors placé sous irradiations micro-ondes à 80°C pendant 10 minutes.

La réaction a été effectuée dans les mêmes conditions avec les micelles polymérisées de lipide 10,9-malonate **4** et les micelles polymérisées de lipide alcyne-9,9-malonate **5**. Les clichés de microscopie électronique des différents échantillons sont présentés Figure V – 14.

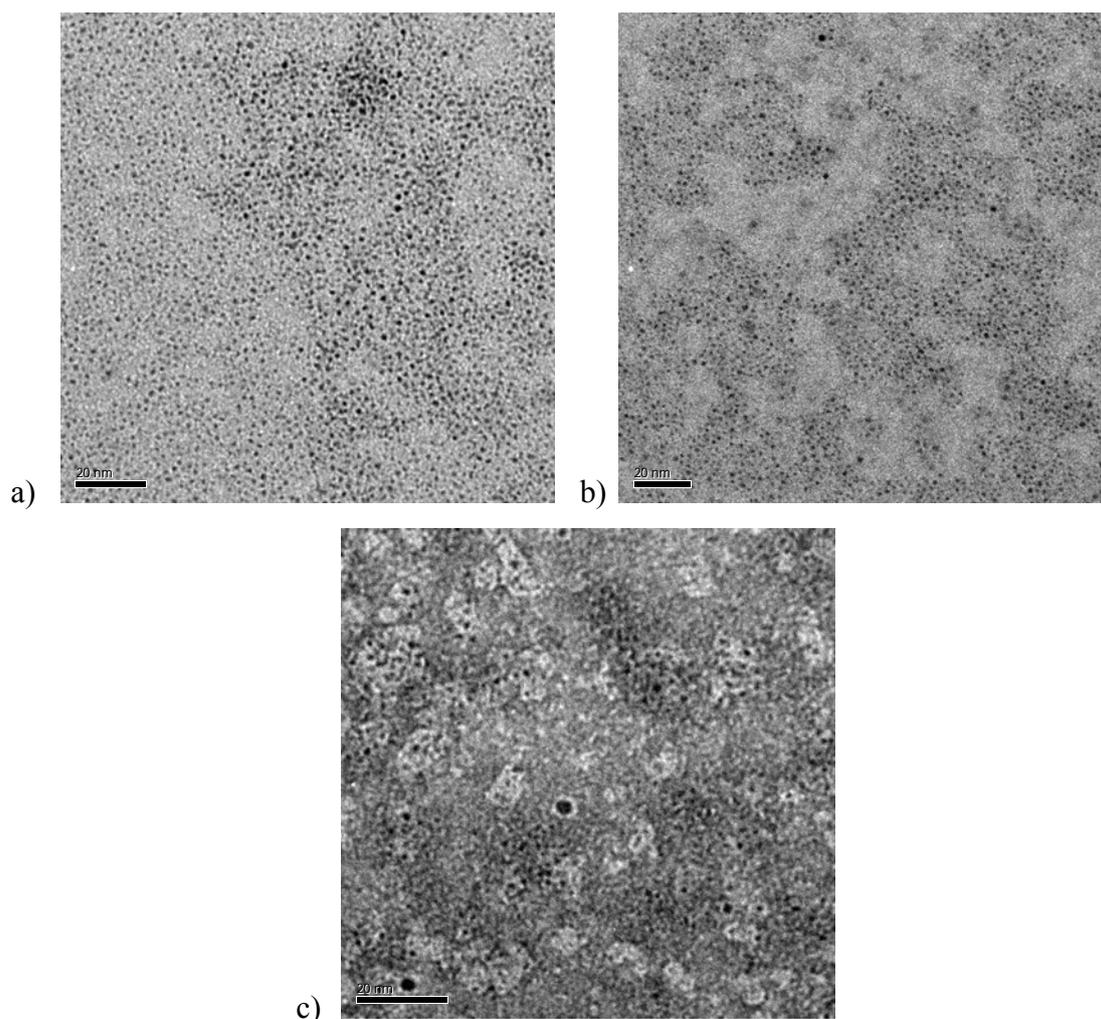


Figure V – 14 : Images MET: a) Nanogold® en solution ; b) Milieu réactionnel avec les micelles de lipide 4 ; c) Milieu réactionnel avec les micelles de lipide 5

Avant fonctionnalisation (Figure V – 14, a), les nanoparticules ont une taille homogène de 1-2 nm en solution et ne s'agrègent pas entre elles lors de l'analyse. Lorsque l'on mélange les nanoparticules et des micelles polymérisées de lipide 10,9-malonate **4**, nous pouvons remarquer que la taille des nanoparticules n'a pas évolué et que la dispersion de ces dernières est relativement homogène (Figure V – 14, b). Il semble qu'il n'y ait pas d'encapsulation de ces nanoparticules par les micelles. En revanche, lorsque la réaction se déroule avec des micelles polymérisées de lipide alcyne-9,9-malonate **5**, des nanoparticules de taille plus élevée semblent apparaître au cœur des micelles (Figure V – 14, c). La fonctionnalisation interne des micelles implique une concentration locale plus élevée des nanoparticules et donc l'augmentation de la taille perçue. Il est à noter que bien qu'étant en dessous de la CAC lors de la réaction, des micelles semblent se distinguer sur les clichés de microscopie. Ceci est sans doute à une réorganisation des chaînes de polymères lors de

l'analyse. Cependant, bien que la réaction implique seulement 1% molaire de nanoparticules par rapport aux chaînes lipidiques, il semble que la réaction ne soit pas totale et que des particules soient encore en solution.

Ces tests sembleraient indiquer que la fonctionnalisation des micelles lipidiques par les nanoparticules d'or ait eu lieu. Cependant, la difficulté d'observation ainsi que les très faibles concentrations utilisées obligent à réaliser d'autres tests afin de, soit purifier l'échantillon, soit adapter les conditions réactionnelles.

V – 3 : Fonctionnalisation interne des CLP avec le dansyl

Il a été démontré précédemment qu'un greffage interne de la micelle était possible par réaction « click » dans le cœur hydrophobe des micelles. De ce fait, il est maintenant envisageable de réaliser une fonctionnalisation covalente au sein de la partie hydrophobe des CLP (Figure V – 15). L'azoture restera le dansyl **39** utilisé jusqu'à présent.

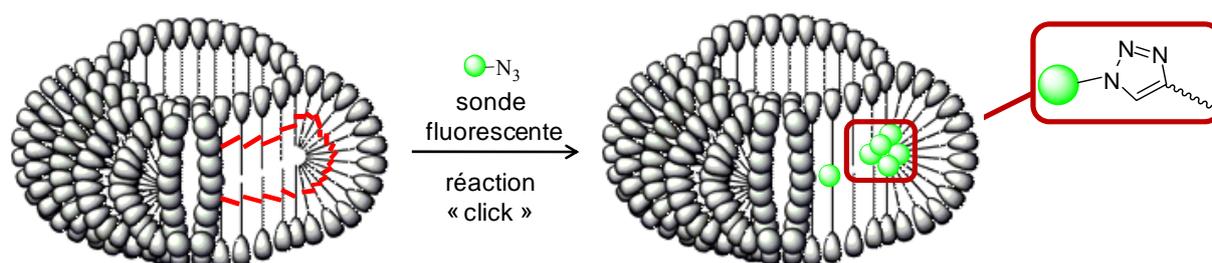


Figure V – 15 : Fonctionnalisation interne des CLP par l'azoture de dansyl.

V – 3 – 1 : Formation des CLP

La première étape consiste à synthétiser les CLP qui seront soumis à la réaction de fonctionnalisation interne par la suite. Comme lors de l'étude des micelles, les CLP-alcyne permettront de réaliser le greffage covalent avec la sonde alors que les CLP-CH₃ serviront d'échantillons de contrôle. En utilisant le protocole décrit au chapitre III, un lot de CLP-alcyne et un lot de CLP-CH₃ ont été synthétisés. Le mode opératoire est le suivant : 20 mg de lipide (alcyne ou CH₃) sont dissous dans 4 mL de Tris pH = 11 (5 mg/mL) par sonication au bain à ultra-sons pendant 30 min. A cette solution de micelles sont ajoutés 200 mg de MWNTs n-Tec (rapport massique lipide/ nanotubes de 1/10) et le mélange est soniqué au bain durant 30 min puis polymérisé sous irradiation UV durant 10 heures. Après 3 cycles de

purification par centrifugation à 14250*g de 10 minutes, des nanotubes recouverts d'anneaux sont obtenus. 8mL de Tris sont rajoutés au culot contenant les nanotubes recouverts et des lots de 2 mL, auxquels 2 mL d'éther diisopropylique ont été ajoutés, sont ultrasoniqués afin de récupérer les CLP. Après regroupement des échantillons, la phase organique est évaporée, la phase aqueuse est centrifugée puis séparée du culot formé par les nanotubes. Une solution de CLP (alcyne ou CH₃) est alors obtenue.

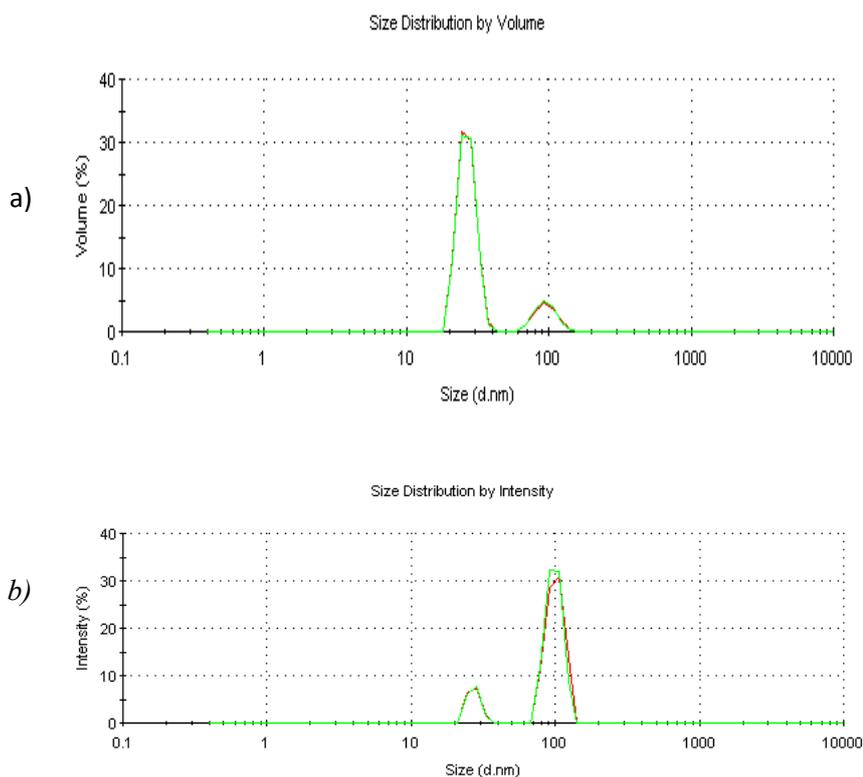


Figure V – 16 : Analyse DLS des CLP obtenus : a) en volume ; b) en intensité

La caractérisation par DLS des CLP-alcyne (Figure V – 16) montre une population majoritaire centrée autour de 30 nm et une seconde population, présente en faible quantité, dont la taille est d'environ 100 nm.

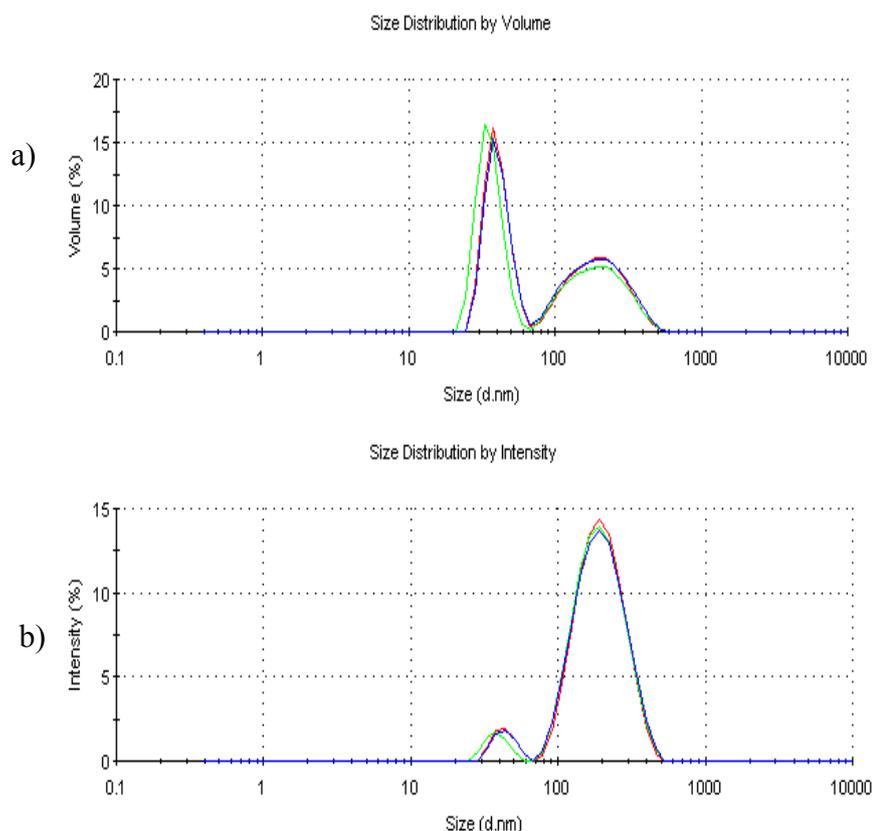


Figure V – 17 : Analyse DLS des CLP obtenus : a) en volume ; b) en intensité

Les analyses DLS des CLP-CH₃ (Figure V – 17) sont similaires à celles obtenues avec les CLP-alcyne, à savoir une population majoritaire à 30 nm et une population minoritaire à 100 nm.

V – 3 – 2 : Greffage du dansyl au cœur des CLP

Un échantillon de CLP dans la solution Tris pH = 11 a été tout d’abord placé sous irradiation micro-ondes. Il a été vérifié que le chauffage par micro-ondes n’affecte pas la taille des CLP. Un échantillon de CLP a été chauffé sous micro-ondes pendant 30 minutes à 90°C. Les analyses DLS ont alors montré que la taille des CLP n’avait pas évolué.

Lors de l’étape de formation de CLP, le rendement a été évalué au chapitre III à environ 10%. Cette valeur est retenue ici et on considère donc que 2 mg de CLP ont été synthétisés dans les 8 mL de solution obtenus en V – 3 – 1. Lors d’une réaction avec 1 mL de solution, 1 mL de *tert*-butanol est ajouté. La concentration du milieu en CLP est alors de 0,13

mg/mL. Notons qu'ici, la concentration est quasiment 10 fois plus faible que lors des réactions avec les micelles.

Dans le chapitre précédant, la réaction de fonctionnalisation par le dansyl était totale jusqu' à une valeur de 0,6 équivalents de dansyl- N_3 . Nous avons alors décidé de réaliser la fonctionnalisation des CLP avec 0,1 équivalent d'azoture par rapport au nombre de chaînes lipidiques (alcyne ou CH_3). Le catalyseur cuivreux (1% molaire) est ajouté ainsi que le réducteur (2% molaire d'ascorbate de sodium). Le milieu réactionnel est chauffé sous micro-ondes à 80°C pendant 10 minutes puis est analysé par DLS. La distribution de taille est toujours centrée vers 30 nm. Un gel d'électrophorèse a été alors réalisé en utilisant les conditions mises au point pour les micelles (Figure V – 18).

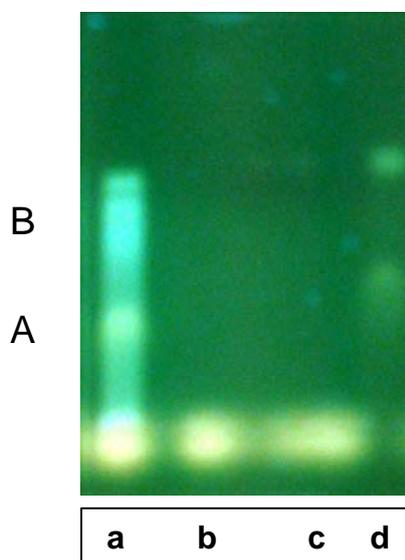


Figure V – 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose : a) milieu réactionnel des CLP-alcyne ; b) milieu réactionnel des CLP- CH_3 ; c) dansyl- N_3 ; d) micelles polymérisées greffées avec le dansyl- N_3

Lors de la réaction avec les CLP- CH_3 (piste b), le dansyl- N_3 n'a pas migré. Ce comportement est identique à celui observé avec les micelles polymérisées de lipide **4** possédant les fonctions méthyles terminales. En revanche, pour les CLP-alcyne de nouvelles bandes sont apparues (piste a), comme c'est le cas pour les micelles polymérisées (piste d). Cependant, contrairement à la réaction avec les micelles polymérisées, une quantité importante de dansyl- N_3 est toujours présente.

La présence dans l'échantillon des CLP-alcyne (piste a) de deux bandes majoritaires (A et B) semblent confirmer le fait que deux populations de nano-objets lipidiques existent, comme on l'observait en DLS. La présence de large bande indiquerait que les CLP ne sont

pas des objets uniques, mais plutôt un assemblage de nano-objets lipidiques. De plus, la quantité importante de dansyl-N₃ restant semble signifier que le rendement de formation des CLP n'a pas été comme supposé de 10% mais inférieur à celui-ci.

La fonctionnalisation des CLP-alcyne a donc bien eu lieu. Néanmoins, à la vue de ces travaux préliminaires, il semble difficile de pouvoir conclure de façon nette quant à la nature des CLP. Ces essais tendent à montrer eux aussi, que ces composés sont différents des micelles polymérisées.

Références bibliographiques du Chapitre V :

- ¹ Förster, T. *Ann Physik*, **1948**, 2, 55-75.
- ² Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, Third Edition **2006**, New York.
- ³ Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 4562-4588.
- ⁴ Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 1387-1395.
- ⁵ Lymeropoulos, K.; Kiel, A.; Seefeld, A.; Stçhr, K.; Herten, D.-P. *ChemPhysChem* **2010**, 11, 43 – 53.
- ⁶ Seward, H. E.; Bagshaw, C. R. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 2842–2851.
- ⁷ Johansson, M. K.; Cook, R. M. *Chemistry: a European Journal* **2003**, 9, 3466-3471.
- ⁸ Stauffer, S. R.; Hartwig, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 6977-6985.
- ⁹ Stauffer, S. R.; Beare, N. A.; Stambuli, J. P.; Hartwig, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 4641-4642.
- ¹⁰ Stambuli, J. P.; Stauffer, S. R.; Shaughnessy, K. H.; Hartwig, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 2677-2678.
- ¹¹ Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9152-9153.
- ¹² Haugland, R. P. in *The Handbook: A guide to fluorescent probes and labelling technologies* **2005**, dixième édition, (ED.: M. T. Z. Spence), Invitrogen
- ¹³ Gehlen, M. H.; De Schryver, F. C. *Chemical Reviews* **1993**, 93, 199-221.
- ¹⁴ Cao, T.; Munk, P.; Ramireddy, C.; Tuzar, Z.; Webber, S. E. *Macromolecules* **1991**, 24, 6300-6305.
- ¹⁵ Yonezawa, T.; Kunitake, T. *Colloids and Surfaces. Part A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, 149, 193-199.
- ¹⁶ Kanehara, M.; Sakurai, J.-I.; Sugimura, H.; Teranishi, T. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 1630-1631.
- ¹⁷ Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, 104, 293-346.
- ¹⁸ Harada, A.; Yuzawa, A.; Kato, T.; Kojima, C.; Kono, K. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2010**, 48, 1391-1398.

¹⁹ Boisselier, E.; Diallo, A. K.; Salmon, L.; Ornelas, C.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 2729-2742.

²⁰ Contreras-Caceres, R.; Sanchez-Iglesias, A.; Karg, M.; Pastoriza-Santos, I.; Perz-Juste, J.; Pacifico, J.; Hellweg, T.; Fernandez-barbero, A.; Liz-Marzan, L. M. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 1666-1670.

²¹ Hasobe, T.; Imahori, H.; Kamat, P. V.; Ahn, T. K.; Kim, S. K.; Kim, D.; Fujimoto, A.; Hirakawa, T.; Fukuzimi, S. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 1216-1228.

Conclusion
et
Perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, de nouveaux lipides possédant des motifs diacétyléniques ont été synthétisés et plus particulièrement deux lipides comportant une tête polaire malonate. Le premier possède en fin de chaîne carbonée un groupement méthyle tandis que le second comprend un motif alcyne. Ces lipides ont été synthétisés au départ de l'undécyn-1-ol, respectivement en 5 étapes avec un rendement global de 36%, et en 8 étapes avec un rendement global de 26%.

Une fois solubilisés en milieu aqueux, ces lipides forment des micelles dont le diamètre est de 5-7 nm. Lors d'une irradiation UV prolongée, les motifs diacétylènes réagissent pour former un enchaînement ène-yne entre les chaînes lipidiques permettant ainsi la stabilisation des micelles. Ces nouvelles micelles polydiacétyléniques ont été par la suite caractérisées par différentes techniques, que ce soit par DLS, MET ou par mesure des CMC.

Ces lipides diacétyléniques peuvent également s'auto-assembler à la surface de nanotubes de carbone pour former des héli-micelles. Lors de l'irradiation UV, les édifices lipidiques sont alors stabilisés rendant alors possible leur extraction par ultra-sonication en milieu bi-phasique. Cette technique fournit alors des constructions lipidiques photo-polymérisées (CLP) en solution aqueuse dont la taille est de 30-40 nm. A la vue de l'ensemble des résultats concernant les CLP, il semble que ces derniers ne soient pas des structures uniques mais plutôt un assemblage de polymères lipidiques provenant d'une réorganisation des héli-micelles lors de l'extraction.

A la suite de ces travaux, la mise au point de la fonctionnalisation interne des micelles non polymérisées et des micelles polymérisées a été réalisée. Pour ce faire, le greffage d'une sonde fluorescente a été envisagé par réaction « click ». Face à la faible réactivité des alcynes terminaux des chaînes lipidiques, des conditions micro-ondes ont été mises au point afin de favoriser la réaction de greffage. La stabilité des micelles polymérisées lors de la fonctionnalisation a ensuite pu être vérifiée. Lors de ces différentes réactions, un greffage quantitatif de la sonde fluorescente est réalisé pour des taux de fonctionnalisation allant jusqu'à 60%. Les études de fluorescence effectuées ont montré que la fonctionnalisation avait lieu dans le cœur hydrophobe de la micelle. En effet, le dansyl en solution aqueuse voit son rendement quantique chuter. Cependant, après réaction au sein de la micelle, la structure même de la micelle sert d'agent de protection pour la sonde fluorescente face à l'eau environnante et le rendement quantique est alors meilleur.

Enfin, la méthodologie de fonctionnalisation interne développée précédemment a été utilisée dans diverses applications. Premièrement, des tests de double fonctionnalisation des micelles polymérisées ont été réalisés avec une sonde fluorescente et un inhibiteur de fluorescence. L'étude a été suivie en utilisant l'inhibition de fluorescence provoquée dans les micelles. Deux méthodes ont permis l'obtention de ces micelles polymérisées bifonctionnelles. La première concerne la double fonctionnalisation séquentielle des micelles où les deux molécules sont greffées par deux réactions successives. La deuxième consiste à synthétiser séparément des micelles fonctionnalisées par l'une ou l'autre des molécules. Ces micelles sont ensuite mélangées pour fournir des micelles mixtes où les deux fonctionnalités sont présentes. Bien que ces deux méthodes fournissent des micelles polymérisées bifonctionnelles, la répartition des molécules dans les chaînes polymériques de lipide est différente. Enfin, des tests préliminaires de fonctionnalisation de micelles polymérisées à l'aide de nanoparticules d'or ont été réalisés. Les observations effectuées par microscopie électronique à transmission semblent montrer une fonctionnalisation interne mais des essais et caractérisations supplémentaires restent à envisager. Parallèlement, des tests préliminaires de fonctionnalisation interne des CLP ont été réalisés, mais les difficultés de caractérisation de ces nano-objets ne permettent pas une étude aisée de cette fonctionnalisation.

Parallèlement à ces études, différents travaux ont été menés en collaboration au sein du laboratoire. Le premier a consisté à étudier l'adsorption du lipide 11,8-NTA sur différents nanotubes de carbone. Les taux d'adsorption du lipide se sont montrés différents selon les nanotubes utilisés et non prédictibles. La formation d'hémi-micelles cylindriques de lipide fut également non rationalisable. Enfin, la stabilité des suspensions de nanotubes de carbone en milieu aqueux a été évaluée et, parmi elles, certaines se sont retrouvées stables pendant plusieurs mois.

Par ailleurs, une étude a été réalisée sur la dispersion programmée des nanotubes de carbone en solution aqueuse en fonction du pH. Des lipides diacétyléniques possédant des têtes polaires variées (NTA, malonate, polyéthylène glycol et diéthylamine) ont été synthétisés puis adsorbés à la surface des nanotubes de carbone. Les stabilités des suspensions de nanotubes de carbone obtenues ont été corrélées à la formation plus ou moins aisée des micelles de lipides lorsque le pH de la solution variait. Ainsi, selon le type de lipide utilisé, les nanotubes de carbone peuvent être aisément dispersés en solution aqueuse quelque soit le pH.

Enfin, une étude a été effectuée sur la caractérisation de micelles lipidiques comportant des motifs polydiacétylènes en utilisant le lipide 11,8-NTA. La polymérisation engendrée par irradiation UV génère des micelles polymérisées dont la CMC est plus faible que celle des micelles non polymérisées, et dont la stabilité vis-à-vis de solvants organiques est accrue.

Ces travaux de thèse vont être complétés par une étude concernant la fonctionnalisation de la surface des micelles par des sondes fluorescentes. Ainsi, avec les deux techniques, il sera alors possible de réaliser des micelles bi-fonctionnalisées, issues d'un greffage sur la surface hydrophile d'une première sonde, et d'un greffage dans le cœur hydrophobe au moyen d'une seconde.

La fonctionnalisation interne de micelles a été caractérisée et les perspectives de ces travaux de thèse pourraient donc consister à diversifier la nature des composés greffés en vue d'applications nouvelles. Une possibilité serait par exemple la synthèse de nano-réacteurs. En effet, différents complexes métalliques pourraient être insérés au cœur des micelles et ainsi fournir des nano-réacteurs permettant la catalyse en milieu aqueux grâce à leur solubilité.

De plus, les dynamiques d'échange des lipides ou des polymères de lipide lors de la formation de micelles mixtes sera poursuivie en étudiant l'inhibition de fluorescence au sein de micelles bi-fonctionnalisées. Ceci permettrait d'élaborer de nouveaux objets multifonctionnels et d'étudier leurs propriétés. En outre, ce système pourrait servir de senseurs à la désagrégation et/ou à la réorganisation en solution que se soient de micelles ou de CLP. En effet, au début de ces travaux, les CLP étaient représentés comme des objets uniques et rigides provenant de l'extraction des hémi-micelles cylindriques le long des nanotubes de carbone. Il s'est avéré au cours de ces travaux et de travaux effectués en parallèle au laboratoire, que cette vision a évolué. En effet, selon la méthode utilisée, la taille des nano-objets formés varie de 30-40 nm pour la méthode d'extraction par ultra-sonication en milieu bi-phasique que nous avons utilisé, à 60-80 nm pour une méthode d'extraction par ultra-sonication en milieu organique (éthanol). Il semblerait donc que les CLP soient issues d'une réorganisation particulière des chaînes de lipides lors de l'extraction des nanotubes, dépendante des conditions utilisées. Ces phénomènes d'inhibition de fluorescence pourraient être envisagés pour étudier ces objets, et par exemple leur agrégation et les cinétiques d'échange de chaînes lipidiques.

Enfin, des micelles dont la stabilisation sera améliorée sont envisagées. Pour cela, ces dernières seraient polymérisées *via* le motif diacétylène au milieu de la chaîne carbonée puis

réticulées par des ponts di-sulfures placés à l'intérieur ou à l'extérieur de la micelle. Des micelles de lipide plus stables réticulées soit dans la partie hydrophobe, soit dans la partie hydrophile pourraient être ainsi formées et étudiées.

Partie
Expérimentale

Toutes les manipulations nécessitant des conditions anhydres ont été réalisées sous atmosphère d'argon avec des solvants préalablement séchés sur une station pour séchage de solvant GT S100, sur des cartouches d'alumine. L'avancement des réactions est contrôlé par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄), puis visualisé par UV (256 et 365 nm) puis par révélation (révélateurs utilisés : cérium ammonium molybdate, vanilline, ninhydrine et réactif de Tillmann DCIP). Les purifications par chromatographie flash sont réalisées sur gel de silice Merck Kieselgel (40-60 μm , 230-400 mech ASTM). Les produits chimiques commerciaux ont été achetés auprès d'Aldrich, Avocado, Lancaster, Acros ou Fluka et utilisés sans aucune purification supplémentaire.

Les spectres RMN ¹H et RMN ¹³C ont été enregistrés sur les spectromètres suivants: Bruker Advance 400 (RMN ¹H, 400 MHz ; RMN ¹³C, 100 MHz), Bruker DPX300 (RMN ¹H, 300 MHz ; RMN ¹³C, 75 MHz), Bruker DPX200 (RMN ¹H, 200 MHz ; RMN ¹³C, 50 MHz). Tous les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme déutééré (CDCl₃). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au chloroforme résiduel présent dans CDCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm pour les spectres de RMN ¹H; $\delta = 77.16$ ppm pour les spectres de RMN ¹³C). Les spectres RMN ¹H sont décrits comme suit: δ (multiplicité du signal, constant de couplage *J* en Hertz, nombre de protons obtenu par intégration du signal). La multiplicité du signal est indiquée par les abbreviations suivantes: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), q (quintet), m (multiplet), td (triplet dédoublé).

Les points de fusion sont mesurés avec un appareil Stuart Scientific SMP3. Les analyses infra-rouge sont réalisées sur un appareil Nicolet 380 FT-IR. Les expériences de spectrométrie de masse basse résolution ont été effectuées avec un appareil Shimadzu CMS-QP5050A en mode électrospray positive (ESI). Les expériences de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées avec un appareil Agilent Q-ToF 6520 en mode électrospray positive (ESI).

Les étapes de sonication ont été réalisées dans 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'une sonde à soniquer Bioblock Scientific, VibraCell (mode pulse : 9,9 s on ; 5,0 s off).

Les étapes de centrifugation ont été effectuées avec une centrifugeuse Br4i Jouan dans un rotor mobile S40.

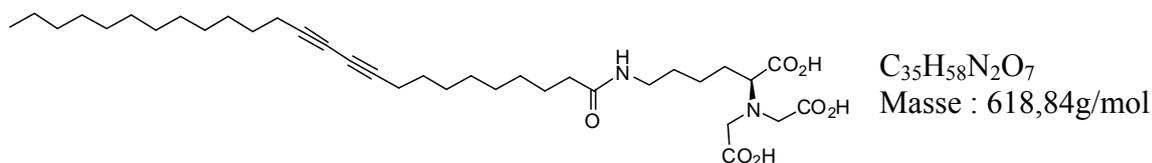
Les étapes d'irradiation ont été effectuées avec un four UV (48 W, 254 nm) Cross-linker Bio-link 254, Fischer Bioblock.

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

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées avec un appareil Nano-ZS Malvern.

Les spectres d'absorption UV-Visibles ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrofluoromètre Jobin-Yvon Fluorolog (Longjumeau, France).

***N*²,*N*²-bis(carboxymethyl)-*N*⁶-pentacosa-10,12-diynoyl-L-lysine 1 :**



A une solution d'acide 10,12-pentacosadiynoïque (2,00 g ; 5,34 mmol ; 1 eq) dans le dichlorométhane (120 mL) sont ajoutés à l'abri de la lumière du N-hydroxysuccinimide (0,80 g ; 6,94 mmol ; 1,3 eq) et du *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide (1,33 g ; 6,94 mmol ; 1,3 eq). Le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante puis 60 mL d'eau sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3*30 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le solide obtenu est dissout dans la DMF (20 mL) et sont ajoutés **2** (1,38 g ; 5,34 mmol ; 1 eq) en solution dans la DMF (20 mL), puis quelques gouttes d'eau et de la triéthylamine (5,10 mL ; 36,81 mmol ; 7 eq). Le milieu réactionnel est agité 19 heures à température ambiante puis concentré sous vide. Le résidu est repris dans l'eau (20 mL) puis le milieu est acidifié jusqu'à la formation d'un précipité (pH <1). Ce dernier est purifié par trois cycles de centrifugation à 3000*g pendant 15 minutes. Le solide obtenu est lyophilisé pour fournir **1** (2,94 g ; 90%) sous forme d'un solide blanc.

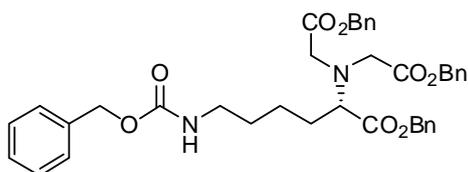
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) 7,69 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz) ; 3,50 (d, 2H, *J* = 17,7 Hz) ; 3,42 (d, 2H, *J* = 17,7 Hz) ; 3,31 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz) ; 2,98 (m, 2H) ; 2,26 (t, 4H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,02 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz) ; 0,85 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) 174,0 ; 173,2 ; 171,9 ; 77,9 ; 65,3 ; 64,3 ; 53,4 ; 38,2 ; 35,4 ; 31,3 ; 29,3-27,8 ; 25,3 ; 23,1 ; 22,1 ; 18,3 ; 14,0.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3323 ; 2925 ; 2853 ; 1929 ; 1732 ; 1645 ; 1546 ; 1464 ; 1425 ; 1256 ; 983 ; 892 ; 720.

HRMS (ESI, *m/z*): Calc. pour C₃₅H₅₈N₂O₇ [M-H]⁻ : 617,4171 ; Obtenu : 617,4175.

Benzyl *N*⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-*N*²,*N*²-bis(2-benzyloxy-2-oxoethyl)-L-lysinate 7 :



$C_{39}H_{42}N_2O_8$
Masse : 666,76g/mol
 R_f : 0,18 (cHex/AE 1/1)

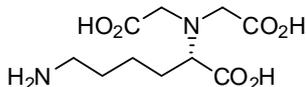
A une solution d'acide bromoacétique (9,9 g ; 71,2 mmol ; 4 eq) dans la soude 2N (40 mL) à 0°C, est ajoutée de la Z-lysine (5,0 g ; 17,8 mmol ; 1 eq) en solution dans la soude 1N (15 mL). Le milieu réactionnel est agité 2 heures à température ambiante puis 12 heures à 50°C. La solution est ensuite refroidie à 0°C puis acidifiée avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à formation d'un précipité. Après filtration, le solide est séché puis dissout dans de la DMF (100 mL). A cette solution est ajouté du carbonate de césium (34,9 g ; 106,8 mmol ; 6 eq) puis le milieu est chauffé à 70°C. Le bromure de benzyle (18,3 g ; 106,8 mmol ; 6 eq) est alors coulé goutte à goutte puis le milieu réactionnel est agité 24 heures à 70 °C. Le milieu est acidifié par une solution d'acide chlorhydrique 1M (150 mL) puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*200 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50) pour fournir le composé 7 (8,10 g ; 68%) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7,35 (m, 20H) ; 5,29 (m, 2H) ; 5,09 (m, 6H) ; 4,82 (m, 1H) ; 3,69 (m, 4H) ; 3,10 (m, 2H) ; 1,68 (m, 2H) ; 1,44 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 172,0 ; 170,2 ; 156,4 ; 136,8 ; 128,5 ; 128,0 ; 66,4 ; 64,5 ; 54,5 ; 40,8 ; 29,9 ; 29,3 ; 22,9

MS (ESI, *m/z*): 667,3 [M+H]⁺

***N*²,*N*²-bis(carboxymethyl)-L-lysinate 2 :**



$C_9H_{16}N_2O_6$
Masse : 262,26g/mol

A une solution de **7** (3,20 g ; 4,80 mmol ; 1 eq) dans le méthanol (200 mL), sont ajoutés du palladium sur charbon (0,32 g ; 10 %) et 4 mL d'acide formique. Le ballon est purgé trois fois à l'azote puis rempli d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité 14 heures à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré sur célite, lavé avec du méthanol (2*50 mL), de l'eau (150 mL) puis filtré à nouveau pour éliminer le catalyseur. La phase aqueuse est lyophilisée pour donner **2** (1,69g ; 100%) sous forme d'un solide blanc.

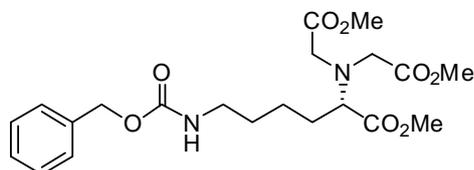
RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) 3,9-3,7 (m, 5H) ; 2,89 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz) ; 1,9-1,4 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) : δ (ppm) 171,9 ; 170,1 ; 67,6 ; 55,1 ; 38,8 ; 26,3 ; 22,9.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3498 ; 3324 ; 2996 ; 2975 ; 1750 ; 1634 ; 1401 ; 1263 ; 1159 ; 984 ; 876 ; 751.

MS (ESI, m/z): 263,1 [M+H]⁺

Methyl N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-N²,N²-bis(2-methoxy-2-oxoethyl)-L-lysinate **8 :**



C₂₁H₃₀N₂O₈
Masse : 438,47g/mol
R_f : 0,61 (DCM/AE 9/1)

A une suspension contenant de la Z-Lysine (1,50 g ; 4,53 mmol ; 1eq) dans de l'acétonitrile (10 mL), sont ajoutés de la DIPEA (3,16 mL ; 18,14 mmol ; 4 eq) puis du bromoacétate de méthyle (1,29 mL ; 13,60 mmol ; 3 eq). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 48 heures. Une fois revenu à température ambiante, une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3*30 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle pour fournir le composé **8** (1,55 g ; 78%) sous forme d'une huile jaune pâle.

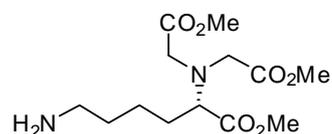
RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) 7,35 (m, 5H) ; 5,09 (m, 2H) ; 4,91 (m, 1H) ; 3,67-3,45 (m, 14H) ; 3,41 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz) ; 3,20 (m, 2H) ; 1,67-1,40 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) : δ (ppm) 173,1 ; 171,8 ; 156,5 ; 136,8 ; 128,5 ; 128,0 ; 66,5 ; 64,6 ; 53,5 ; 52,5 ; 51,7 ; 51,5 ; 40,8 ; 29,9 ; 29,3 ; 22,9.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3370 ; 2953 ; 2866 ; 1731 ; 1530 ; 1436 ; 1247 ; 1203 ; 1158 ; 1086 ; 1047 ; 1012 ; 880 ; 775 ; 737 ; 698.

MS (ESI, *m/z*) : 439,2 [M+H]⁺

Methyl N²,N²-bis(2-methoxy-2-oxoethyl)-L-lysinate 9 :



C₁₃H₂₄N₂O₆
Masse : 304,34g/mol
R_f: 0,12 (DCM/AE 7/3)

A une solution de **8** (1,00 g ; 2,28 mmol ; 1 eq) dans le méthanol (40 mL), sont ajoutés du palladium sur charbon (0,10 g ; 10 %) et 1 mL d'acide formique. Le ballon est purgé trois fois à l'azote puis rempli d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité 14 heures à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré sur célite, lavé avec du méthanol (2*20 mL), de l'eau (50 mL) puis filtré à nouveau pour éliminer le catalyseur. La phase aqueuse est lyophilisée pour donner **9** (0,66g ; 95%) sous forme d'une huile jaune.

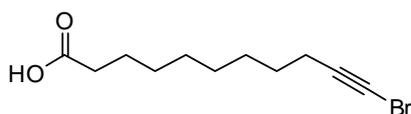
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,05 (m, 1H) ; 3,60 (m, 9H) ; 3,41 (m, 4H) ; 2,60 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz) ; 1,69-1,05 (m, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 173,4 ; 172,1 ; 66,1 ; 65,1 ; 52,7 ; 51,9 ; 51,7 ; 42,2 ; 33,7 ; 30,6 ; 23,5 ; 15,6 ; 14,5.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3337 ; 2952 ; 2863 ; 1731 ; 1656 ; 1536 ; 1435 ; 1355 ; 1203 ; 1151 ; 995 ; 752.

MS (ESI, *m/z*): 305,1 [M+H]⁺

11-bromoundec-10-ynoic acid **10** :



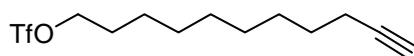
$C_{11}H_{17}BrO_2$
Masse : 261,15 g/mol
 R_f : 0,05 (cHex/AE 4/1)

A une solution d'acide 10-undecyn-1-oïque (1,0 g ; 5,5 mmol ; 1,0 eq) dans l'acétone anhydre (20 mL), sont ajoutés $AgNO_3$ (60 mg ; 0,1 eq) and N-bromosuccinimide (1,16 g, 1,1 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 14 heures à température ambiante. Après évaporation, le résidu est repris dans de l'eau (10 mL) et de l'éther diéthylique (20 mL) et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2*10 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50) pour fournir le composé **10** (1,28 g ; 89%) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 2,34 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,23 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 1,60-1,25 (m, 12H).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 178,5 ; 65,2 ; 57,2 ; 34,8 ; 29,9 ; 29,5 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,4 ; 25,8 ; 19,9.

undec-10-yn-1-yl trifluoromethanesulfonate **11** :



$C_{12}H_{19}F_3O_3S$
Masse : 468,61 g/mol
 R_f : 0,95 (DCM)

A une solution de undecyn-1-ol (5,0 g ; 29,8 mmol ; 1,0 eq) dans le dichlorométhane (120 mL) à 0°C sont ajoutés de la pyridine (2,63 mL ; 1,1 eq) puis de l'anhydride triflique (6,50 mL ; 1,3 eq). La réaction est agitée à 0°C pendant 2 heures puis diluée par du cyclohexane (100 mL) et filtrée sur célite. Une fois concentré, le filtrat est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir le composé **11** (8,3 g ; 92%) sous forme d'une huile marron.

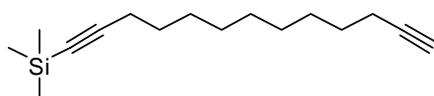
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,53 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,19 (td, 2H, *J* = 5,4 Hz, 2,7 Hz) ; 1,94 (t, 1H, *J* = 2,7 Hz) ; 1,83 (q, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 1,57-1,25 (m, 12H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 118,8 ; 84,7 ; 77,8 ; 68,2 ; 29,3 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,7 ; 28,5 ; 25,1 ; 18,5.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3308 ; 2932 ; 2858 ; 1412 ; 1246 ; 1205 ; 1146 ; 935 ; 616.

MS (ESI, *m/z*): 169,2 [M-OTf]⁺.

trimethyl(trideca-1,12-diyn-1-yl)silane 12 :



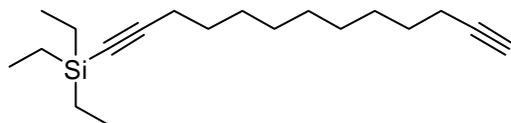
C₁₆H₂₈Si
Masse : 248,48 g/mol
R_f : 0,95 (cHex/AE : 95/5)

A une solution de triméthylsilylacétylène (0,89 mL ; 5,12 mmol ; 1,0 eq) dans le THF anhydre (30 mL) à -78°C, est ajouté du *n*-BuLi 1,47M en solution dans l'hexane (3,8 mL ; 4,56 mmol ; 0,89 eq). Le milieu est agité une heure à température ambiante puis refroidi à -78°C. Une solution de triflate **11** (1,40 g ; 4,26 mmol ; 0,83 eq) dans le THF (6 mL) est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 heures à température ambiante puis de la saumure (20 mL) et de l'acétate d'éthyle (20 mL) sont ajoutés. La phase organique est séparée puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*40 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (98/2) pour fournir le composé **12** (827 mg ; 65%) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 2,24 (m, 4H) ; 1,92 (t, 1H, *J* = 2,7 Hz) ; 1,60-1,18 (m, 14H) ; 0,05 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 108,9 ; 84,8 ; 81,2 ; 68,2 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,6 ; 20,0 ; 18,2 ; 3,5.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3309 ; 2934 ; 2870 ; 2850 ; 2165 ; 1455 ; 1230 ; 1016 ; 722.

triethyl(trideca-1,12-diyn-1-yl)silane 16 :

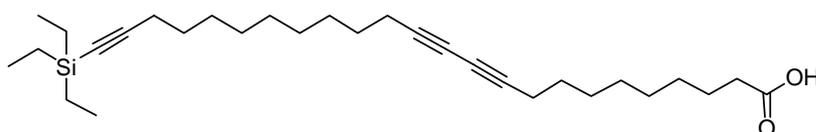
C₁₉H₃₄Si
Masse : 290,56 g/mol
R_f : 0,96 (cHex/AE : 95/5)

A une solution de triéthylsilylacétylène (4,58 mL ; 25,62 mmol ; 1,0 eq) dans le THF anhydre (160 mL) à -78°C, est ajouté du *n*-BuLi 1,41M en solution dans l'hexane (20,0 mL ; 22,80 mmol ; 0,89 eq). Le milieu est agité une heure à température ambiante puis refroidi à -78°C. Une solution de triflate **11** (7,00 g ; 21,26 mmol ; 0,83 eq) dans le THF (30 mL) est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est agité pendant 16 heures à température ambiante puis de la saumure (100 mL) et de l'acétate d'éthyle (100 mL) sont ajoutés. La phase organique est séparée puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*200 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (98/2) pour fournir le composé **16** (5,01 g ; 74%) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 2,25 (m, 4H) ; 1,93 (t, 1H, *J* = 2,7 Hz) ; 1,60-1,18 (m, 14H) ; 0,98 (t, 9H, *J* = 7,9 Hz) ; 0,56 (q, 6H, *J* = 7,9 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 108,9 ; 84,8 ; 81,2 ; 68,2 ; 29,5 ; 29,3 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,6 ; 20,0 ; 18,2 ; 7,6 ; 4,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3313 ; 2931 ; 2874 ; 2856 ; 2171 ; 1459 ; 1236 ; 1016 ; 722.

24-(triethylsilyl)tetracos-10,12,23-triynoic acid 17 :

C₃₀H₅₀O₂Si
Masse : 470,80 g/mol
R_f : 0,08 (cHex/AE 4/1)

A une solution d'alcool **19** (50 mg ; 0,11 mmol ; 1,0 eq) dans le DMF (4 mL) est ajouté du dichromate de pyridinium (189 mg ; 0,88 mmol ; 8 eq). Le milieu est agité 16 heures à température ambiante. Le milieu est ensuite acidifié avec de l'acide chlorhydrique

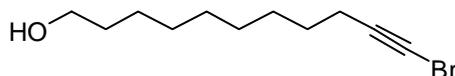
1M (1 mL) puis de l'acétate d'éthyle (10 mL) sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*20 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/1) pour fournir le composé **17** (47 g ; 92%) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 2,34 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,60-1,25 (m, 26H) ; 1,01 (t, 9H, $J = 7,7$ Hz) ; 0,55 (q, 6H, $J = 7,7$ Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 178,5 ; 97,7 ; 85,1 ; 77,6 ; 65,2 ; 35,1 ; 30,1 ; 29,9 ; 29,8 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 25,8 ; 19,9 ; 19,3 ; 7,6 ; 4,7.

MS (ESI, m/z) : 453,8 [(M-H₂O)+H]⁺.

11-bromoundec-10-yn-1-ol **18** :



C₁₁H₁₉BrO
Masse : 246,06 g/mol
R_f : 0,24 (cHex/AE 3/1)

A une solution de 10-undecyn-1-ol (5,0 g ; 29,8 mmol ; 1,0 eq) dans l'acétone anhydre (100 mL), sont ajoutés AgNO₃ (300 mg ; 0,1 eq) and N-bromosuccinimide (5,80 g, 1,1 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 14 heures à température ambiante. Après évaporation, le résidu est repris dans de l'eau (50 mL) et de l'éther diéthylique (100 mL) et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30) pour fournir le composé **18** (9,13 g ; 90%) sous forme d'une huile jaune pâle.

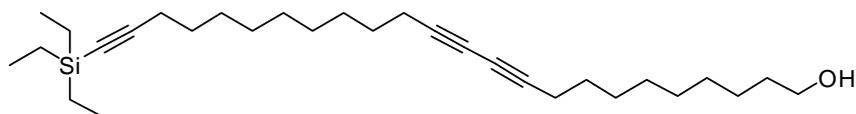
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,61 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,18 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz) ; 1,65-1,40 (m, 4H) ; 1,40-1,18 (m, 10H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 80,5 ; 63,0 ; 37,6 ; 32,8 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,3 ; 25,8 ; 19,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3329 ; 2927 ; 2855 ; 1464 ; 1057.

HRMS (ESI, m/z): Calc. pour C₁₁H₁₉BrO [M+H]⁺ : 247,0697 ; Obtenu: 247, 0691.

24-(triethylsilyl)tetracos-10,12,23-triyn-1-ol **19 :**



C₃₀H₅₂OSi
Masse : 456,82 g/mol
R_f: 0,24 (cHex/AE 3/1)

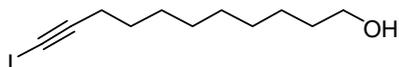
A une solution d'alcyne **16** (2,70 g ; 9,30 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange méthanol/éthylamine (70% dans l'eau) 1/1 (100 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés CuCl₂ (100 mg, 0,01 eq) puis NH₂OH, HCl (190 mg ; 0,02 eq) ; la solution bleue devient alors jaune. Le bromo-alcyne **18** (2,52 g ; 1,1 eq) est alors ajouté et la solution est agitée pendant 4 heures. De la saumure (100 mL) et de l'acétate d'éthyle (200 mL) sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*200 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/1) pour fournir le composé **19** (2,42 g ; 55%) sous forme d'une huile jaune.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,64 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,60-1,25 (m, 28H) ; 1,00 (t, 9H, *J* = 7,7 Hz) ; 0,59 (q, 6H, *J* = 7,7 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 108,9 ; 100,7 ; 77,8 ; 65,4 ; 63,1 ; 32,9 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 25,8 ; 19,9 ; 19,3 ; 7,6 ; 4,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3337 ; 2927 ; 2854 ; 2170 ; 1458 ; 1017 ; 725.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. pour C₃₀H₅₂OSi [M+H]⁺ : 457,3865 ; Obtenu : 457,3860.

11-iodoundec-10-yn-1-ol 20 :

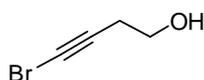
$C_{11}H_{19}IO$
Masse : 294,17 g/mol
 R_f : 0,15 (DCM)

A une solution de 10-undecyn-1-ol (1,0 g ; 5,96 mmol ; 1,0 eq) dans le méthanol (20 mL), est ajouté à 0°C une solution de KOH 1M (0,83 g ; 14,90 mmol ; 2,5 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 10 minutes puis du diiode est ajouté (1,66 g ; 6,55 mmol ; 1,1 eq). Le mélange réactionnel est agité 7 heures à température ambiante. Après évaporation, le résidu est repris dans de l'eau (20 mL) et de l'éther diéthylique (20 mL) et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2*20 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30) pour fournir le composé **20** (1,66 g ; 90%) sous forme d'une huile incolore.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 3,62 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,34 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz) ; 1,60-1,18 (m, 14H).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 95,0 ; 63,0 ; 32,8 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,3 ; 25,7 ; 20,4 ; -7,5.

IR (neat) : ν (cm^{-1}) 3339 ; 2935 ; 2856 ; 2180 ; 1428 ; 1329 ; 1038 ; 909 ; 845 ; 732.

4-bromobut-3-yn-1-ol 21:

C_4H_5BrO
Masse : 148,99 g/mol
 R_f : 0,18 (DCM)

A une solution de 3-butyn-1-ol (0,5 g ; 7,14 mmol ; 1,0 eq) dans l'acétone anhydre (20 mL), sont ajoutés $AgNO_3$ (72 mg ; 0,74 mmol ; 0,1 eq) and N-bromosuccinimide (1,39 g, 7,85 mmol ; 1,1 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 14 heures à température ambiante. Après évaporation, le résidu est repris dans de l'eau (20 mL) et de l'éther diéthylique (50 mL) et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme

éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30) pour fournir le composé **21** (915 mg ; 86%) sous forme d'une huile incolore.

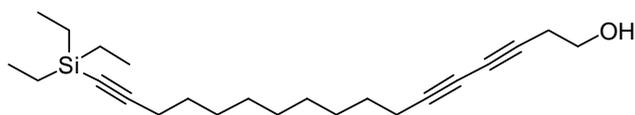
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,72 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 2,52 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz) ; 1,95 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 65,8 ; 61,2 ; 60,8 ; 23,2.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3329 ; 2939 ; 2886 ; 1418 ; 1329 ; 1185 ; 1031 ; 908 ; 845 ; 732.

MS (ESI, m/z) : 148,9 – 150,9 [M+H]⁺

17-(triethylsilyl)heptadeca-3,5,16-triyn-1-ol **22** :



C₂₃H₃₈OSi
Masse : 358,63 g/mol
R_f : 0,22 (DCM)

A une solution d'alcyne **16** (0,97 g ; 3,35 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange méthanol/éthylamine (70% dans l'eau) 9/1 (30 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés CuCl₂ (32 mg ; 0,03 mmol ; 0,01 eq) puis NH₂OH, HCl (61 mg ; 0,06 mmol ; 0,02 eq) ; la solution bleue devient alors jaune. Le bromo-alcyne **21** (0,55 g ; 1,1 eq) est alors ajouté et la solution est agitée pendant 4 heures. De la saumure (30 mL) et de l'acétate d'éthyle (50 mL) sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/1) pour fournir le composé **22** (0,90 g ; 75%) sous forme d'une huile jaune.

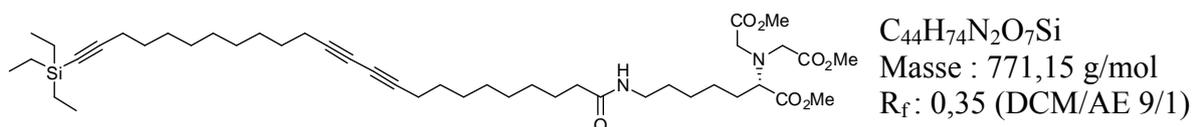
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,72 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,52 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,23 (m, 4H) ; 1,94 (s, 1H) ; 1,60-1,20 (m, 14H) ; 0,96 (t, 9H, $J = 7,6$ Hz) ; 0,59 (q, 6H, $J = 7,7$ Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 108,9 ; 81,5 ; 78,4 ; 73,8 ; 67,3 ; 65,1 ; 61,0 ; 29,5 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 27,0 ; 23,8 ; 19,9 ; 19,3 ; 7,6 ; 4,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3341 ; 2930 ; 2873 ; 2855 ; 2170 ; 1457 ; 1235 ; 1044 ; 1017 ; 722.

MS (ESI, m/z) : 359,3 $[M+H]^+$

Methyl N^2,N^2 -bis(2-methoxy-2-oxoethyl)- N^6 -[24-(triethylsilyl)tetracos-10,12,23-triynoyl]-L-lysinate **23 :**

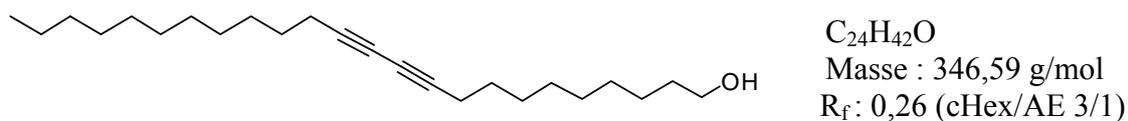


A une solution de **17** (20 mg ; 0,04 mmol ; 1 eq) dans le dichlorométhane (2 mL), sont ajoutés la tête NTA 9 (14 mg ; 0,05 mmol ; 1,1 eq), HOBt (6 mg ; 0,05 mmol ; 1,1eq) et de la triéthylamine (5 mg ; 0,05 mmol ; 1,1 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 48 heures à température ambiante. Le milieu est ensuite évaporé. Le brut réactionnel est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (9/1) pour fournir le composé **23** (4 mg ; 11%) sous forme d'une huile jaune.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,04 (m, 1H) ; 3,61 (m, 9H) ; 3,41 (m, 4H) ; 3,05 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,69-1,05 (m, 34H) ; ; 0,96 (t, 9H, $J = 7,6$ Hz) ; 0,59 (q, 6H, $J = 7,7$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 173,4 ; 172,1 ; 170,2 ; 108,7 ; 100,6 ; 77,8 ; 66,1 ; 65,3 ; 65,1 ; 52,7 ; 51,9 ; 51,7 ; 42,2 ; 33,7 ; 30,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 25,8 ; 23,4 ; 19,9 ; 19,4 ; 15,5 ; 14,4 ; 7,6 ; 4,7.

Tetracos-10,12-diyn-1-ol **24 :**



A une solution d'alcyne (4,74 g ; 26,70 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange méthanol/éthylamine (70% dans l'eau) 1/1 (200 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés CuCl₂ (220 mg, 0,01 eq) puis NH₂OH, HCl (420 mg ; 0,02 eq) ; la solution bleue devient alors jaune. Le bromo-alcyne **18** (6,00 g ; 23,76 mmol ; 0,89 eq) est alors ajouté et la solution est agitée pendant 4 heures. De la saumure (200 mL) et de l'acétate d'éthyle (200 mL) sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*400 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/1) pour fournir le composé **24** (4,42 g ; 53%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 55-56°C

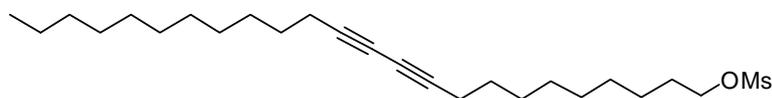
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,63 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,23 (t, 4H, *J* = 6,6 Hz) ; 1,58-1,25 (m, 32H) ; 0,87 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,7 ; 65,4 ; 65,4 ; 63,2 ; 32,9 ; 32,0 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,5 ; 29,5 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,5 ; 25,8 ; 22,8 ; 19,3 ; 14,2.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3407 ; 3337 ; 2916 ; 2849 ; 1467 ; 1414 ; 1351 ; 1059 ; 1044 ; 1013 ; 981 ; 718 ; 615.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₂₄H₄₂O [M+H]⁺ : 347,3314 ; Obtenu : 347,3309.

Tetracos-10,12-diyn-1-yl methanesulfonate **25** :



C₂₅H₄₄O₃S
 Masse : 424,68 g/mol
 R_f : 0,98 (DCM)

A une solution d'alcool **24** (4,42 g ; 12,75 mmol, 1,0 eq) dans le THF anhydre (100 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés de la triéthylamine (4,3 mL ; 15,30 mmol ; 1,2 eq) et du chlorure de mésyle (1,29 mL ; 15,30 mmol ; 1,2 eq). La solution est agitée pendant une heure à température ambiante puis neutralisée par une solution de carbonate de potassium (50 mL) et de l'eau (100 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*150 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis

concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir le composé **25** (5,17 g ; 95%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 51-52°C.

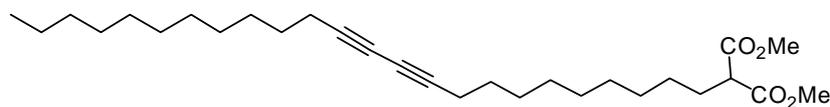
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,22 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,99 (s, 3H) ; 2,23 (t, 4H, $J = 6,8$ Hz) ; 1,74 (q, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 1,55-1,25 (m, 30H) ; 0,87 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,7 ; 77,5 ; 70,3 ; 65,4 ; 65,3 ; 37,5 ; 32,0 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,0 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,5 ; 28,4 ; 25,5 ; 22,8 ; 19,3 ; 14,2.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 2916 ; 2850 ; 1470 ; 1330 ; 1164 ; 999 ; 962 ; 849 ; 745 ; 717 ; 543.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. pour C₂₅H₄₄O₃S [M+K]⁺ : 464,2676 ; Obtenu : 464,2681.

Dimethyl tetracos-10,12-diyn-1-ylmalonate **26** :



C₂₉H₄₈O₄
Masse : 460,69 g/mol
R_f : 0,76 (cHex/AE 9/1)

A une solution de NaH (60% d'huile) (682 mg ; 13,39 mmol ; 1,1 eq) dans le THF anhydre (100 mL), est ajouté le diméthylmalonate (2,12 mL ; 14,60 mmol ; 1,2 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à température ambiante puis est ajouté, à l'abri de la lumière, le mésyle **25** (5,17 g ; 12,17 mmol ; 1,0 eq) en solution dans le THF (20 mL) en une heure. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant une heure à température ambiante puis à reflux pendant 24 heures. Une fois le milieu revenu à température ambiante, une solution de HCl 1M est ajoutée (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*150 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5) pour fournir le composé **26** (4,26 g ; 76%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 36-37°C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,73 (s, 6H) ; 3,35 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz) ; 2,23 (t, 4H, *J* = 6,9 Hz) ; 1,90 (m, 2H) ; 1,56-1,25 (m, 32H) ; 0,88 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 170,1 ; 77,7 ; 65,4 ; 65,4 ; 52,5 ; 51,8 ; 32,0 ; 29,7 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,5 ; 27,4 ; 22,8 ; 19,3 ; 14,2.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 2914 ; 2849 ; 1754 ; 1732 ; 1471 ; 1438 ; 1338 ; 1296 ; 1268 ; 1242 ; 1214 ; 1191 ; 1152 ; 1127 ; 1007 ; 1022 ; 956 ; 715.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₂₉H₄₈O₄ [M+K]⁺ : 499, 3190 ; Obtenu : 499,3191.

Tetracos-10,12-diyn-1-ylmalonic acid **4** :



C₂₇H₄₄O₄
Masse : 432,64 g/mol
R_f : 0,05 (AE/MeOH 9/1)

A une solution de **26** (200 mg ; 0,43 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange THF/méthanol : 1/1 (2 mL), est ajoutée une solution aqueuse de LiOH 1M (0,53 mL ; 1,32 mmol ; 3,0 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante puis neutralisé avec une solution de HCl 1M (1 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le composé **4** est obtenu (191 mg, 98%) sous forme d'un solide blanc.

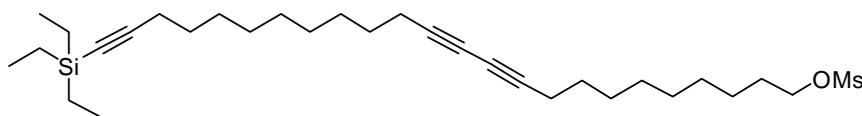
P_f : 106-108°C.

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 3,28 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz) ; 2,24 (t, 4H, *J* = 6,8 Hz) ; 1,83 (m, 2H) ; 1,53-1,25 (m, 32H) ; 0,90 (t, 3H, *J* = 6,4 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 173,3 ; 77,8 ; 66,4 ; 53,0 ; 33,1 ; 30,7 ; 30,6 ; 30,5 ; 30,4 ; 30,3 ; 30,1 ; 30,1 ; 29,9 ; 29,5 ; 28,5 ; 23,7 ; 19,7 ; 14,4.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 2913 ; 2849 ; 2359 ; 2341 ; 1720 ; 1699 ; 1469 ; 1417 ; 1301 ; 1266 ; 933 ; 717 ; 670.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₂₇H₄₄O₄ [M+H]⁺ : 433,3317 ; Obtenu : 433, 3319.

24-(triethylsilyl)tetracos-10,12,23-triyn-1-yl methanesulfonate 27 :

$C_{31}H_{54}O_3SSi$
Masse : 534,91 g/mol
 R_f : 0,98 (DCM)

A une solution d'alcool **19** (2,36 g, 5,17 mmol, 1,0 eq) dans le THF anhydre (30 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés de la triéthylamine (1,7 mL ; 6,20 mmol ; 1,2 eq) et du chlorure de mésyle (0,51 mL ; 6,20 mmol ; 1,2 eq). La solution est agitée pendant une heure à température ambiante puis neutralisée par une solution de carbonate de potassium (10 mL) et de l'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir le composé **27** (2,48 g ; 90%) sous forme d'une huile jaune.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 4,22 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz) ; 3,01 (s, 3H) ; 2,24 (m, 6H) ; 1,76 (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz) ; 1,64-1,25 (m, 26H) ; 1,00 (t, 9H, $J = 7,7$ Hz) ; 0,59 (q, 6H, $J = 7,7$ Hz).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 108,8 ; 81,4 ; 77,5 ; 77,4 ; 70,2 ; 65,4 ; 65,4 ; 37,3 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,7 ; 28,7 ; 28,4 ; 28,3 ; 25,4 ; 19,8 ; 19,2 ; 7,5 ; 4,6.

IR (neat) : ν (cm^{-1}) 2929 ; 2855 ; 2170 ; 1460 ; 1356 ; 1176 ; 1017 ; 971 ; 948 ; 819 ; 724.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. Pour $C_{31}H_{54}O_3SSi$ $[M+Na]^+$: 557,3455 ; Obtenu : 557,3453.

dimethyl [24-(triethylsilyl)tetracos-10,12,23-triyn-1-yl]malonate 28 :

$C_{35}H_{58}O_4Si$
Masse : 570,92 g/mol
 R_f : 0,77 (cHex/AE 9/1)

A une solution de NaH (60% d'huile) (225 mg ; 4,94 mmol ; 1,1 eq) dans le THF anhydre (30 mL), est ajouté le diméthylmalonate (700 μ L ; 5,39 mmol ; 1,2 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à température ambiante, puis est ajouté, à l'abri de la

lumière, le mésyle **27** (2,40 g ; 4,49 mmol ; 1,0 eq) en solution dans le THF (10 mL) en une heure. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant une heure à température ambiante puis à reflux pendant 24 heures. Une fois le milieu revenu à température ambiante, une solution de HCl 1M est ajoutée (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5) pour fournir le composé **28** (2,23 g ; 85%) sous forme d'une huile jaune.

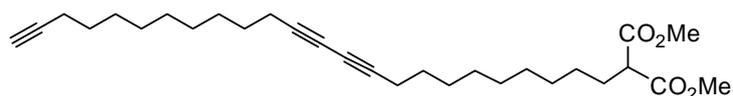
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,73 (s, 6H) ; 3,35 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,88 (m, 2H) ; 1,66-1,25 (m, 26H) ; 0,98 (t, 9H, $J = 7,8$ Hz) ; 0,56 (q, 6H, $J = 7,8$ Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 178,1 ; 77,4 ; 65,4 ; 52,5 ; 51,8 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,5 ; 27,4 ; 20,0 ; 19,3 ; 7,6 ; 4,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 2928 ; 2855 ; 5170 ; 1736 ; 1458 ; 1434 ; 1234 ; 1153 ; 1017 ; 909 ; 729.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. pour C₃₅H₅₈O₄Si [M+Na]⁺ : 593,3997 ; Obtenu : 593,3992.

dimethyl tetracos-10,12,23-triyn-1-ylmalonate **29** :



C₂₉H₄₄O₄
 Masse : 456,66 g/mol
 R_f : 0,76 (cHex/AE 9/1)

A une solution de **28** (1,50 g ; 3,04 mmol ; 1,0 eq) dans le THF (50 mL) à l'abri de la lumière, est ajouté le fluorure de tétrabutylammonium 1,0 M dans l'hexane (4,51 mL ; 4,56 mmol ; 1,5 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 4 heures à température ambiante puis neutralisé en ajoutant de l'eau (20 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*50 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10) pour fournir le composé **29** (1,15 g ; 80%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 31-32°C

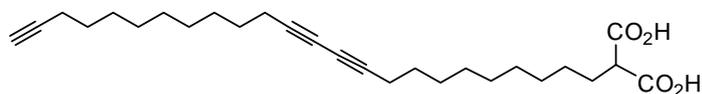
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) 3,73 (s, 6H) ; 3,34 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,92 (m, 3H) ; 1,67-1,25 (m, 26H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) 170,1 ; 77,6 ; 68,2 ; 68,1 ; 65,4 ; 51,7 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,5 ; 27,4 ; 19,3 ; 18,5.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3304 ; 2922 ; 2853 ; 1737 ; 1463 ; 1435 ; 1344 ; 1244 ; 1156 ; 1017.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₂₉H₄₄O₄ [M+H]⁺ : 495, 2871; Obtenu : 495, 2873.

tetracos-10,12,23-triyn-1-ylmalonic acid **5 :**



C₂₇H₄₀O₄
Masse : 428,60 g/mol
R_f : 0,05 (AE/MeOH 9/1)

A une solution de **29** (200 mg ; 0,44 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange THF/méthanol : 1/1 (2 mL), est ajoutée une solution aqueuse de LiOH 1M (0,52 mL ; 1,32 mmol ; 3,0 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante puis neutralisé avec une solution de HCl 1M (1 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le composé **5** est obtenu (188 mg, 95%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 94-96°C.

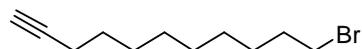
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) 3,47 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz) ; 2,23 (m, 6H) ; 1,93 (m, 3H) ; 1,66-1,25 (m, 28H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ = 175,2 ; 77,7 ; 68,2 ; 65,4 ; 51,7 ; 29,6 ; 29,4 ; 29,2 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,6 ; 28,4 ; 27,5 ; 19,3 ; 18,5.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3283 ; 2918 ; 2848 ; 1715 ; 1693 ; 1463 ; 1429 ; 1293 ; 1211 ; 917 ; 723 ; 270.

HRMS (*m/z*) : Calc. pour C₂₇H₄₀O₄ [M+H]⁺ : 429,3004 ; Obtenu : 429,3000.

11-bromoundec-1-yne **30** :



$C_{11}H_{19}Br$
Masse : 231,17 g/mol
 R_f : 0,95 (DCM)

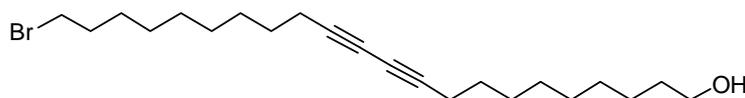
A une solution de undecyn-1-ol (1,0 g ; 5,96 mmol ; 1,0 eq) dans le dichlorométhane (20 mL) à 0°C sont ajoutés de la triphénylphosphine (1,72 g ; 6,56 mmol ; 1,1 eq) et du tétrabromure de carbone (2,17 g ; 6,56 mmol ; 1,1 eq). Le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante puis est concentré. Le résidu est repris dans l'éther diéthylique (20 mL) et le précipité est filtré. Le filtrat est alors évaporé et purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir **34** (1,43 g ; quant.) sous forme d'une huile incolore.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 3,39 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz) ; 2,19 (td, 2H, $J = 5,4$ Hz, 2,8 Hz) ; 1,94 (t, 1H, $J = 2,8$ Hz) ; 1,84 (quint., 2H, $J = 6,8$ Hz) ; 1,55-1,20 (m, 12 H).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 84,8 ; 68,2 ; 34,1 ; 32,9 ; 29,4 ; 29,1 ; 28,8 ; 28,5 ; 28,2 ; 18,5.

IR (neat) : ν (cm^{-1}) 3303 ; 2927 ; 2854 ; 1463 ; 1431 ; 1244 ; 627.

22-bromodocosa-10,12-diyn-1-ol **31** :



$C_{22}H_{37}BrO$
Masse : 397,43 g/mol
 R_f : 0,23 (cHex/AE 3/1)

A une solution d'alcyne **30** (1,37 g ; 5,92 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange méthanol/éthylamine (70% dans l'eau) 1/1 (70 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés $CuCl_2$ (63 mg, 0,01 eq) puis NH_2OH , HCl (121 mg ; 0,02 eq) ; la solution bleue devient alors jaune. Le bromo-alcyne **18** (1,61 g ; 6,51 mmol ; 1,1 eq) est alors ajouté et la solution est agitée pendant 4 heures. De la saumure (40 mL) et de l'acétate d'éthyle (40 mL) sont ajoutés et la phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*80 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme

éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/1) pour fournir le composé **31** (0,10 g ; 4%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 52°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,63 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 3,40 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 2,23 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz) ; 1,84 (quint., 2H, $J = 6,8$ Hz) ; 1,58-1,25 (m, 26H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,7 ; 63,1 ; 34,1 ; 32,9 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,2 ; 25,8 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3403 ; 3328 ; 2917 ; 2849 ; 1468 ; 1415 ; 1352 ; 1238 ; 1059 ; 1044 ; 1013 ; 981 ; 718.

MS (ESI, m/z) : 397,2-399,2 [M+H]⁺

docosa-10,12-diyn-1,22-diol **32** :



C₂₂H₃₈O₂
Masse : 334,54 g/mol
R_f : 0,18 (cHex/AE 1/1)

Procédure 1 :

A une solution de undecyn-1-ol (1,3 g ; 7,76 mmol ; 1,0 eq) dans la diéthylamine (20 mL), sont ajoutés du CuI (20 mg ; 0,78 mmol ; 0,1 eq) et du Pd Cl₂(PPh₃)₂ (110 mg ; 0,16 mmol ; 2%). Le milieu réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (5/5) pour fournir **35** (261 mg ; 20 %) sous forme d'un solide blanc.

Procédure 2 :

A une solution de undecyn-1-ol (1,00 g ; 5,95 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange méthanol/éthylamine (70% dans l'eau) 1/1 (70 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés CuCl₂ (63 mg, 0,01 eq) puis NH₂OH, HCl (121 mg ; 0,02 eq) ; la solution bleue devient alors jaune. Le bromo-alcyne **18** (1,61 g ; 6,51 mmol ; 1,1 eq) est alors ajouté et la solution est agitée pendant 4 heures. De la saumure (40 mL) et de l'acétate d'éthyle (40 mL) sont ajoutés et la

phase organique est séparée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*80 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (5/5) pour fournir le composé **32** (0,96 g ; 48%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 84°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,65 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz) ; 2,25 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz) ; 1,62-1,20 (m, 28H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,8 ; 65,6 ; 63,1 ; 32,9 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 28,2 ; 25,8 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3399 ; 3326 ; 2919 ; 2849 ; 1466 ; 1413 ; 1351 ; 1058 ; 1044 ; 983 ; 723.

MS (ESI, m/z) : 335,2 [M+H]⁺

22-hydroxydocosa-10,12-diyn-1-yl methanesulfonate **33** :



C₂₃H₄₀O₄S
Masse : 412,53 g/mol
R_f : 0,52 (DCM/AE 95/5)

A une solution d'alcool **32** (200 mg ; 0,60 mmol, 1,0 eq) dans le THF anhydre (4 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés de la triéthylamine (166 μ L ; 0,72 mmol ; 1,2 eq) et du chlorure de mésyle (50 μ L ; 0,72 mmol ; 1,2 eq). La solution est agitée pendant une heure à température ambiante puis neutralisée par une solution de carbonate de potassium (2 mL) et de l'eau (2 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir le composé **33** (101 mg ; 40 %) sous forme d'un solide blanc et **34** (75 mg ; 30 %) sous forme d'une huile jaune.

Analyses de **33** :

P_f : 72°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,20 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 3,62 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,99 (s, 3H) ; 2,22 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,73 (quint., 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 1,62-1,20 (m, 26H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,7 ; 77,6 ; 70,3 ; 65,4 ; 65,4 ; 63,1 ; 37,5 ; 32,9 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,4 ; 25,8 ; 25,5 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3401 ; 3316 ; 2918 ; 2851 ; 1468 ; 1331 ; 1164 ; 1061 ; 998 ; 962 ; 849 ; 745 ; 718 ; 618.

MS (ESI, *m/z*) : 413,2 [M+H]⁺

Analyses de **34** :

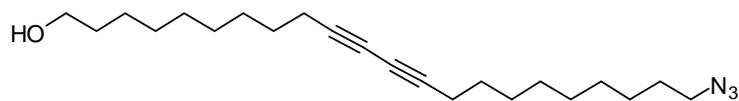
P_f : 68°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,20 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 2,99 (s, 6H) ; 2,23 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,73 (quint., 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,62-1,20 (m, 24H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,6 ; 77,4 ; 70,3 ; 65,4 ; 37,5 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,0 ; 28,8 ; 28,4 ; 25,5 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3402 ; 3316 ; 2918 ; 2851 ; 1468 ; 1332 ; 1172 ; 1163 ; 1061 ; 998 ; 962 ; 849 ; 745 ; 718.

22-azidodocosa-10,12-diyn-1-ol **35 :**



C₂₂H₃₇N₃O
Masse : 359,55 g/mol
R_f : 0,26 (DCM)

A une solution de **33** (206 mg ; 0,50 mmol) dans le DMF (10 mL), est ajouté à l'abri de la lumière de l'azoture de sodium (64 mg ; 0,99 mmol ; 2,0 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 16 heures à 80°C puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir **35** (160 mg ; 89%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 45°C

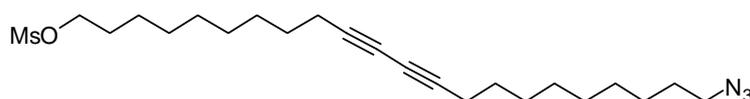
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,62 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 3,25 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz) ; 2,23 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,73-1,20 (m, 28H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,6 ; 65,4 ; 63,1 ; 51,6 ; 32,9 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,2 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,4 ; 26,8 ; 25,8 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3404 ; 3318 ; 2916 ; 2849 ; 2113 ; 1468 ; 1351 ; 1301 ; 1259 ; 1059 ; 1044 ; 981 ; 719.

MS (ESI, *m/z*) : 360,2 [M+H]⁺ ; 332,2 [(M-N₂)+H]⁺

22-azidodocosa-10,12-diyn-1-yl methanesulfonate **36** :



C₂₃H₃₉N₃O₃S
Masse : 437,64 g/mol
R_f : 0,98 (DCM)

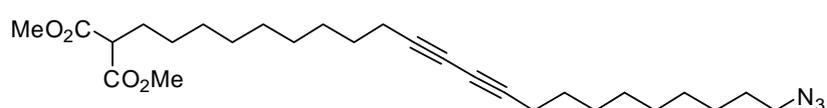
A une solution d'alcool **35** (160 mg ; 0,44 mmol, 1,0 eq) dans le THF anhydre (5 mL) à l'abri de la lumière, sont ajoutés de la triéthylamine (150 μL ; 0,55 mmol ; 1,1 eq) et du chlorure de mésyle (45 μL ; 0,55 mmol ; 1,1 eq). La solution est agitée pendant une heure à température ambiante puis neutralisée par une solution de carbonate de potassium (2 mL) et de l'eau (2 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir le composé **36** (190 mg ; 97 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 4,22 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz) ; 3,25 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz) ; 2,99 (s, 3H) ; 2,23 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,73 (quint., 2H, *J* = 6,7 Hz) ; 1,62-1,20 (m, 26H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 77,6 ; 70,3 ; 65,4 ; 51,6 ; 37,5 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,4 ; 26,8 ; 25,7 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3410 ; 3326 ; 2922 ; 2854 ; 2005 ; 1472 ; 1341 ; 1308 ; 1264 ; 1055 ; 1031 ; 975 ; 718.

Dimethyl (22-azidodocosa-10,12-diyn-1-yl)malonate **37** :



$C_{27}H_{43}N_3O_4$
 Masse : 473,65 g/mol
 R_f : 0,76 (cHex/AE 8/2)

A une solution de NaH (60% d'huile) (68 mg ; 0,47 mmol ; 1,1 eq) dans le THF anhydre (15 mL), est ajouté le diméthylmalonate (211 μ L ; 0,52 mmol ; 1,2 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à température ambiante puis est ajouté, à l'abri de la lumière, le mésyle **36** (190 mg ; 0,43 mmol ; 1,0 eq) en solution dans le THF (5 mL) en une heure. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant une heure à température ambiante puis à reflux pendant 24 heures. Une fois le milieu revenu à température ambiante, une solution de HCl 1M est ajoutée (2 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*10 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le brut est alors purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5) pour fournir le composé **37** (120 mg ; 59 %) sous forme d'une huile jaune.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 3,73 (s, 6H) ; 3,35 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz) ; 3,25 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz) ; 2,23 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz) ; 1,87 (m, 2H) ; 1,68-1,20 (m, 28H).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 170,0 ; 77,6 ; 65,4 ; 52,5 ; 51,8 ; 51,7 ; 51,6 ; 29,4 ; 29,2 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,4 ; 27,4 ; 27,3 ; 26,8 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm^{-1}) 2926 ; 2855 ; 2093 ; 1736 ; 1434 ; 1256 ; 1152.

MS (ESI, m/z) : 446,2 [(M- N_2)+H] $^+$

(22-azidodocosa-10,12-diyn-1-yl)malonic acid 6 :



$C_{25}H_{39}N_3O_4$
 Masse : 445,59 g/mol
 R_f : 0,05 (AE/MeOH 9/1)

A une solution de **37** (110 mg ; 0,23 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange THF/méthanol : 1/1 (2 mL), est ajoutée une solution aqueuse de LiOH 1M (0,27 mL ; 0,69 mmol ; 3,0 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante puis neutralisé avec

une solution de HCl 1M (1 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le composé **6** est obtenu (108 mg, quant.) sous forme d'un solide blanc.

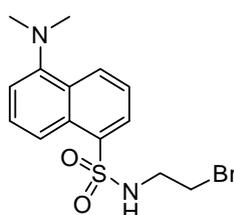
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 3,34 (t, 1H, $J = 6,9$ Hz) ; 3,26 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz) ; 2,23 (t, 4H, $J = 6,8$ Hz) ; 1,87 (m, 2H) ; 1,68-1,20 (m, 28H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 173,0 ; 77,6 ; 66,0 ; 52,5 ; 51,6 ; 33,3 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,1 ; 28,9 ; 28,4 ; 27,4 ; 27,3 ; 26,8 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3322 ; 2928 ; 2852 ; 2096 ; 1745 ; 1433 ; 1254 ; 1150.

MS (ESI, m/z) : 418,3[(M-N₂)+H]⁺

***N*-(2-bromoethyl)-5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamide **38** :**



C₁₄H₁₇BrN₂O₂S
Masse : 357,27 g/mol
R_f : 0,68 (DCM/AE 8/2)

A une solution de chlorure de dansyl (4,00 g ; 14,82 mmol ; 1,0 eq) dans le dioxane (80 mL), sont ajoutés à l'abri de la lumière du bromure de bromoéthylammonium (3,33g ; 16,30 mmol ; 1,1 eq) et de la triéthylamine (4,96 mL ; 32,60 mmol ; 2,2 eq). Le milieu réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis filtré. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir le composé **38** (4,57 g ; 86%) sous forme d'un solide jaune.

P_f : 117-119°C.

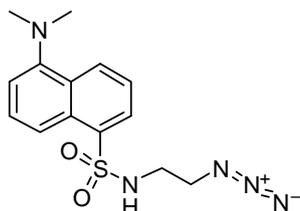
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 8,56 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz) ; 8,26 (m, 2H) ; 7,55 (m, 2H) ; 7,19 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 5,34 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz) ; 3,30 (m, 4H) ; 2,88 (s, 6H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 152,2 ; 134,6 ; 130,9 ; 130,0 ; 129,6 ; 128,7 ; 123,2 ; 118,7 ; 115,5 ; 45,5 ; 44,7 ; 31,7.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3290 ; 2923 ; 2831 ; 2787 ; 1573 ; 1453 ; 1407 ; 1312 ; 1231 ; 1201 ; 1138 ; 1073 ; 945 ; 786 ; 982 ; 622 ; 587.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. pour $C_{14}H_{17}BrN_2O_2S$ $[M+H]^+$: 379,0089 ; Obtenu : 379,0086.

***N*-(2-azidoethyl)-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide **39** :**



$C_{14}H_{17}N_5O_2S$
Masse : 319,38 g/mol
 R_f : 0,65 (DCM/AE 8/2)

A une solution de **38** (4,57 g ; 12,8 mmol ; 1 eq) dans le DMF (400 mL), est ajouté à l'abri de la lumière de l'azoture de sodium (2,50g ; 38,4 mmol ; 3,0 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 heures à 80°C puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir **39** (3,64 g ; 89%) sous forme d'une huile jaune.

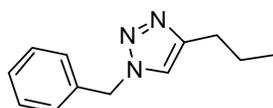
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 8,58 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz) ; 8,29 (m, 2H) ; 7,61 (m, 2H) ; 7,22 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz) ; 5,09 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz) ; 3,32 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz) ; 3,10 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz) ; 2,89 (s, 6H).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 152,4 ; 135,1 ; 131,0 ; 130,3 ; 129,9 ; 128,9 ; 123,6 ; 119,1 ; 115,7 ; 51,3 ; 45,8 ; 42,8.

IR (neat) : ν (cm^{-1}) 2943 ; 2870 ; 2833 ; 2104 ; 1588 ; 1574 ; 1456 ; 1408 ; 1321 ; 1161 ; 1144 ; 1093 ; 1074 ; 945 ; 910 ; 625 ; 571.

HRMS (ESI, m/z) : Calc. pour $C_{14}H_{17}N_5O_2S$ $[M+K]^+$: 358,0735 ; Obtenu : 358,0735.

1-benzyl-4-propyl-1*H*-1,2,3-triazole **40 :**



$C_{12}H_{15}N_3$
Masse : 201,27 g/mol
 R_f : 0,46 (DCM)

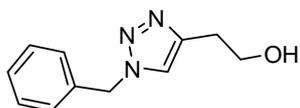
A une solution d'azoture de benzyle (133 mg ; 1,00 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange 1/1 eau/ *tert*-butanol (4mL), sont ajoutés le pent-1-yne (68 mg ; 1,0 mmol ; 1,0 eq), de l'ascorbate de sodium (42 mg ; 0,2 mmol ; 0,2 eq) et CuSO₄, 5H₂O (27 mg ; 0,2 mmol ; 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le dichlorométhane pour fournir **40** (140 mg ; 70%) sous forme d'un solide pateux beige.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7,40-7,25 (m, 3H) ; 7,21 (m, 2H) ; 7,16 (s, 1H) ; 5,46 (s, 2H) ; 2,63 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz) ; 1,62 (m, 2H) ; 0,95 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 148,6 ; 135,0 ; 129,1 ; 128,6 ; 128,0 ; 120,1 ; 54,1 ; 27,9 ; 22,8 ; 13,9.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3116 ; 3065 ; 2962 ; 2931 ; 2872 ; 1494 ; 1454 ; 1434 ; 1318 ; 1210 ; 1128 ; 1052 ; 1028 ; 824 ; 718 ; 693.

2-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)ethanol **41** :



C₁₁H₁₃N₃O
Masse : 203,24 g/mol
R_f : 0,12 (DCM)

A une solution d'azoture de benzyle (133 mg ; 1,00 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange 1/1 eau/ *tert*-butanol (4mL), sont ajoutés le but-3-yn-1-ol (70 mg ; 1,0 mmol ; 1,0 eq), de l'ascorbate de sodium (42 mg ; 0,2 mmol ; 0,2 eq) et CuSO₄, 5H₂O (27 mg ; 0,2 mmol ; 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1 pour fournir **41** (126 mg ; 62%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 90°C

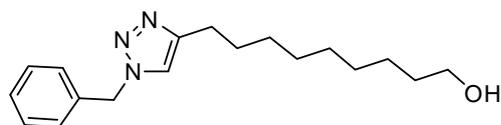
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7,34 (m, 3H) ; 7,21 (m, 2H) ; 7,18 (s, 1H) ; 5,41 (s, 2H) ; 3,67 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz,) ; 2,71 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 148,2 ; 134,6 ; 128,7 ; 128,1 ; 127,6 ; 120,5 ; 61,5 ; 53,6 ; 31,8.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3110, 3045, 2935, 2906, 2858, 1550, 1451, 1430, 1364, 1338, 1312, 1214

MS (ESI, *m/z*) : 204,2 [M+H]⁺

9-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)nonan-1-ol **42 :**



C₁₈H₂₇N₃O
Masse : 301,43 g/mol
R_f : 0,13 (DCM)

A une solution d'azoture de benzyle (133 mg ; 1,00 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange 1/1 eau/ *tert*-butanol (4mL), sont ajoutés le undécyn-1-ol (168 mg ; 1,0 mmol ; 1,0 eq), de l'ascorbate de sodium (42 mg ; 0,2 mmol ; 0,2 eq) et CuSO₄, 5H₂O (27 mg ; 0,2 mmol ; 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures à température ambiante puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1 pour fournir **42** (147 mg ; 49%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 105°C

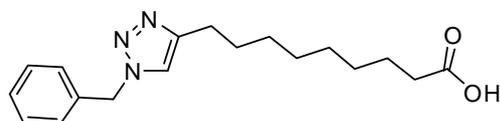
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7,33 (m, 3H) ; 7,22 (m, 2H) ; 7,18 (s, 1H) ; 5,41 (s, 2H) ; 3,63 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz,) ; 2,65 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz) ; 1,62-1,20 (m, 14H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 148,3 ; 134,5 ; 128,6 ; 128,2 ; 127,4 ; 120,4 ; 61,5 ; 53,5 ; 33,1 ; 31,8 ; 30,0 ; 29,9 ; 28,9 ; 28,8 ; 28,5 ; 25,8.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3300 ; 2918 ; 2851 ; 1455 ; 1076 ; 1025 ; 704.

MS (ESI, *m/z*) : 302,4 [M+H]⁺

9-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)nonanoic acid **43 :**



C₁₈H₂₅N₃O₂
Masse : 315,41 g/mol
R_f : 0,25 (DCM/AE 9/1)

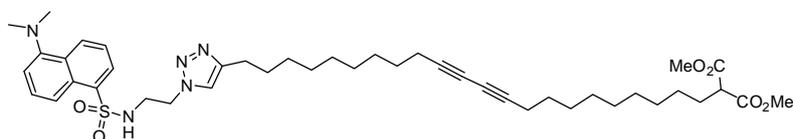
A une solution d'azoture de benzyle (133 mg ; 1,00 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange 1/1 eau/ *tert*-butanol (4mL), sont ajoutés l'acide undecyn-1-oïque (182 mg ; 1,0 mmol ; 1,0 eq), de l'ascorbate de sodium (42 mg ; 0,2 mmol ; 0,2 eq) et CuSO₄, 5H₂O (27 mg ; 0,2 mmol ; 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures à température ambiante puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 7/3 pour fournir **43** (126 mg ; 40%) sous forme d'un solide blanc.

P_f : 123°C

RMN ¹H (200 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7,73 (s, 1H) ; 7,40-7,25 (m, 5H) ; 5,52 (s, 2 H) ; 2,66 (m, 2H) ; 2,25 (t, 2H, *J* = 7,4 Hz) ; 1,62-1,50 (m, 2H) ; 1,35-1,20 (m, 8H).

RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) : δ (ppm) 178,3 ; 148,0 ; 134,9 ; 129,2 ; 128,8 ; 126,1 ; 120,7 ; 54,1 ; 40,6 ; 34,2 ; 29,4 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 25,7 ; 24,8.

dimethyl (22-{1-[2-({[5-(diméthylamino)-1-naphthyl]sulfonyl}amino)éthyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}docosa-10,12-diyn-1-yl)malonate **45 :**



C₄₃H₆₁N₅O₆S
 Masse : 776,04 g/mol
 R_f : 0,62 (DCM/AE 8/2)

A une solution d'azoture de dansyl **39** (68 mg ; 0,21 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange 1/1 eau/ *tert*-butanol (4mL), sont ajoutés l'alcyne **26** (100 mg ; 0,21 mmol ; 1,0 eq), de l'ascorbate de sodium (8,4 mg ; 0,2 eq) et CuSO₄, 5H₂O (5,3 mg ; 0,1 eq). Le milieu réactionnel est agité sous micro-ondes pendant 10 minutes à 80°C puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec comme éluant le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (9/1) pour fournir **45** (143 mg ; 85%) sous forme d'un solide jaune.

P_f : 71-73°C.

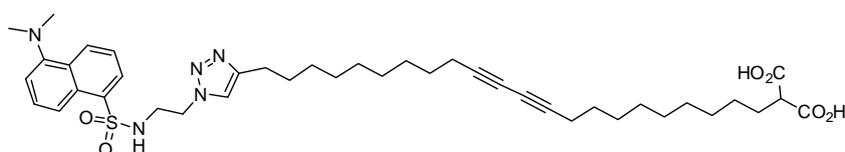
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 8,60 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz) ; 8,26 (m, 2H) ; 7,55 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz) ; 7,21 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz) ; 5,62 (bs, 1H) ; 4,36 (m, 2H) ; 3,76 (s, 6H) ; 3,45 (m, 2H) ; 3,37 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz) ; 2,91 (s, 6H) ; 2,62 (m, 2H) ; 2,24 (t, 4H, *J* = 6,0 Hz) ; 1,91 (m, 2H) ; 1,62 (m, 2H) ; 1,52 (m, 2H) ; 1,40-1,15 (m, 24H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 170,1 ; 146,5 ; 134,7 ; 130,8 ; 130,7 ; 129,9 ; 129,7 ; 129,6 ; 128,7 ; 123,4 ; 122,1 ; 115,6 ; 77,7 ; 65,4 ; 52,6 ; 51,9 ; 50,1 ; 45,6 ; 42,9 ; 42,8 ; 29,5 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,3 ; 29,2 ; 29,1 ; 29,0 ; 28,5 ; 27,4 ; 25,7 ; 19,3.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 2926 ; 2854 ; 1735 ; 1574 ; 1456 ; 1435 ; 1328 ; 1201 ; 1144 ; 1103 ; 1060 ; 914 ; 791 ; 742 ; 623.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₄₃H₆₁N₅O₆S [M+H]⁺ : 776,4415 ; found: 776,4413.

(22-{1-[2-({[5-(dimethylamino)-1-naphthyl]sulfonyl}amino)ethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}docosa-10,12-diyn-1-yl)malonic acid 44 :



C₄₁H₅₇N₅O₆S
Masse : 747,99 g/mol

A une solution de **45** (105 mg ; 0,14 mmol ; 1,0 eq) dans un mélange THF/méthanol : 1/1 (2 mL), est ajoutée une solution aqueuse de LiOH 1M (1,00 mL ; 0,98 mmol ; 7,0 eq). Le mélange réactionnel est agité pendant 48 heures à température ambiante puis neutralisé avec une solution de HCl 1M (1 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3*5 mL). Les phases organiques regroupées sont séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis concentrées. Le composé **44** est obtenu (95 mg, 95%) sous forme d'un solide pâteux jaune.

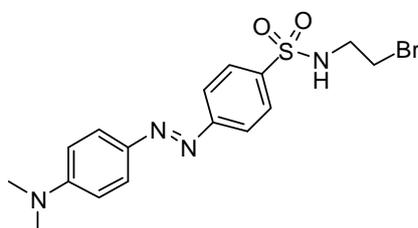
RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 8,42 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz) ; 8,13 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz) ; 8,05 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz) ; 7,44 (td, 2H, *J* = 2,8 Hz, *J* = 8,4 Hz) ; 7,21 (s, 1H) ; 7,12 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz) ; 4,91 (s, 1H) ; 4,24 (t, 2H, *J* = 5,6 Hz) ; 3,25 (3,25, 2H, *J* = 6,0 Hz) ; 3,21 (m, 1H) ; 2,74 (s, 6H) ; 2,40 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz) ; 2,11 (m, 4H) ; 1,74 (m, 4H) ; 1,40-1,15 (m, 28H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) 173,3 ; 153,1 ; 149,0 ; 136,7 ; 131,5 ; 131,2 ; 130,8 ; 130,2 ; 129,4 ; 124,5 ; 123,7 ; 120,6 ; 120,5 ; 116,6 ; 78,2 ; 66,7 ; 51,0 ; 46,0 ; 43,8 ; 30,6 ; 30,5 ; 30,4 ; 30,3 ; 30,2 ; 30,1 ; 30,0 ; 29,6 ; 28,5 ; 26,3 ; 19,9.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3325 ; 2928 ; 2855 ; 1716 ; 1574 ; 1457 ; 1326 ; 1231 ; 1161 ; 1143 ; 1119 ; 1060 ; 974 ; 790 ; 623.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₄₁H₅₇N₅O₆S [M+Na]⁺ : 770,3922 ; Obtenu : 770,3918.

(E)-N-(2-bromoethyl)-4-((4-(dimethylamino)phenyl)diazenyl)benzenesulfonamide 46 :



C₁₆H₁₉N₄O₂SBr
Masse : 410,32 g/mol
R_f : 0,32 (DCM)

A une solution de chlorure de dabsyl (1,00 g ; 3,09 mmol ; 1,0 eq) dans le dioxane (20 mL), sont ajoutés à l'abri de la lumière du bromure de bromoéthylammonium (0,70g ; 4,29 mmol ; 1,1 eq) et de la triéthylamine (1,03 mL ; 32,60 mmol ; 2,2 eq). Le milieu réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis filtré. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir le composé **46** (0,84 g ; 86%) sous forme d'un solide orange.

P_f : 132-134°C

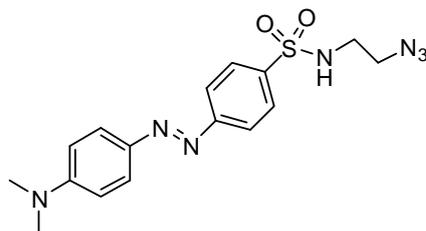
RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : δ (ppm) 8,14 (m, 1H) ; 8,00-7,80 (m, 6H) ; 6,75 (d, 2H, *J* = 9Hz) ; 4,95 (m, 1H) ; 3,44 (m, 2H) ; 3,20 (m, 2H) ; 3,12 (s, 6H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 154,9 ; 153,1 ; 142,6 ; 140,2 ; 127,8 ; 125,4 ; 122,3 ; 111,6 ; 44,4 ; 32,1.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3306 ; 2922 ; 1605 ; 1583 ; 1520 ; 1417 ; 1358 ; 1321 ; 1228 ; 1157 ; 1136 ; 1099 ; 1084 ; 1011 ; 946 ; 892 ; 843 ; 818 ; 782 ; 683.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₁₆H₁₉N₄O₂SBr [M+K]⁺ : 449,0044 ; Obtenu : 449,0041.

(E)-N-(2-azidoethyl)-4-((4-(dimethylamino)phenyl)diazenyl)benzenesulfonamide 47



C₁₆H₁₉N₇O₂S
Masse : 373,43 g/mol
R_f : 0,32 (DCM)

A une solution de **46** (0,75 g ; 1,82 mmol ; 1 eq) dans le DMF (100 mL), est ajouté de l'azoture de sodium (0,74g ; 5,48 mmol ; 3,0 eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 16 heures à 80°C puis concentré sous vide. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec le dichlorométhane comme éluant pour fournir **47** (0,50 g ; 74%) sous forme d'un solide orange.

P_f : 195-197°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 8,58 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz) ; 8,29 (m, 2H) ; 7,61 (m, 2H) ; 7,22 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz) ; 5,09 (t, 1H, *J* = 6,6 Hz) ; 3,32 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz) ; 3,10 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz) ; 2,89 (s, 6H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 152,4 ; 135,1 ; 131,0 ; 130,3 ; 129,9 ; 128,9 ; 123,6 ; 119,1 ; 115,7 ; 51,3 ; 45,8 ; 42,8.

IR (neat) : ν (cm⁻¹) 3246 ; 2913 ; 2854 ; 2149 ; 2105 ; 1666 ; 1603 ; 1583 ; 1520 ; 1452 ; 1420 ; 1364 ; 1311 ; 1162 ; 1136 ; 1085 ; 945 ; 846 ; 832 ; 813 686.

HRMS (ESI, *m/z*) : Calc. pour C₁₆H₁₉N₇O₂S [M+K]⁺ : 412,0953 ; Obtenu : 412,0954

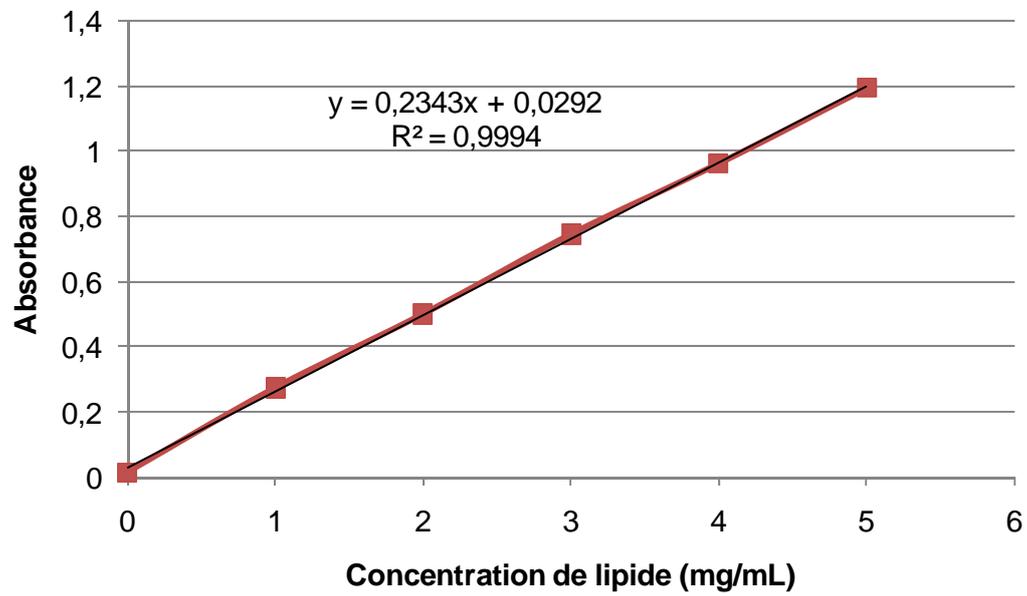
Protocole de formation des micelles polymérisées :

A 10 mL d'une solution de Tris pH = 11, sont ajoutés 50 mg de lipide. L'ensemble est alors soniqué au bain à ultra-sons (80W) pendant 30 minutes. Une fois le lipide entièrement soluble, la solution est placée sous irradiation UV (254 nm, 48 W) pendant 10 heures. Des micelles polymérisées à une concentration de 5 mg/mL sont alors obtenues.

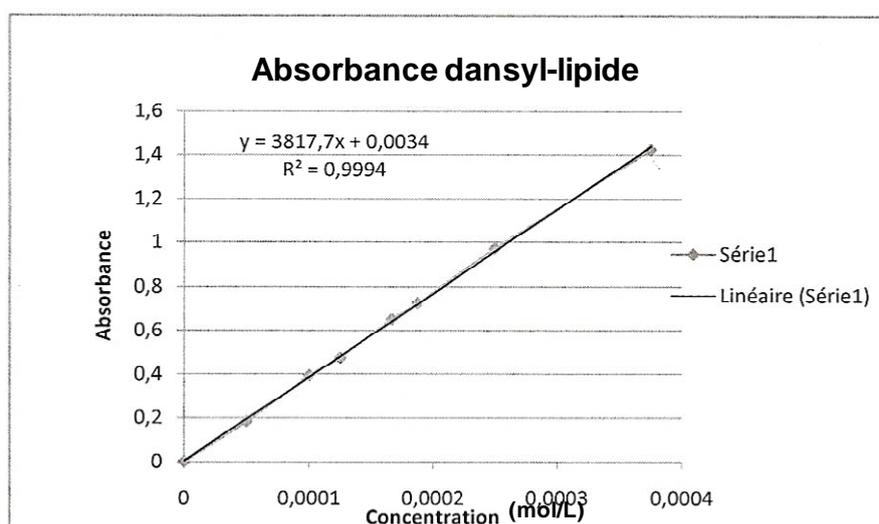
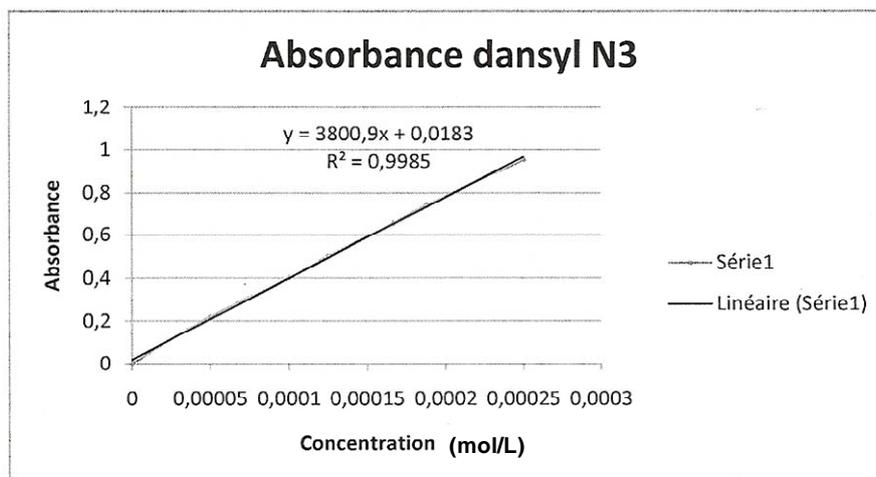
Protocole de formation des CLP :

Des nanotubes de carbone sont ajoutés dans un ratio lipide/nanotubes 1/10 à une solution de lipide dissout dans une solution de Tris à pH = 11 à une concentration de 5 mg/mL. Le mélange est alors soniqué au bain à ultra-sons (80 W) pendant 30 minutes. Le mélange ainsi obtenu est alors placé sous irradiation UV (10h, 48W, 254 nm) afin de polymériser les arrangements lipidiques. Le mélange subit un cycle de trois purifications successives (centrifugation à 14250g et mise en suspension des nanotubes de carbone dans la solution Tris pH = 11) afin d'éliminer l'excès de lipide. Le milieu est ensuite ultra-soniqué dans un mélange Tris/éther diisopropylique : 1/1 (V/V) (maximum 4 mL de solution imposé par la taille de la sonde) pendant 1h à une puissance de 240W à l'aide d'un doigt à ultra-sons (mode pulse : 9,9s on, 5,0s off). La phase organique est ensuite éliminée puis la phase aqueuse est centrifugée afin de récupérer les CLP en solution.

Courbe de calibration UV-Visible des micelles polymérisées utilisées pour la quantification de lipide adsorbé sur les nanotubes de carbone :



Courbes de calibration UV-Visible du dansyl-N₃ 39 et du composé 44 :



Annexe

PROGRAMMED DISPERSIONS OF MWNT_s IN AQUEOUS MEDIA BY COATING WITH PHOTOPOLYMERIZABLE SYNTHETIC AMPHIPHILES

Cédric Thauvin,[‡] Aurélia Perino,[‡] Emmanuel Contal,[‡] Emmanuelle Morin,^{‡,†} Patrick Schultz,[§] Stéphane Meunier,[‡] Alain Wagner^{,‡}*

Laboratory of Functional Chemo-Systems, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France. Laboratoire de Chimie Génétique, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France. Département de Biologie et Génomique Structurale, INSERM-U596, CNRS-ULP UMR7104, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-67400 France.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: wagner@bioorga.u-strasbg.fr.

[‡] Laboratory of Functional Chemo-Systems, Illkirch, France.

[†] Laboratoire de Chimie Génétique, Illkirch, France.

[§] Département de Biologie et Génomique Structurale, Illkirch, France.

C.T. and A.P. contributed equally.

This article is dedicated to the memory of Charles Mioskowski who initiated this work.

ABSTRACT.

Thanks to their amphiphilic properties, surfactants have been found to be a good alternative to disperse carbon nanotubes (CNTs) in water by adsorbing on the surface of these highly hydrophobic nanomaterials. Herein, we describe the use of anionic, nonionic and cationic photopolymerizable synthetic amphiphiles designed to obtain programmed pH dependent dispersions of CNTs in specific aqueous media. The reported process involves (1) a preliminary study concerning the solubility of these amphiphiles in defined buffers, (2) their self-assembly into hemimicellar structures on the surface of CNTs, (3) the stabilization of these labile assemblies by photopolymerization, (4) the purification of the obtained constructs and (5) their re-dispersion in the various buffers.

MANUSCRIPT TEXT.

Due to their electronic, thermal, optical and mechanical properties, carbon nanotubes (CNTs) are of a great interest in various fields including nano-electronics,^{1,2} polymer reinforcement,³⁻⁵ biosensors^{6,7} and field emission devices.⁸ However, stable dispersions of CNTs are very difficult to observe since pristine CNTs easily aggregate due to strong van der Waals attractions.⁹ Thus, many studies have been dedicated in the dispersion of CNTs in different media and more especially in aqueous media. They usually refer to two approaches: covalent modification^{10,11} of CNTs surface and non-covalent complexation *via* adsorption of surfactants^{12,13} or synthetic lipids,¹⁴⁻¹⁷ π - π interactions with aromatic compounds,^{18,19} wrapping with polymers,^{20,21} proteins^{22,23} or DNA.²⁴ Moreover, it has been reported that these dispersions can respond to external stimuli such as concentration, temperature or pH depending on the nature of the resulting CNTs envelop.

Our group is focused on the non-covalent approach and especially on the adsorption of synthetic amphiphiles²⁵ which present interesting advantages since the structure of CNTs remains unchanged. We recently demonstrated²⁶ that rather stable dispersions of single-walled carbon nanotubes (SWNTs), double-walled carbon nanotubes (DWNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) could be obtained in basic aqueous solution such as TRIS pH8 buffer using polymerizable amphiphile **2** (Fig. 1a).

This amphiphile possesses important key features: it self-assembles into hemimicellar structures on the surface of CNTs and it allows a photopolymerization step under UV irradiation²⁷ to stabilize these assemblies (Fig. 1a and 1b) contrary to usual reported surfactants such as SDS or CTAB.^{13,25}

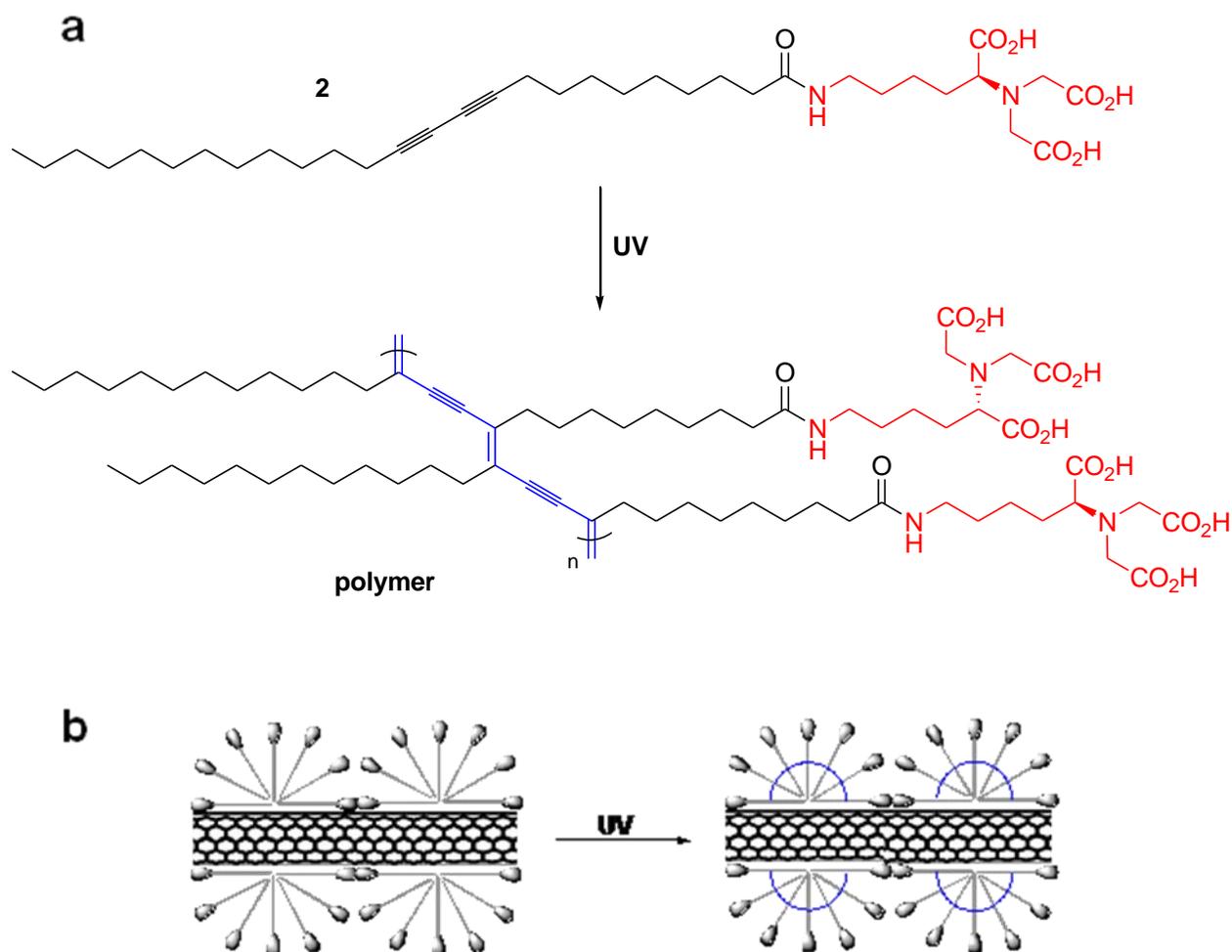


Figure 1. Polymerization of the hemimicellar assemblies on the surface of CNTs. (a) Synthetic amphiphile **2** and polymer representation (the NTA moieties are shown in red and the crosslink in blue). (b) Schematic section view of a carbon nanotube and polymerized hemimicellar assemblies (the NTA moieties are shown as grey balls, the amphiphile chains are symbolized as straight grey lines and the crosslink is symbolized as curved blue lines).

Building on these preliminary results, we decided to assess if various photopolymerizable amphiphiles, bearing other hydrophobic polar heads than NTA, would also self-assemble on the surface

of CNTs, if the self-assemblies would stand the photopolymerisation conditions and finally if those groups would yield specific dispersion properties. Thus, four specific amphiphiles (Fig. 2) were designed and synthesized (Supporting Information). They were all obtained from commercially available 10-12 pentacosadiynoic acid (PCDA) and consequently bear the same hydrophobic photopolymerizable tail able to interact with the CNTs surface. The different functions of these polar heads - malonic (**1**), NTA (**2**), PEG-8 (**3**) and amine (**4**) - were chosen for their particular solubility properties in aqueous media, depending on the pH. We thus expect that the resulting CNTs/Photopolymerized Lipidic Assemblies (PLA) constructs will show a wide range of pH dependent solubility and will ideally be correlated to the lipid polar head physicochemical properties.

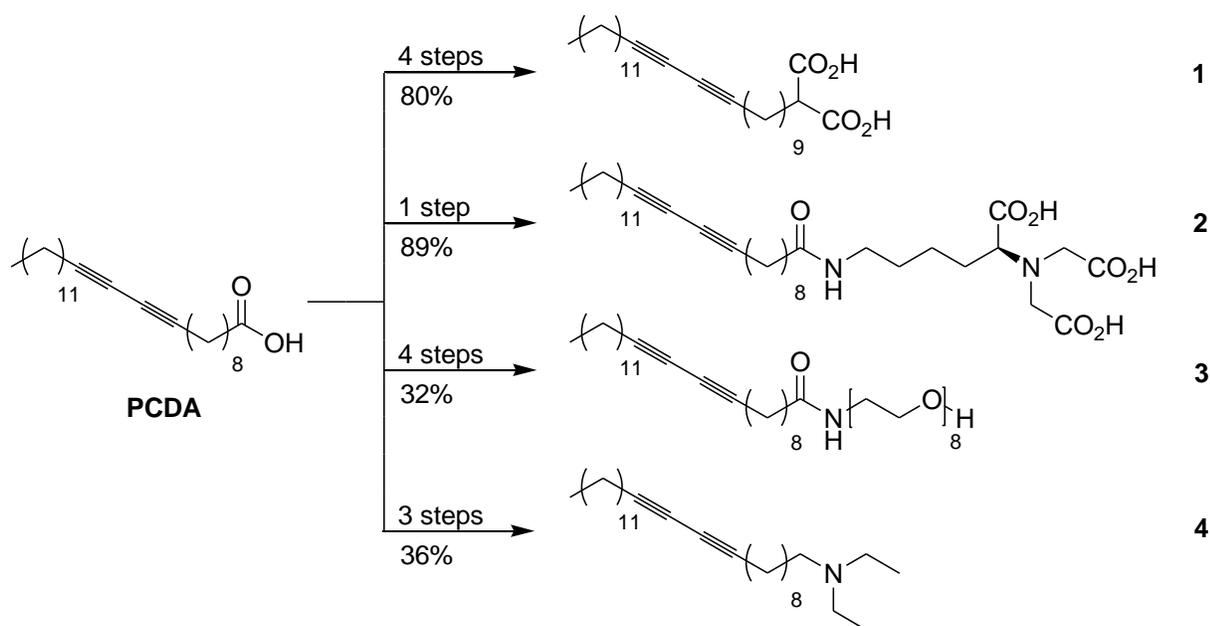


Figure 2. Chemical structures of amphiphiles used in this study (number of steps and overall yields are indicated on the arrows).

Because the formation of micelles is a key step for the obtaining of CNTs/PLA constructs,²⁵ the ability of each amphiphile to form micelles was first evaluated in four aqueous solvents - acetate pH4.7 buffer,

HEPES pH7.4 buffer, TRIS pH8 buffer and TRIS pH11 buffer (Supporting Information) - which cover a large part of the pH scale. 3 mg of each amphiphile were dissolved in 1 mL of buffer and sonicated for 30 minutes in a bath sonicator (80 W). Samples were then submitted to dynamic light scattering (DLS) analysis. Amphiphiles were considered as forming micelles only when particles with a diameter around 10 nm were observed (Table 1).

Table 1. Ability of each amphiphile to form micelles in the four buffers as assessed by DLC.

Amphiphiles	Formation of micelles in the four buffers (pH)			
	Acetate (4.7)	HEPES (7.4)	TRIS (8)	TRIS (11)
1	no	no	no	yes
2	no	yes	yes	yes
3	yes	yes	yes	yes
4	yes	no	no	no

As anticipated, amphiphiles **1**, **2** and **4** give micelles only when their polar head are in their ionic form so above pH11 for **1**, above pH7.4 for **2** and below pH4.7 for **4**. Meanwhile, amphiphile **3** forms micelles whatever the pH is.

We then engaged all these amphiphiles in a CNTs coating process following a systematic scheme. Typically, amphiphile (6 mg) and MWNTs (36 mg) were sonicated in a bath sonicator (80 W) for 30 minutes in 2 mL of buffer which enable the formation of micelles as defined in table 1: **1** in TRIS pH11 buffer, **2** in TRIS pH8 buffer, **3** in HEPES pH7.4 buffer, **4** in acetate pH4.7 buffer. The different samples were then irradiated under a UV light (254 nm) for 10 hours. Characterization of the resulting dispersions of CNTs/PLA constructs was carried out by transmission electron microscopy (TEM) (Fig.3).

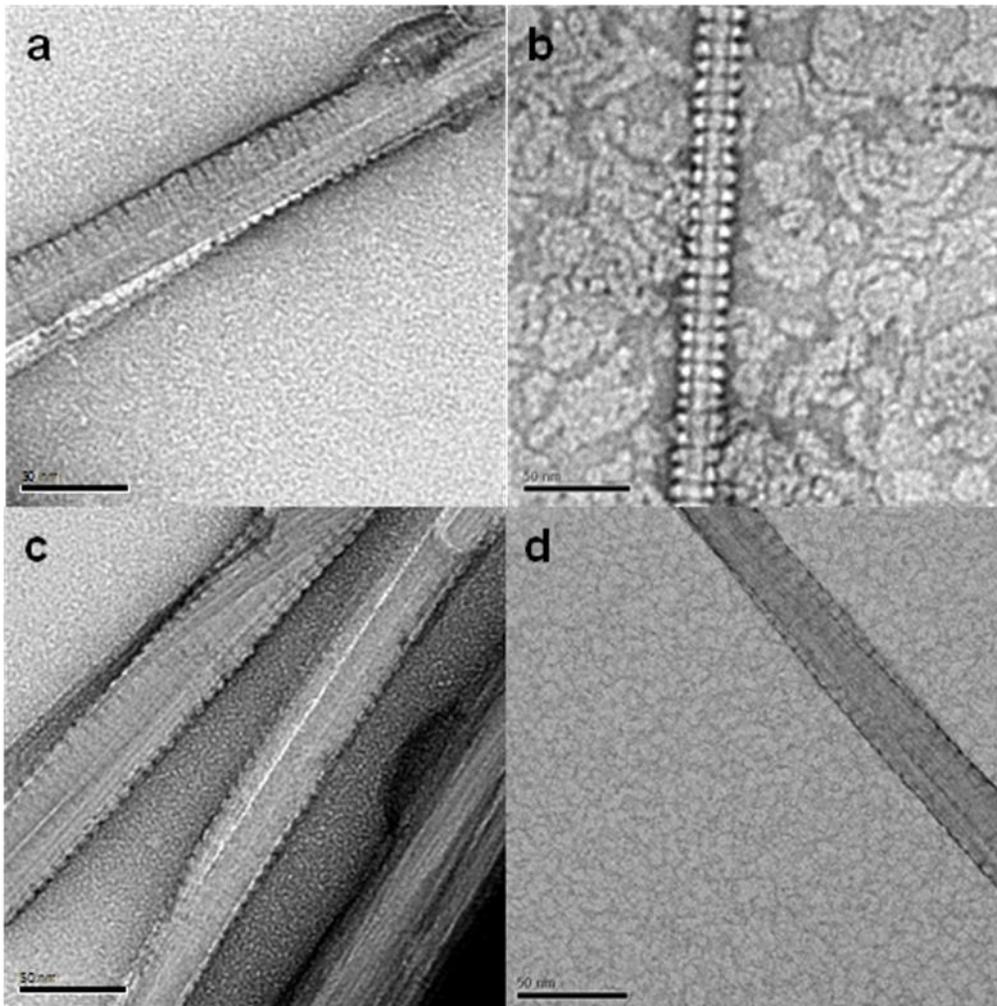


Figure 3. TEM pictures of crude CNTs/PLA constructs obtained from amphiphiles (a) **1** in TRIS pH11 buffer, (b) **2** in TRIS pH8 buffer, (c) **3** in HEPES pH7.4 buffer and (d) **4** in acetate pH4.7 buffer.

TEM pictures of each sample show isolated MWNTs fully covered by regular striations perpendicular to the nanotube axes which correspond to amphiphiles self-organizations. This observation shows that the CNTs coating process, previously reported only for lipid **2**, could be generalized to amphiphiles bearing diverse polar heads. As controlled experiment, we checked that without the presence of amphiphiles, CNTs precipitate directly after the sonication step.

In order to draw a relation between the solubility of amphiphiles exposed in table 1 and the achievement of stable dispersions of CNTs, each of these four samples was then divided in four equal samples and centrifuged 90 minutes at 14000×g to remove the original buffer. CNTs/PLA constructs

were then dispersed in the four buffers (2 mL) previously cited. Final concentrations of lipid and MWNTs reach respectively 1.5 mg/mL and 4.5 mg/mL. The behavior of the different samples regarding their decantation was followed over a period of several weeks (Fig. 4).

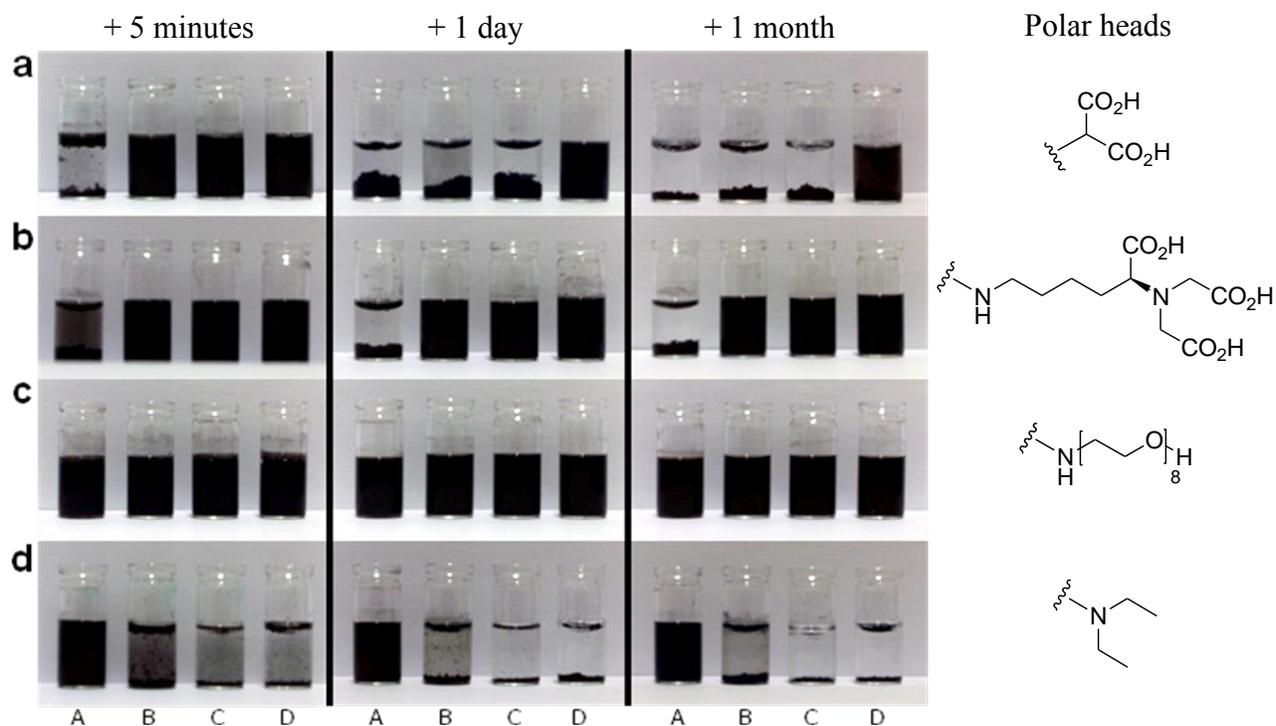


Figure 4. Dispersions of MWNTs by coating with amphiphiles (a) **1**, (b) **2**, (c) **3** and (d) **4** in (A) acetate pH4.7 buffer, (B) HEPES pH7.4 buffer,²⁸ (C) TRIS pH8 buffer and (D) TRIS pH11 buffer after (left) 5 minutes, (middle) 1 day and (right) 1 month of decantation.

Vials presented in figure 4 correspond to all possible combinations of CNTs/PLA constructs in the different buffers after 5 minutes, 1 day and 1 month of decantation. After 5 minutes, black dispersions are observed with **1** and **2** in neutral and basic media, with **3** in all media and with **4** only in the acidic medium. But, a very light grey dispersion of **1** and a grey dispersion of **2** in acidic medium and a less and less stable dispersion of **4** when pH is increasing are observed. After 1 day, and more particularly after 1 month, depending on the kinetic of decantation, the same dispersions are observed except when **1** is used in neutral and TRIS pH8 buffers. In the other cases, MWNTs are aggregated. Thus, these results are correlated to the ability of amphiphiles to form micelles as presented in table 1. Moreover, we can

notice that these dispersions show a high stability because they are still observed after a few months. The only notable exception is found for CNTs/PLA constructs obtained from **1** in TRIS pH11 buffer where the dispersion seems to slowly precipitate while amphiphile has been proved to nicely form micelles.

Finally, in order to evaluate the reversibility of the pH dependent properties of the CNTs/PLA constructs, a sample obtained from amphiphile **1** in TRIS pH11 buffer was engaged, as an example, in five successive cycles of (1) centrifugation at 14000×g for 20 minutes and removal of the suitable buffers, (2) dispersion in the non-suitable buffer, (3) centrifugation at 14000×g for 3 minutes and removal of the non-suitable buffer, (4) dispersion in the suitable buffer. According to figure 4, we defined the suitable buffer to be the starting buffer, and the non-suitable buffer to be acetate pH4.7 buffer. We controlled, at the end of the process, that a stable dispersion of MWNTs is still observed after 1 day of decantation, showing that changing the pH of the media do not alter the pH dependent properties of the CNTs/PLA constructs.

In summary, four synthetic amphiphiles containing a constant photopolymerizable lipophilic tail and various hydrophilic polar heads have been designed and synthesized for the pH dependent dispersion of MWNTs. By self-assembling on the hydrophobic surface of MWNTs, these four amphiphiles form hemimicellar structures. The resulting MWNTs/PLA constructs are stabilized by photopolymerization to lead stable dispersions of high weight fraction of MWNTs in aqueous media. Concerning their solubility, these MWNTs/PLA constructs have been proved to have the same pH dependency as the amphiphiles used in the coating process and to be reversibly switched between a dispersed and a aggregated state by changing the pH. This opens interesting perspectives to develop supramolecular systems for programmed CNTs dispersion responding to an external stimulus.

Acknowledgment. This research was supported by CHANEL Research and Technology Group. We would like to thank Jean-Roger Desmurs for helpful discussions.

Supporting Information Available. Protocols for the syntheses of amphiphiles **1**, **2**, **3** and **4** are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES.

1. Avouris, P.; Chen, Z.; Perebeinos, V. *Nature Nanotech.*, **2007**, *2*, 605-615.
2. Futaba, D. N.; Hata, K.; Yamada, T.; Hiraoka, T.; Hayamizu, Y.; Kakudate, Y.; Tanaike, O.; Hatori, H.; Yumura, M.; Iijima, S. *Nature Mater.*, **2006**, *5*, 987-994.
3. Du, Y.; Hu, N.; Zhou, H.; Li, P.; Zhang, P.; Zhao, X.; Dang, G.; Chen, C. *Polym. Int.*, **2009**, *58*, 832-837.
4. Bredeau, S.; Peeterbroeck, S.; Bonduel, D.; Alexandre, M.; Dubois, P. *Polym. Int.*, **2008**, *57*, 547-553.
5. Grossiord, N.; Loos, J.; Regev, O.; Koning, C. E. *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 1089-1099.
6. Peng, G.; Tisch, U.; Haick, H. *Nano Lett.*, **2009**, *9*, 1362-1368.
7. Zilberman, Y.; Tisch, U.; Pisula, W.; Feng, X.; Müllen, K.; Haick, H. *Langmuir*, **2009**, *25*, 5411-5416.
8. Chen, P. Y.; Chen, C. H.; Wu, J. S.; Wen, H. C.; Wang, W. P. *Nanotechnology*, **2007**, *18*, 395203.
9. Terrones, M.; Terrones, H.; Banhart, F.; Charlier, J. -C.; Ajayan, P. M. *Science*, **2000**, *288*, 1226-1229.
10. Singh, P.; Campidelli, S.; Giordani, S.; Bonifazi, D.; Bianco, A.; Prato, M.; *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 2214-2230.

11. Hirsch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1853-1859.
12. Shin, J. -Y.; Premkumar, T.; Geckeler, K. E. *Chem. Eur J.*, **2008**, *14*, 6044-6048.
13. Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 1379-1382.
14. Wallace, E. J.; Sansom, M. S. P. *Nanotechnology*, **2009**, *20*, 045101.
15. Mackiewicz, N.; Surendran, G.; Remita, H.; Keita, B.; Zhang, G.; Nadjo, L.; Hagege, A.; Doris, E.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 8110-8111.
16. Ke, P. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, *9*, 439-447.
17. Islam, M. F.; Rojas, E.; Bergey, D. M.; Johnson, A. T.; Yodh, A. G. *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 269-273.
18. Assali, M.; Pernia Leal, M.; Fernandez, I.; Baati, R.; Mioskowski, C.; Khiar, N. *Soft Matter*, **2009**, *5*, 948-950.
19. Marquis, R.; Greco, C.; Sadokierska, I.; Lebedkin, S.; Kappes, M. M.; Michel, T.; Alvarez, L.; Sauvajol, J. -L.; Meunier, S.; Mioskowski, C. *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 1830-1835.
20. Nish, A.; Hwang, J. -Y.; Doig, J.; Nicholas, R. J. *Nature Nanotech.*, **2007**, *2*, 640-646.
21. Wang, D.; Chen, L. *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 1480-1484.
22. Nepal, D.; Geckeler, K. E.; *Small*, **2007**, *7*, 1259-1265.
23. Kim, H. -S.; Yoon, S. H.; Kwon, S. -M.; Jin, H. -J. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 82-86.
24. Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; Mclean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G. *Nature Mater.*, **2003**, *2*, 338-342.
25. Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski C. *Science*, **2003**, *300*, 775-778.

26. Contal, E.; Morère, A.; Thauvin, C.; Perino, A.; Meunier, S.; Mioskowski, C., Wagner A. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, in press.

27. Thauvin, C.; Rickling, S.; Schultz, P.; Célia, H.; Meunier, S.; Mioskowski, C. *Nature Nanotech.*, **2008**, *3*, 743-748.

28. Because an odd behavior of MWNTs/PLA constructs obtained from amphiphile **1** when they are dispersed in HEPES buffer, we used PBS pH7.4 buffer with this amphiphile. This result, ascribed to the non saline properties of HEPES buffer, is under investigations and will be published in due course.