



THESE

**Synthèse et étude d'auto-arrangements  
d'amphiphiles diacétyléniques : des micelles aux  
nanotubules**

Présentée par

**Aurélia PERINO**

Ingénieur ECPM

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur en sciences de l'Université de Strasbourg**

Soutenue le 17 Décembre 2010 devant la commission d'examen :

Pr. Alain Brisson  
Dr. Eric Doris  
Dr. Alberto Bianco  
Dr. Andrey Klymchenko  
Dr. Alain Wagner

Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examineur  
Membre invité  
Directeur de thèse



# Remerciements

---

Tout d'abord, je tiens à remercier Alain Wagner pour avoir encadré mon travail et pour sa patience durant la correction de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes travaillant à l'Institut Charles Sadron qui m'ont expliqué patiemment les notions auxquelles ils m'ont initiée : Philippe Mesini, pour toute l'étude sur les nanotubules de lipides et Marc Schmutz pour les observations en Cryo-MET ; Alain Rameau et Catherine Foussat, pour les analyses de SEC et Pascal Marie, pour les mesures de tension de surface.

J'adresse un profond remerciement à Andrey Klymchenko qui m'a appris les techniques de fluorescence et qui a cherché à mettre mon travail en valeur, tout au long de ma thèse, en trouvant des possibilités d'application pour mes objets. Je remercie aussi toute l'équipe d'Yves Mély pour leur accueil pendant mes nombreuses excursions dans leur laboratoire. Je pense plus particulièrement à Zeinab Darwich pour les manipulations sur les cellules.

Je remercie également Christine Ruhlman pour son attention durant toutes mes séances de MET, ainsi que son directeur de laboratoire, Patrick Schultz.

D'autre part, je souhaite remercier les équipes du CEA avec lesquelles j'ai collaboré sur le projet nanorings : Eric Doris, Frédéric Ducongé et Bernard Tavitian, ainsi qu'à la région Alsace qui a financé ce projet.

Je remercie également Françoise Pons, pour les tests de cytotoxicité des nanotubes qu'elle et son thésard, Pierre-Edouard Kastner, ont effectués avec une grande efficacité.

J'adresse aussi un profond remerciement à David Brasse et Ali Ouadi pour les tests *in vivo* réalisés par chélation du technétium sur les micelles.

Je tiens aussi à remercier les personnels du service commun d'analyse de la faculté de pharmacie : Cyril Antheaume, pour la spectroscopie RMN ; Pascale Buisine et Patrick Wehrung pour la spectrométrie de masse.

Je remercie également les thésards du laboratoire, spécialement Laure et Samira, pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble et qui ont apporté du soleil dans mes journées grâce à nos parties de rire quotidiennes.

Je remercie du fond du coeur ma famille, mon père, ma mère, ma sœur et mes grands parents, pour leur soutien, même à distance, et bien sur Cédric, qui a été un appui de tous les jours.

Pour finir, je remercie les différents membres du jury de cette thèse : le Pr. Alain Brisson, le Dr. Eric Doris, le Dr. Alberto Bianco et le Dr. Andrey Klymchenko, pour avoir accepté de juger mon travail.

# Sommaire

---

<b>Abréviations</b>	1
<b>Avant-propos</b>	5
<b>Chapitre 1 : Introduction générale</b>	7
<b>I. Les amphiphiles et leurs auto-arrangements</b>	9
I.1. Les amphiphiles : définition	9
I.2. Les auto-arrangements d'amphiphiles	10
I.2.1. En milieu aqueux	10
I.2.2. A l'interface liquide/solide	11
<b>II. Les micelles sphériques de copolymères</b>	11
II.1. Formation des micelles de copolymères	12
II.2. Les différents types de micelles de copolymère	12
II.2.1. Les micelles de copolymère simples	13
II.2.2. Les micelles de copolymères réticulées	14
II.2.2.a. Les micelles de copolymères réticulées par le cœur	14
II.2.2.b. Les micelles de copolymère réticulées par la couronne	15
II.2.2.c. Les micelles de copolymères réticulées en surface	16
II.3. Techniques de caractérisation des micelles de copolymères	18
II.3.1. Diffusion dynamique de la lumière	18
II.3.2. Microscopie électronique à transmission, microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique	20
II.3.3. Détermination de la CMC	21
II.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique	24
II.4. Applications des micelles de copolymères	25
II.4.1. Utilisation thérapeutique	25
II.4.2. Utilisation en tant qu'agent d'imagerie	26
II.4.2.a. Scintigraphie gamma et résonance magnétique	27
II.4.2.b. Tomographie aux rayons X	28
II.5. Conclusion sur les micelles sphériques	29
<b>III. Les nanotubules de lipides</b>	29
III.1. Formation des nanotubules de lipides	29
III.2. Les nanotubules de lipides polymérisables	31
III.2.1. Formation des polydiacétylènes conjugués	31

III.2.2. Techniques de caractérisation des nanotubules de lipides polymérisables	32
III.2.2.a. Microscopie électronique à transmission	32
III.2.2.b. Etudes par spectrophotométrie UV-visible	33
III.2.2.c. Etudes par spectrométrie infra-rouge	34
III.3. Applications	34
<b>IV. Les auto-arrangements à la surface de nanotubes de carbone</b>	<b>36</b>
IV.1. Formation et caractérisation	36
IV.2. Applications	38
IV.2.1. Dispersion des nanotubes de carbone en solution aqueuse	38
IV.2.2. Les constructions lipidiques polymérisées	39
<b>V. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées</b>	<b>43</b>
V.1. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées à partir de polymères fonctionnalisés	43
V.1.1. Exemples de polymères fonctionnalisés	43
V.1.2. Formation des micelles	44
V.2. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées par fonctionnalisation de micelles préformées	45
V.2.1. Fonctionnalisation covalente de micelles préformées	46
V.2.1.a. Introduction de thiols sur des micelles préformées par couplage peptidique	47
V.2.1.b. Introduction d'azides sur des micelles préformées par couplage peptidique	49
V.2.2. Fonctionnalisation non covalente de micelles préformées	51
V.3. Applications des micelles sphériques fonctionnalisées	52
<b>VI. Conclusion</b>	<b>54</b>
<b>Références</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre 2 : Préparation de micelles sphériques             par photopolymérisation d'amphiphiles             diacétyléniques à tête polaire NTA</b>	<b>61</b>
<b>I. Mécanisme de polymérisation des polydiacétylènes</b>	<b>63</b>
<b>II. Etude de la photo-polymérisation de l'amphiphile diacétylénique             à tête polaire NTA dans les micelles sphériques</b>	<b>66</b>
II.1. Préparation des micelles	67
II.2. Etude comparative de la structure des micelles avant et après photopolymérisation	69

II.2.1. Analyse par diffusion dynamique de la lumière et microscopie électronique à transmission	69
II.2.2. Analyse par diffusion des neutrons aux petits angles	70
II.2.3. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique	72
II.2.4. Détermination des concentrations micellaires critiques	75
II.2.5. Etude de l'encapsulation d'une molécule hydrophobe	77
II.2.6. Etude du comportement dans un mélange avec un solvant organique	79
II.2.7. Conclusion	82
<b>III. Vers des structures photopolymérisables et réticulables</b>	82
III.1. Vers la synthèse d'un réticulant bibrin	83
III.2. Vers la synthèse d'un amphiphile réticulant muni d'un pont disulfure ou d'un thiol	88
III.2.1. Vers la synthèse d'un amphiphile bibrin comportant un pont disulfure	88
III.2.2. Vers la synthèse d'un amphiphile monobrin comportant un thiol	92
<b>IV. Conclusion</b>	94
<b>Références</b>	95
<b>Chapitre 3 : Fonctionnalisation de micelles polydiacétyleniques</b>	
<b>Etude de leur comportement sur cellules et <i>in vivo</i></b>	99
<b>I. Etude de la fonctionnalisation de surface des MP<sub>NTA</sub></b>	101
I.1. Principe	101
I.2. Etude de la fonctionnalisation de surface par fixation d'amines primaires	102
I.2.1. Principe	102
I.2.2. Choix de la méthode de purification	103
I.2.3. Méthode de dosage	104
I.2.4. Mise au point des conditions de couplage	106
I.2.4.a. Couplage en milieu aqueux	106
I.2.4.b. Couplage en milieu organique	109
I.2.4.b.α. Purification en milieu aqueux	109
I.2.4.b.β. Purification en milieu organique	111
I.2.5. Conclusion	113
I.3. Etude de la fonctionnalisation par fixation de sonde fluorescente	114
I.3.1. Principe	114
I.3.2. Etude des conditions de couplage	114
I.3.2.a. Couplage en milieu aqueux	114
I.3.2.b. Couplage en milieu organique	116
I.3.2.c. Analyse par DLS et par spectroscopie de corrélation de fluorescence	117

<b>II. Etude de la fonctionnalisation externe des micelles possédant une tête polyéthylène glycol</b>	119
II.1. Synthèse et caractérisation des micelles formées de l'amphiphile <b>23</b> avant et après polymérisation	120
II.1.1. Synthèse de l'amphiphile <b>23</b> et formation des $MNP_{PEG-OH}$	120
II.1.2. Détermination de la concentration micellaire critique des $MP_{PEG-OH}$	121
II.1.3. Formation et analyses des micelles polymérisées $MP_{PEG-OH}$	124
II.1.3.a. DLS, MET et potentiel Zeta	124
II.1.3.b. Chromatographie d'exclusion stérique	124
II.2. Synthèse et caractérisation des micelles mixtes formées des amphiphiles <b>23</b> et <b>25</b>	126
II.2.1. Synthèse et caractérisation des micelles formées de l'amphiphile <b>25</b>	126
II.2.2. Détermination de la concentration micellaire critique des $MNP_{PEG-acide}$	127
II.2.3. Formation et analyses des micelles polymérisées $MP_{PEG-acide}$	128
II.3. Synthèse et caractérisation des micelles mixtes formées des amphiphiles <b>23</b> et <b>25</b> avant et après polymérisation	129
II.3.1. Formation et analyses des micelles mixtes $MNP_{PEG-mixtes}$	129
II.3.2. Détermination de la concentration micellaire critique des micelles mixtes $MNP_{PEG-acide}$	130
II.3.3. Formation et analyses des micelles mixtes polymérisées $MP_{PEG-mixtes}$	131
II.4. Etude de la fonctionnalisation de surface des micelles mixtes polymérisées $MP_{PEG-mixte}$	131
II.4.1. Etude des conditions de couplage	131
II.4.2. Analyse par DLS et par spectroscopie de corrélation de fluorescence	133
<b>III. Encapsulation d'une sonde fluorescente dans les micelles <math>MP_{PEG-OH}</math></b>	135
III.1. Encapsulation du NR12S dans les micelles $MP_{PEG-OH}$	136
III.1.1. Analyse des spectres de fluorescence du NR12S en présence de micelles $MP_{PEG-OH}$	136
III.1.2. Analyses par spectroscopie de corrélation de fluorescence des micelles $MP_{PEG-OH}$ contenant du NR12S	138
III.2. Etude sur cellules des $MP_{PEG-OH}$ marquées par encapsulation de NR12S	139
III.2.1. Etude la cytotoxicité des $MP_{PEG-OH}$	139
III.2.2. Comportement des $MP_{PEG-OH}$ au contact de cellules HeLa	141
<b>IV. Etude de la distribution in vivo des micelles polydiacétyleniques par tomographie à émission monophotonique</b>	145
IV.1. Etude de la fixation du technétium sur les $MP_{NTA}$	145
IV.2. Etude de la biodistribution de différents types de micelles polydiacétyléniques après chélation du technétium	147
<b>V. Conclusion</b>	150
<b>Références</b>	151



<b>Chapitre 4 : Dispersion de nanotubes de carbone en solution aqueuse et obtention des constructions lipidiques polymérisées</b>	155
<b>I. Dispersion de nanotubes de carbone en solution aqueuse</b>	158
I.1. Synthèse des amphiphiles	159
I.2. Dispersion des nanotubes de carbone nTec par auto-arrangement d'amphiphiles diacétyléniques	161
I.2.1. Etude de la formation des micelles dans différents tampons	161
I.2.2. Observations des auto-arrangements des amphiphiles synthétisés sur les nanotubes de carbone nTec en MET	162
I.2.3. Etude des suspensions de nanotubes de carbone nTec en fonction de l'amphiphile choisi et du pH de la solution	163
I.3. Conclusion	165
<b>II. Evaluation de la cytotoxicité des nanotubes de carbones nTec habillés par des amphiphiles diacétyléniques</b>	166
II.1. Evaluation de la cytotoxicité des NTC couverts des différents amphiphiles sur les cellules Calu-3 et 16HBE	167
II.2. Conclusion	172
<b>III. Formation et fonctionnalisation des constructions lipidiques polymérisées</b>	172
III.1. Constructions lipidiques polymérisées de l'amphiphile A1	172
III.2. Constructions lipidiques polymérisées de l'amphiphile A3	174
<b>IV. Conclusion</b>	176
<b>Références</b>	178
<b>Chapitre 5 : Etude structurale de nanotubules formés à partir d'amphiphiles diacétyléniques</b>	181
<b>I. Synthèse de l'amphiphile 10</b>	184
<b>II. Etude des auto-arrangements de l'amphiphile 10</b>	185
II.1. Propriétés de solubilité	185
II.2. Etude du gel	186
II.2.1. Mesure de l'enthalpie de dissociation du gel par calorimétrie différentielle à balayage	187
II.2.2. Etude des interactions dans le gel par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier	188
II.2.3. Etude des solutions d'amphiphile 10 en MET et Cryo-MET	193
II.3. Etude du polymère de l'amphiphile 10	196
II.3.1. Mesure de l'enthalpie de dissociation du polymère par calorimétrie	

différentielle à balayage	197
II.3.2. Etude des interactions dans le polymère par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier	199
II.3.3. Etude de la structure du polymère en MET et Cryo-MET	201
II.3.4. Etude du polymère par spectrométrie UV-visible	203
II.3.4.a. Chauffage d'une solution de polymère	203
II.3.4.b. Refroidissement d'une solution de polymère après le chauffage à 90°C	206
<b>III. Conclusion</b>	208
<b>Références</b>	209
<b>Conclusion générale</b>	211
<b>Partie expérimentale</b>	217
<b>I. General procedure</b>	219
I.1. Chemistry	219
I.2. Analysis	219
<b>II. Experimental results</b>	221
II.1. Synthesis and polymerization of micelles	221
II.2. Encapsulation of NR12S in MP <sub>PEG-OH</sub> micelles and <i>in vitro</i> studies	221
II.3. Synthesis	222

# Abréviations

---

ADC : agent de couplage	MNP <sub>NTA</sub> : amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête NTA auto-arrangés sous forme de micelles sphériques
CLP : construction lipidique polymérisée	
CMC : concentration micellaire critique	
DC <sub>8,9</sub> PC : 1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine	MNP <sub>PEG-acide</sub> : amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête PEG acide auto-arrangés sous forme de micelles sphériques
DLS : diffusion de la lumière	
DNPC : 1,2-bis(dinonaoyl)- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine	
DSC : calorimétrie différentielle à balayage	MNP <sub>PEG-mixte</sub> : amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête mixte PEG hydroxyle et PEG acide auto-arrangés sous forme de micelles sphériques
eq : équivalent	
FITC : fluorescéine isothiocyanate	
FTIR : spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	MNP <sub>PEG-OH</sub> : amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête PEG hydroxyle auto-arrangés sous forme de micelles sphériques
MEB : microscopie électronique à balayage	
MET : microscopie électronique à transmission	MP <sub>NTA</sub> : amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête NTA auto-arrangés sous forme de micelles sphériques et polymérisés
MFA : microscope à force atomique	
M : concentration en mole/litre	
mM : concentration en millimole/litre	

MP<sub>PEG-acide</sub> : amphiphiles diacétyléniques

munis d'une tête PEG acide auto-  
arrangés sous forme de micelles  
sphériques et polymérisés

MP<sub>PEG-mixte</sub> : amphiphiles diacétyléniques

munis d'une tête mixte PEG  
hydroxyle et PEG acide auto-  
arrangés sous forme de micelles  
sphériques et polymérisés

MP<sub>PEG-OH</sub> : amphiphiles diacétyléniques

munis d'une tête PEG hydroxyle  
auto-arrangés sous forme de  
micelles sphériques et polymérisés

MWNT : nanotubes multi parois

NTA : acide nitrilotriacétique

NTC : nanotubes de carbone

PDA : polydiacétylène

SDS : sodium dodécylsulfate

SWNT : nanotubes simple paroi

#### **Abréviations relatives aux micelles de copolymères blocs**

AIBN : azobisisobutyronitrile

DMAP : acide di(hydroxyméthyle)  
propionique

NDAPM : (3-diméthylaminopropyl)  
méthacrylamide

NIPAA : poly(*N*-isopropylacrylamide)

PAA : acide polyacrylique

PBLA : poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate)

PCL : poly- $\epsilon$ -caprolactone

PEO : poly(oxyéthylène)

PEG : polyéthylène glycol

PEO-PPO-PEO : pluronic

PLA : acide polylactique

PLGA : acide poly(lactic-*co*-glycolique)

PMA : polyacrylate de méthyle

PPO : poly(oxyde de propylène)

#### **Abréviations relatives aux synthèses organiques**

CyHex : cyclohexane

DCM : dichlorométhane

DIBAL-H : hydrure de  
diisobutylaluminium

DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTNB : acide 5,5'-dithio-*bis*-  
(2-nitrobenzoïque)

DTT : dithiothréitol

EDAC : hydrochlorure de 1-(3-diméthyl  
aminopropyl)-3-éthylcarbodiimide

HEPES : acide *N*-(2-hydroxyéthyl)-  
piperazine-*N'*-(2-éthanesulfonique)

HOBt : hydroxybenzotriazole

MES : acide 4-morpholine  
éthanesulfonique

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

TBAI : iodure de tétrabutylammonium

TCEP : hydrochlorure de tris  
(2-carboxyéthyl)phosphine

THF : tétrahydrofurane

Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

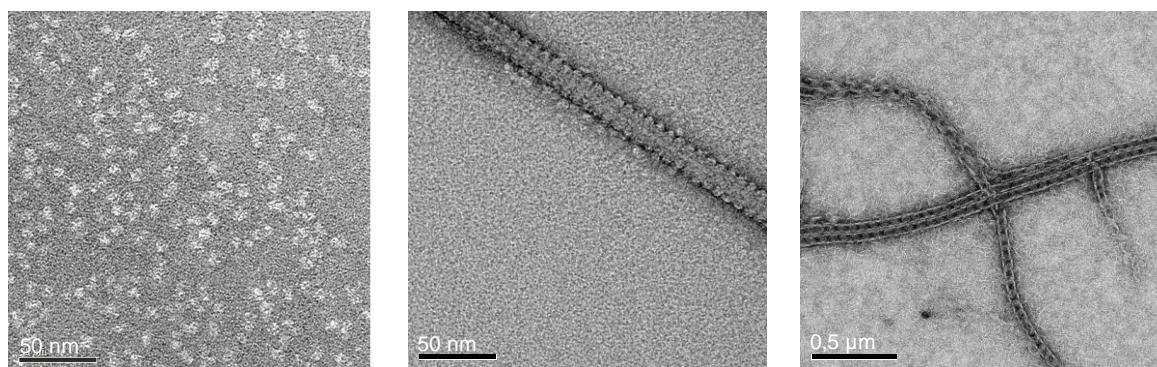


# Avant-Propos

---

Les nanoparticules sont actuellement l'objet de nombreuses études scientifiques dans le domaine médical, pour la vectorisation de principes actifs, ou pour le diagnostic. Elles possèdent également des propriétés uniques qui les rendent attractives dans le développement de futurs matériaux, comme leur taille, comprise en 1 et 100 nm, et les propriétés de leur surface, qui peut être modifiée à façon, afin qu'elles acquièrent des fonctions différentes, mais également des solubilités et des capacités de ciblage particuliers.<sup>1</sup>

Les travaux réalisés durant cette thèse ont porté sur l'étude de trois types de nanostructures formées de nouveaux auto-arrangements polymérisables constitués d'amphiphiles diacétyléniques : des micelles sphériques, des constructions lipidiques polymérisées adsorbées à la surface de nanotubes de carbone et des nanotubules de lipide. (Figure 1)



**Figure 1.** Images de microscopie des différents auto-arrangements : micelles sphériques (à gauche), constructions lipidiques polymérisées adsorbées à la surface de nanotubes de carbone (au milieu) et nanotubules (à droite)

Ce manuscrit se compose de cinq parties. Dans une introduction générale, nous allons présenter les différents types d'auto-assemblages constitués de molécules amphiphiles : les micelles sphériques, l'adsorption à la surface de nanotubes de carbone puis les nanotubules. Dans cette introduction, nous exposerons également les méthodes principales pour

fonctionnaliser des micelles sphériques ainsi que leurs applications. La deuxième partie portera sur l'étude de micelles sphériques polydiacétyléniques comportant une tête polaire acide nitrilotriacétique (NTA), et en particulier sur l'influence de la photopolymérisation sur la structure des micelles. La troisième partie traitera de la fonctionnalisation de surface de ces micelles polymérisées et du développement d'un nouveau type de micelles plus solubles, portant une tête polaire polyéthylène glycol, fonctionnalisation qui permettra d'en étudier le comportement en présence de cellules. Dans une quatrième partie, une technologie propre au laboratoire sera examinée : la dispersion programmée en milieu aqueux de nanotubes de carbone grâce à l'adsorption d'amphiphiles synthétiques. Ensuite, nous décrirons l'obtention de constructions lipidiques photopolymérisées, après extraction des nanotubes. Dans une dernière partie, nous étudieront les auto-arrangements obtenus à partir d'un amphiphile particulier, qui contrairement aux autres amphiphiles que nous avons manipulés, ne forme pas de micelles sphériques, mais des nanotubules et des hélices.



# **CHAPITRE 1**

## **Introduction générale**



# Chapitre 1

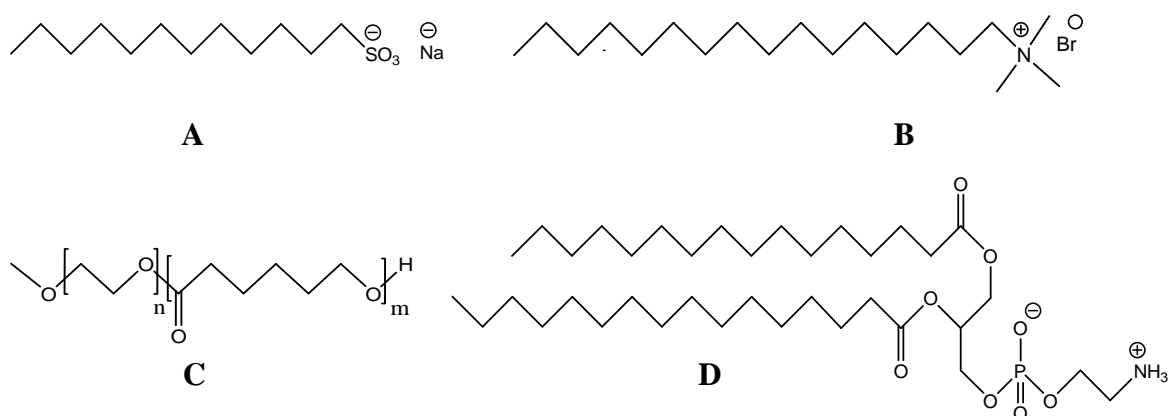
## Introduction générale

---

### I. Les amphiphiles et leurs auto-arrangements

#### I.1. Les amphiphiles : définition

Les amphiphiles sont des molécules possédant une chaîne hydrophobe liée à un groupement hydrophile. La partie hydrophobe est généralement constituée d'une chaîne hydrocarbonée, tandis que la partie hydrophile est plus variable et permet de classer les amphiphiles en fonction de leur nature : anionique, comme le dodécylsulfate de sodium (Figure 1.1, **A**), cationique, comme le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (Figure 1.1, **B**), neutre, comme le copolymère bloc PEO-*b*-PCL (Figure 1.1, **C**) ou amphotère, comme les phospholipides (Figure 1.1, **D**).



**Figure 1.1.** Exemples des différents types d'amphiphiles. Anionique : **A** : Dodécylsulfate de sodium (SDS) ; Cationique : **B** : Cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB); Neutre : **C** : Poly(éthylèneoxyde)-*block*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) ; Amphotère : **D** : 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-éthanolamine

La structure moléculaire des amphiphiles leur confère des propriétés de tensioactif, c'est-à-dire qu'ils ont la propriété de modifier la tension superficielle à une interface, comme

l'interface air/eau. Dans ce cas, la partie hydrophile est localisée dans la phase aqueuse tandis que la partie hydrophobe est tournée vers l'air.

## I.2. Les auto-arrangements d'amphiphiles

### I.2.1. En milieu aqueux

Lorsqu'ils sont solubilisés en milieu aqueux, les amphiphiles peuvent s'auto-arranger pour former différentes structures qui dépendent de facteurs liés au milieu, comme la température, la concentration ou le pH,<sup>2</sup> et de facteurs liés à la géométrie de l'amphiphile lui-même. Israelachvili<sup>3</sup> a proposé la définition d'un paramètre d'assemblage  $P = v/(a_0 \cdot l_c)$ , où  $v$  est le volume de la chaîne hydrophobe,  $a_0$  la surface de la tête polaire et  $l_c$  la longueur de la chaîne. (Figure 2.1) Le type d'auto-arrangement formé dépendra, entre autres, de la valeur du paramètre  $P$ , et donc de la géométrie de l'amphiphile :

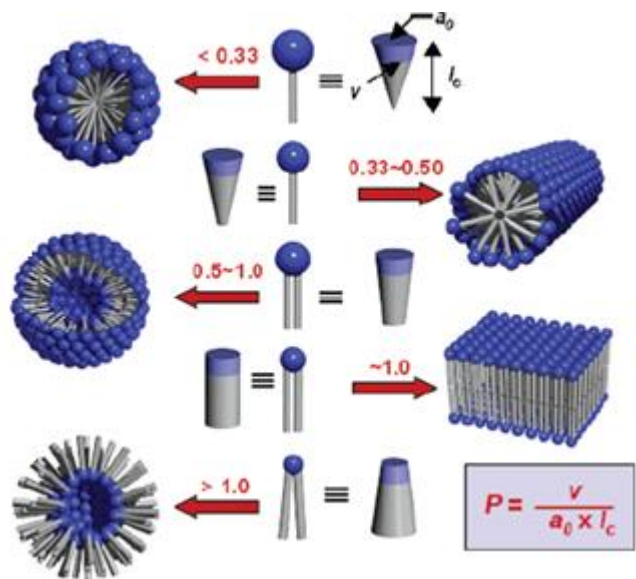
$P < 0,33$  : micelles sphériques

$0,33 < P < 0,50$  : micelles cylindriques

$0,5 < P < 1$  : bicouches sphériques

$P = 1$  : bicouches planes

$P > 1$  : micelles sphériques inverses

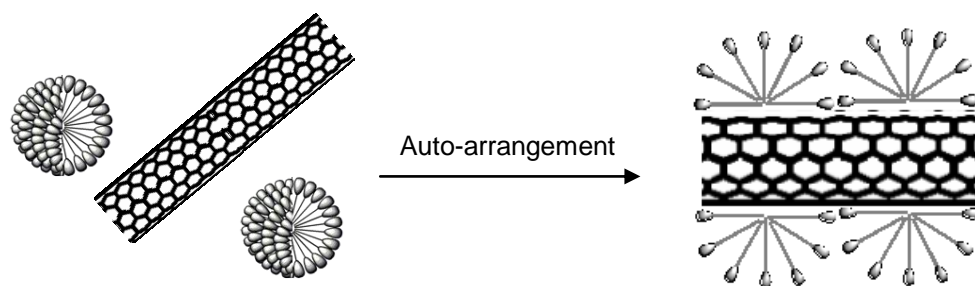


**Figure 2.1.** Auto-assemblages obtenus en fonction du paramètre  $P$  de l'amphiphile<sup>1</sup>

Ainsi, de nombreux types d'auto-arrangements peuvent être obtenus : des micelles sphériques aux bicouches, en passant par les micelles cylindriques.

## I.2.2. A l'interface liquide/solide

L'interface liquide/solide à laquelle nous allons nous intéresser est l'interface eau/carbone. Comme nous le verrons par la suite, le carbone peut être sous forme de graphite ou de nanotubes, mais le caractère hydrophobe qui permet les auto-arrangements reste le même. A l'interface eau/carbone, le phénomène est identique à celui observé pour la formation de micelles sphériques en solution aqueuse : les parties hydrophobes interagissent avec la surface de carbone, tandis que les têtes polaires se répartissent au contact de la phase aqueuse. Une schématisation des auto-arrangements des amphiphiles à la surface des nanotubes de carbone est présentée figure 3.1.



**Figure 3.1.** Schématisation des auto-arrangements des amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone

Dans la suite de cette introduction, nous allons développer plus particulièrement trois types d'auto-arrangements des amphiphiles: les micelles sphériques de copolymères, les nanotubules et l'auto-assemblage sur des surfaces de carbone.

## II. Les micelles sphériques de copolymère

Bien qu'il existe des micelles de détergents qui sont les plus anciennement connues,<sup>4</sup> nous allons nous focaliser dans ce paragraphe sur les micelles de polymère, qui sont les plus décrites et les plus fréquemment utilisées. Comme nous le verrons, ces micelles ont des structures proches des micelles que nous voulons synthétiser. Ainsi, établir un état de l'art des micelles de polymère nous permettra de mettre en lumière des points de comparaison entre les

micelles de copolymère et nos micelles polydiacétyléniques. Les premières micelles de polymère ont été mises en évidence par Kataoka *et coll.* à la fin des années 80.<sup>5</sup> Ces micelles sont constituées de blocs de copolymère qui s'auto-arrangent en solution aqueuse. Les copolymères sont nommés blocs car ils sont constitués d'un bloc hydrophobe et d'un ou plusieurs blocs hydrophiles.

## II.1. Formation des micelles de copolymère

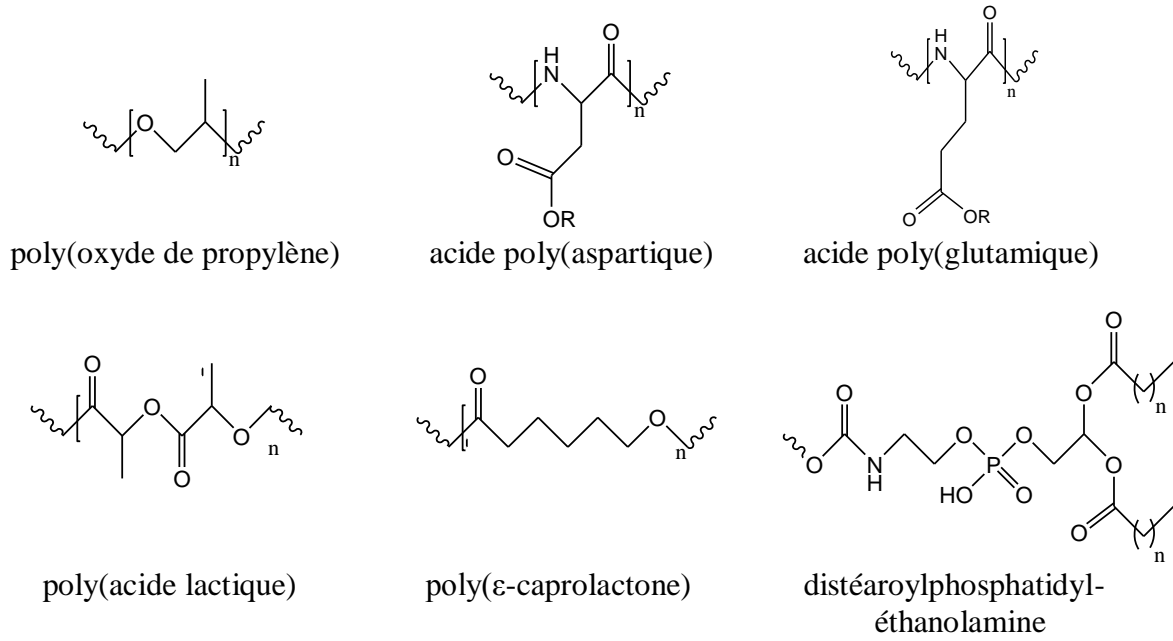
La formation des micelles de copolymère se réalise très souvent suivant le même protocole : le polymère est placé dans un solvant (THF ou DMF) qui permet de le solubiliser, à une concentration supérieure à sa CMC, puis un solvant aqueux est ajouté. Le premier solvant est ensuite complètement remplacé par le second par dialyse. On obtient ainsi des structures micellaires, solubles en milieu aqueux.

## II.2. Les différents types de micelles de copolymère

Les micelles de polymère sont composées d'un ou plusieurs blocs hydrophiles et d'un bloc hydrophobe. Les blocs hydrophiles sont généralement constitués de polyéthylèneglycol (PEG) ou polyéthylèneoxyde (PEO), entre 1 et 15 kDa. Des poly(alcool vinylique) ou poly(N-vinylpyrrolidone) ont plus rarement été utilisés. Le bloc hydrophobe est d'une taille légèrement plus petite que celle du bloc hydrophile.<sup>6</sup> Si le bloc hydrophobe est une simple chaîne, les micelles seront des micelles de copolymère blocs simples, et s'il est constitué d'une chaîne réticulable que l'on polymérise après formation des micelles, les micelles seront dites réticulées. Ainsi, les micelles de copolymère peuvent être constituées de deux blocs<sup>7</sup> (diblocs), trois blocs<sup>8</sup> (triblocs) ou parfois plus, en fonction de la structure du polymère.

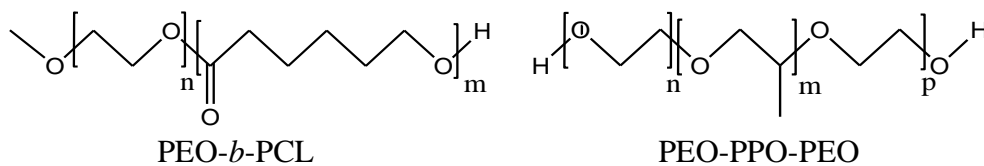
## II.2.1. Les micelles de copolymère simples

Les blocs polaires des micelles sont souvent des PEG ou des PEO. La diversité des chaînes hydrophobes est quant à elle, beaucoup plus grande. Les plus courantes sont regroupées dans la figure 4.1.



**Figure 4.1.** Principaux blocs hydrophobes utilisés pour la synthèse de micelles de copolymère blocs

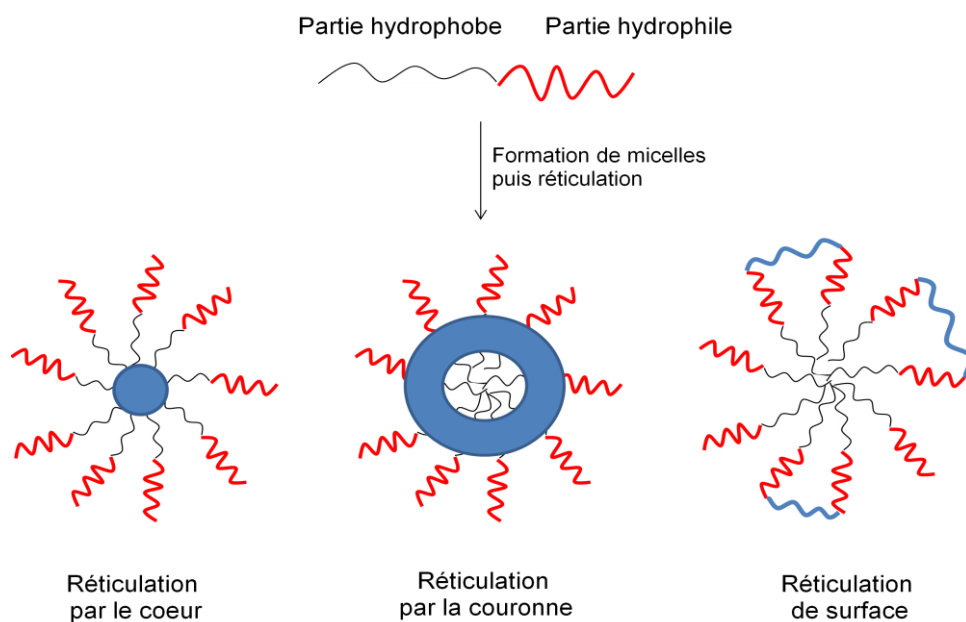
A titre d'exemple, les micelles PEO-*b*-PCL sont des micelles de copolymère diblocs, constituées d'un bloc hydrophile (PEO) et d'un bloc hydrophobe (PCL), dont les longueurs peuvent être modulées. Les micelles PEO-PPO-PEO sont pour leur part, des micelles triblocs, car elles sont composées d'un bloc hydrophobe et de deux blocs hydrophiles. (Figure 5.1)



**Figure 5.1.** Exemples de structures de copolymère diblocs et triblocs

## II.2.2. Les micelles de copolymère réticulées

Les amphiphiles utilisés pour synthétiser les micelles réticulées sont constitués de blocs de polymères contenant des groupements polymérisables qui sont, la plupart du temps, des groupes allyles. Les micelles de copolymère diblocs peuvent être réticulées à différents niveaux : le cœur (core cross-linking), la couronne (shell cross-linking) et la surface.<sup>9</sup> (Figure 6.1)



**Figure 6.1.** Réticulations les plus courantes des micelles de copolymère blocs

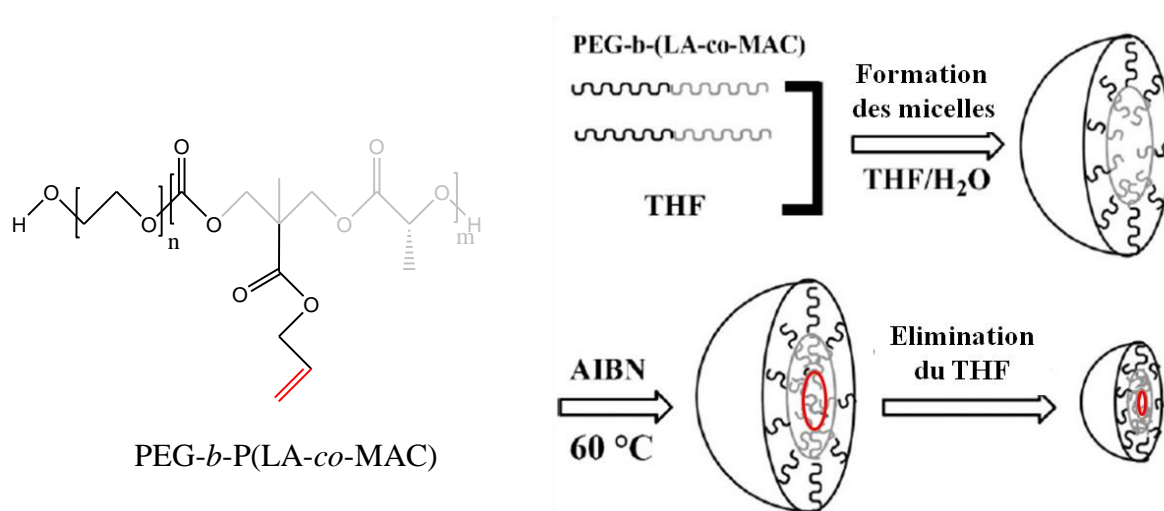
Ces micelles ont été étudiées car elles possèdent des caractéristiques différentes des micelles simples, notamment une plus grande stabilité vis-à-vis de la dilution, des changements de pH ou de température.<sup>10</sup> Nous allons donner quelques exemples de micelles réticulées dans cette partie.

### II.2.2.a. Les micelles de copolymère réticulées par le cœur

En 1979, les groupes de Prochaska et Baloch<sup>11</sup> ont introduit le principe des micelles réticulées par le cœur. Le cœur des micelles était lié grâce à la réaction radicalaire entre des



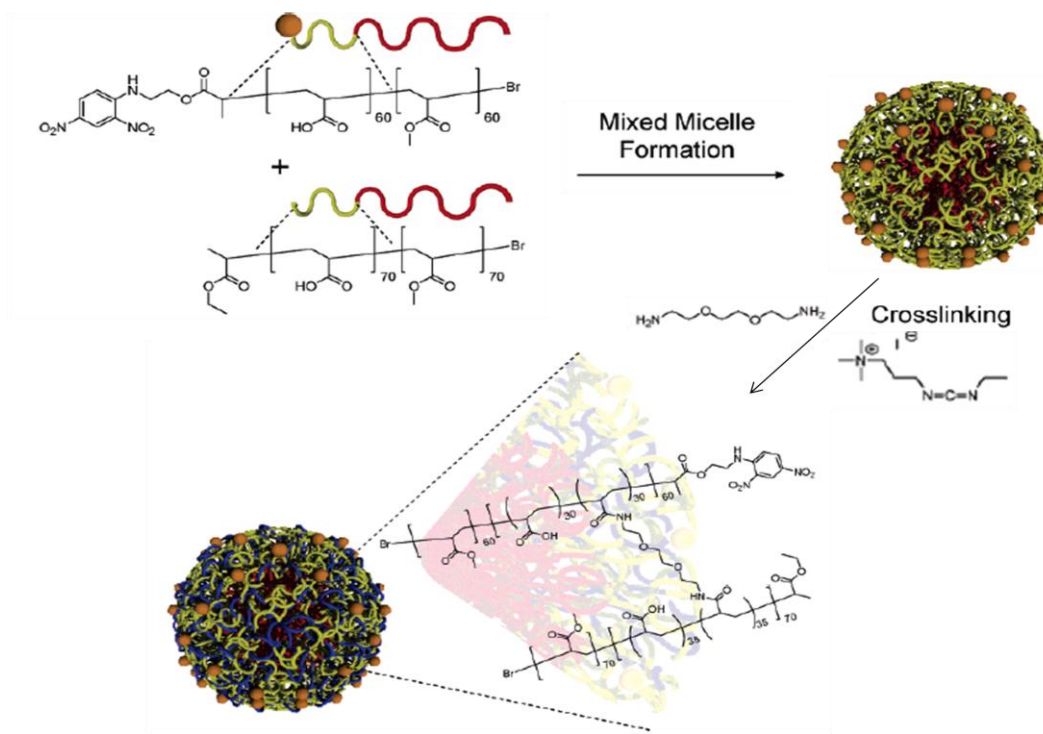
polybutadiènes activés par irradiation. Par la suite, de nombreuses études ont porté sur la réticulation du cœur des micelles de copolymère.<sup>12-13-14-15</sup> Par exemple, le copolymère bloc PEG-*b*-P(LA-*co*-MAC), soit poly(éthylène glycol)-*block*-poly[(L-lactide)-*co*-(5-méthyl-5-allyloxy-carbonyl-1,3-dioxan-2-one)],<sup>16</sup> comporte des groupements allyliques qui peuvent polymériser en présence d'AIBN par réaction radicalaire. La figure 7.1 présente la formation schématique des micelles, le rond gris représentant le cœur hydrophobe, et la polymérisation des groupements allyliques dans le cœur des micelles, symbolisée par le rond rouge.



**Figure 7.1.** Représentation du copolymère PEG-*b*-P(LA-*co*-MAC) et de la réticulation du cœur dans les micelles<sup>16</sup>. Masses molaires des blocs n et m : N = 2000 g/mol ; M = 2500 g/mol

### II.2.2.b. Les micelles de copolymère réticulées par la couronne

Wooley *et coll* ont été les premiers à étudier les micelles réticulées par la couronne.<sup>17-18</sup> Ces micelles peuvent être réticulées grâce à des groupements chimiques réagissant entre deux blocs une fois la micelle formée. Par exemple, des copolymères portant des groupements 2,4-dinitrophényles (DNP), connus pour leur rôle d'antigène, ont été synthétisés : DNP-PAA<sub>60</sub>-*b*-PMA<sub>60</sub> et PAA<sub>70</sub>-*b*-PMA<sub>70</sub>. Après formation des micelles, les acides acryliques présents vont réagir avec la 2,2'-(éthylènedioxy)bis-(éthylamine) par couplage peptidique, afin de former des micelles réticulées dans la couronne. (Figure 8.1)



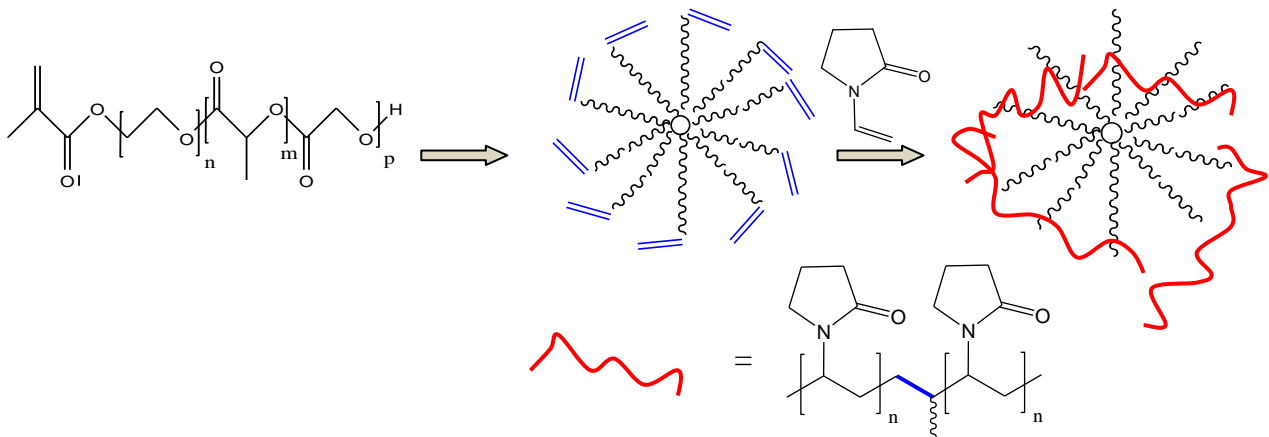
**Figure 8.1.** Formation de micelles réticulées par la couronne composées de deux copolymères blocs différents<sup>18</sup>

Un des inconvénients de ce type de réticulation est l'utilisation de réactifs organiques qui doivent être séparés des micelles après réaction. La réticulation de couronne peut également être réalisée grâce à des groupements inorganiques. Par exemple, la présence de silicium dans un copolymère bloc permet, en conditions acides, de réticuler des micelles grâce à la formation de liaisons silicium-oxygène-silicium dans leur couronne.<sup>19</sup>

### II.2.2.c. Les micelles de copolymère réticulées en surface

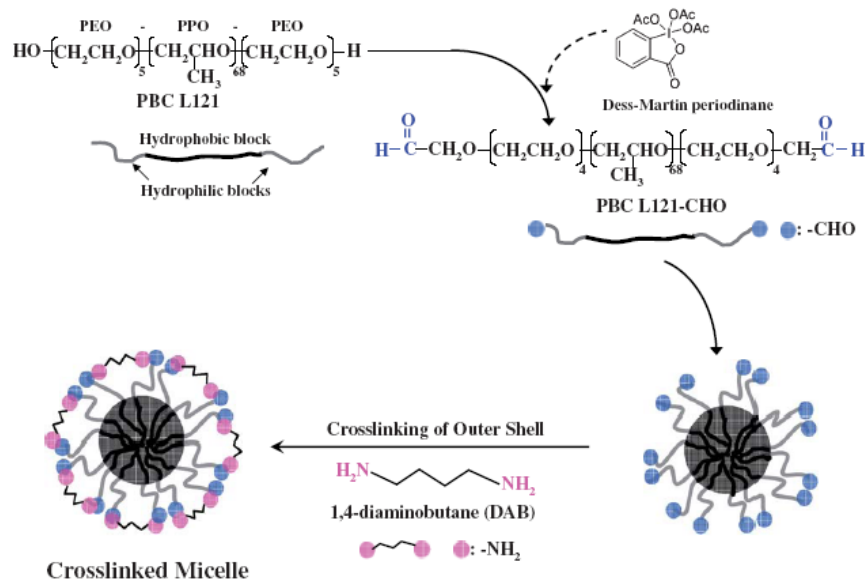
Il existe plusieurs stratégies pour réticuler les micelles en surface. La première est de synthétiser un polymère contenant un groupement polymérisable au bout de la chaîne hydrophobe. Par exemple, un polymère diblocs PEG-PLGA<sup>20</sup> a été utilisé pour former des micelles. (Figure 9.1) Bien que la partie hydrophobe devrait se trouver au cœur des micelles, quelques groupements allyliques sont tout de même disponibles en surface et ont été polymérisés avec la *N*-vinyl-2-pyrrolidone (NVP). La polymérisation est notamment favorisée

car les groupements NVP polymérisés sont hydrophiles donc se situent naturellement proches de la surface.



**Figure 9.1.** Schéma de formation des micelles PEG-PLGA stabilisées par polymérisation entre les groupements allyliques et la NVP.  $M(\text{PEG}) = 400\text{g/mol}$  ;  $M(\text{PLGA})=6800\text{g/mol}$

Une autre stratégie consiste à munir les micelles de groupements fonctionnels en surface, pouvant être reliés entre eux par une entité extérieure.<sup>21</sup> Suivant une stratégie similaire à celle décrite dans le paragraphe II.2.2.b, des micelles composées de copolymère PEO-PPO-PEO, plus couramment appelés Pluronic, ont été formées par oxydation des alcools en aldéhydes. La réaction de deux groupements aldéhydes avec une molécule de 1,2-diaminobutane, a permis d'introduire en surface une réticulation des micelles. (Figure 10.1)



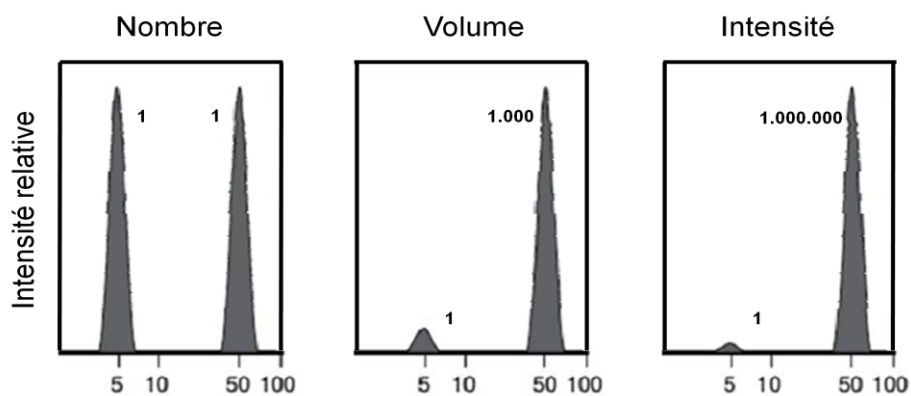
**Figure 10.1.** Représentation schématique de la conversion des hydroxyles terminaux en aldéhydes puis couplage des composés aminés par des bases de Schiff

La caractérisation de ces différents types de micelles simples ou réticulées, nécessite l'utilisation de diverses techniques pour en étudier précisément la structure. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est ainsi utilisée pour déterminer la taille des particules, la microscopie électronique à transmission (MET) pour en déterminer la forme et la chromatographie d'exclusion stérique pour déterminer le degré de polymérisation des copolymères. Ces analyses permettent aussi de vérifier si d'éventuels changements de structure ont eu lieu dans les micelles après réticulation. D'autres paramètres, comme la CMC, sont également utilisés, notamment pour évaluer la stabilité des micelles, comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre.

## II.3. Techniques de caractérisation des micelles de copolymère

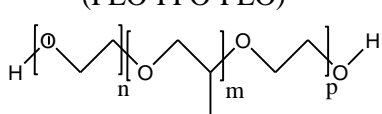
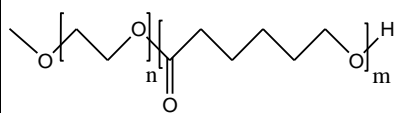
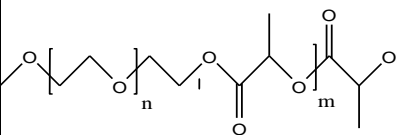
### II.3.1. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de lumière ou DLS, est utilisée pour déterminer le diamètre hydrodynamique des objets. Les mesures réalisées dépendent, entre autre, de la viscosité de la solution et de son indice de réfraction. La DLS fournit trois types de résultats : l'analyse en nombre, en volume et en intensité. Le résultat expérimental est celui donné en intensité car il correspond à l'intensité lumineuse diffusée par les particules et collectée par le détecteur. Les deux autres mesures, en nombre et en volume, correspondent à des valeurs calculées par des algorithmes. De part ce calcul, les courbes obtenues peuvent être différentes selon la représentation choisie. Ainsi, si une solution contient deux types de particules en quantités égales, les mesures en volume et en nombre ne donneront pas les mêmes distributions. (Figure 11.1) Cependant, il est très rare que les auteurs d'études traitant des micelles précisent si les mesures sont réalisées en nombre, volume ou intensité.



**Figure 11.1** Exemples d'analyses par DLS d'échantillons contenant deux types différents de particules

Le diamètre des micelles dépend de la nature des blocs qui composent les copolymères et de la masse molaire de chacun de ces blocs. Dans le cas de copolymères simples, les tailles peuvent fortement varier : de 1 nm à plus de 300 nm. La nature du copolymère a donc une grande influence sur le diamètre des micelles alors que dans une même famille, la modification des longueurs de chaînes permet de le moduler raisonnablement.

Type de polymère	Masses molaires ou longueur des chaînes	Diamètre des micelles (nm)
Pluronic <sup>22</sup> (PEO-PPO-PEO) 	n=26; m=40; p=26 n=76; m=29; p=76 n=100; m=65; p=100	1,5 1,3 3,3
PEO- <i>b</i> -PCL <sup>23</sup> 	N=2000 ; M=5000 N=5000 ; M=5000 N=5000 ; M=13000	33 40 80
mPEG-PLA <sup>24</sup> 	N=5000 ; M=5000 N=5000 ; M=10000 N=5000 ; M=20000	375,6 442,1 302,3

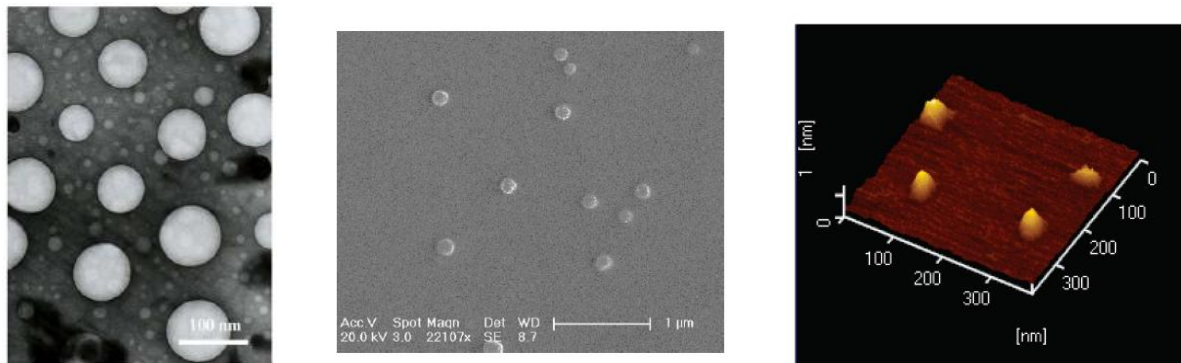
**Tableau 1.1.** Exemples de diamètre de micelles de copolymère blocs ; N = masse molaire de la chaîne n.

En ce qui concerne les micelles réticulées, les diamètres sont systématiquement déterminés avant et après réticulation. En effet, la DLS après réticulation permet de montrer que les structures micellaires sont conservées et ainsi, qu'aucune dégradation n'a eu lieu. Dans le cas de micelles de copolymère PEG-*b*-P(LA-co-MAC), leur diamètre passe de 70 nm avant réticulation à 62 nm après réticulation des groupes allyliques dans le cœur des micelles.<sup>16</sup> De la même façon, les micelles de copolymère Pluronic possédaient des tailles de 110 nm avant réticulation, sensiblement équivalentes à celles après réticulation de surface, d'un diamètre de 99 nm.<sup>21</sup> A l'inverse, des micelles PEG-PLGA et PEG-PLGA réticulées en surface présentent respectivement un diamètre moyen de 90 et 219 nm.<sup>20</sup> Cette augmentation de taille a dans ce cas été considérée comme une preuve indirecte de la réticulation de surface. La seule analyse en DLS ne permet cependant pas de conclure sur la forme des micelles après réticulation. C'est pourquoi l'observation en microscopie des échantillons est indispensable pour leur caractérisation.

### II.3.2. Microscopie électronique à transmission, microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique

Il existe de nombreuses techniques de microscopie pour observer les auto-arrangements, mais chacune a ses caractéristiques et ses avantages. La microscopie électronique à transmission ou MET, permet d'observer les auto-arrangements après les avoir colorés, le plus souvent par une coloration négative à l'acétate d'uranyle. Une fois déposées sur la grille, les structures sont aplaties car l'échantillon est observé sous vide. Les micelles de copolymère peuvent ainsi être visualisées de façon simple mais en une seule dimension. La microscopie électronique à balayage ou MEB, et la microscopie à force atomique ou MFA, fournissent quant à elles des images tridimensionnelles. La MEB et la MFA révèlent donc véritablement la forme et le volume des objets et fournissent des images d'une meilleure résolution. La figure

12.1 présente des micelles de copolymère observées en TEM, MEB et MFA. La plupart du temps, un seul type de microscopie suffit à caractériser des objets.



**Figure 12.1.** Images de microscopies : TEM de micelles de copolymère Pluronic<sup>21</sup> (à gauche) ; SEM de micelles PEG-*b*-P(LA-co-MAC)<sup>16</sup> (milieu) ; MFA de micelles composées d'oligosaccharides<sup>25</sup> (droite)

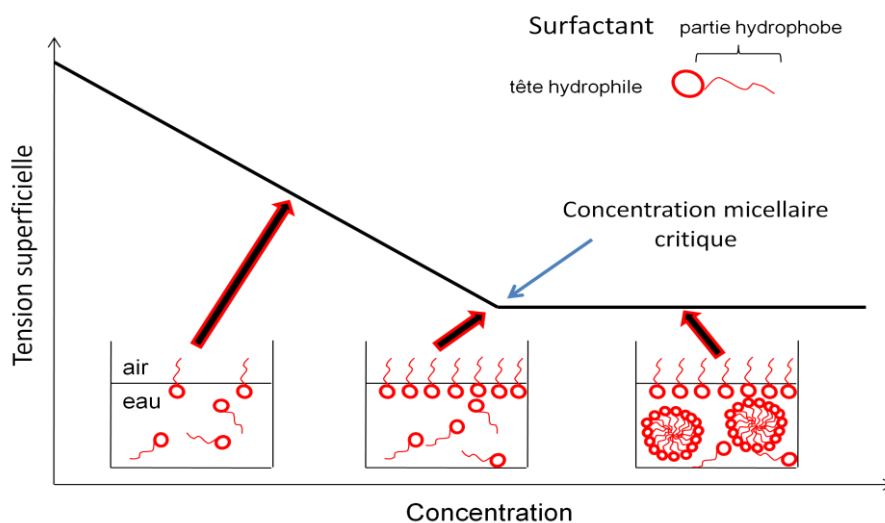
Grâce aux observations par microscope, les micelles de copolymère peuvent notamment être visualisées avant et après réticulation pour étudier les éventuelles modifications structurales induites par la réticulation. Il est à noter que la plupart du temps, la réticulation n'induit pas de changement de forme des micelles.

### II.3.3. Détermination de la CMC

Historiquement, la CMC définit la concentration à partir de laquelle un amphiphile s'auto-arrange sous forme de micelles en solution. En dessous de la CMC, l'amphiphile est libre en solution. Le calcul de la CMC permet donc de caractériser des micelles, car plus la CMC sera basse, plus la forme micellaire existera à faible concentration. Par analogie, le calcul de la CMC a été étendu aux polymères d'amphiphiles, bien que la valeur ne représente par un même phénomène d'organisation à l'interface, mais plutôt une transition entre deux organisations du polymère. Dans le cas de micelles sphériques, la CMC trouvée après réticulation est donc plus faible que celle avant réticulation. Cette diminution peut être par exemple divisée par deux, comme dans le cas de micelles PEG-*b*-P(LA-co-MAC), dont la

CMC passe de 0,015 mg/mL à 0,007 mg/mL. Par contre, la CMC des micelles de copolymère Pluronic est divisée par dix passant de 0,05 mg/mL avant réticulation de surface, à 0,005 mg/mL après réticulation. Ainsi, lorsque la CMC des micelles réticulées est inférieure à celle sans réticulation, une stabilité physique apportée par la réticulation est déduite.

Il existe plusieurs méthodes de calcul de la CMC. La mesure de la tension superficielle entre l'air et une solution aqueuse contenant l'amphiphile, peut être mise en place. Plusieurs mesures sont réalisées avec une concentration croissante en amphiphile. Lorsque ces concentrations sont inférieures à la CMC, l'amphiphile est libre en solution et la valeur de la tension superficielle diminue avec l'ajout d'amphiphiles. Quand les concentrations sont supérieures à la CMC, des micelles se forment en solution et la valeur de la tension superficielle ne varie plus. (Figure 13.1)



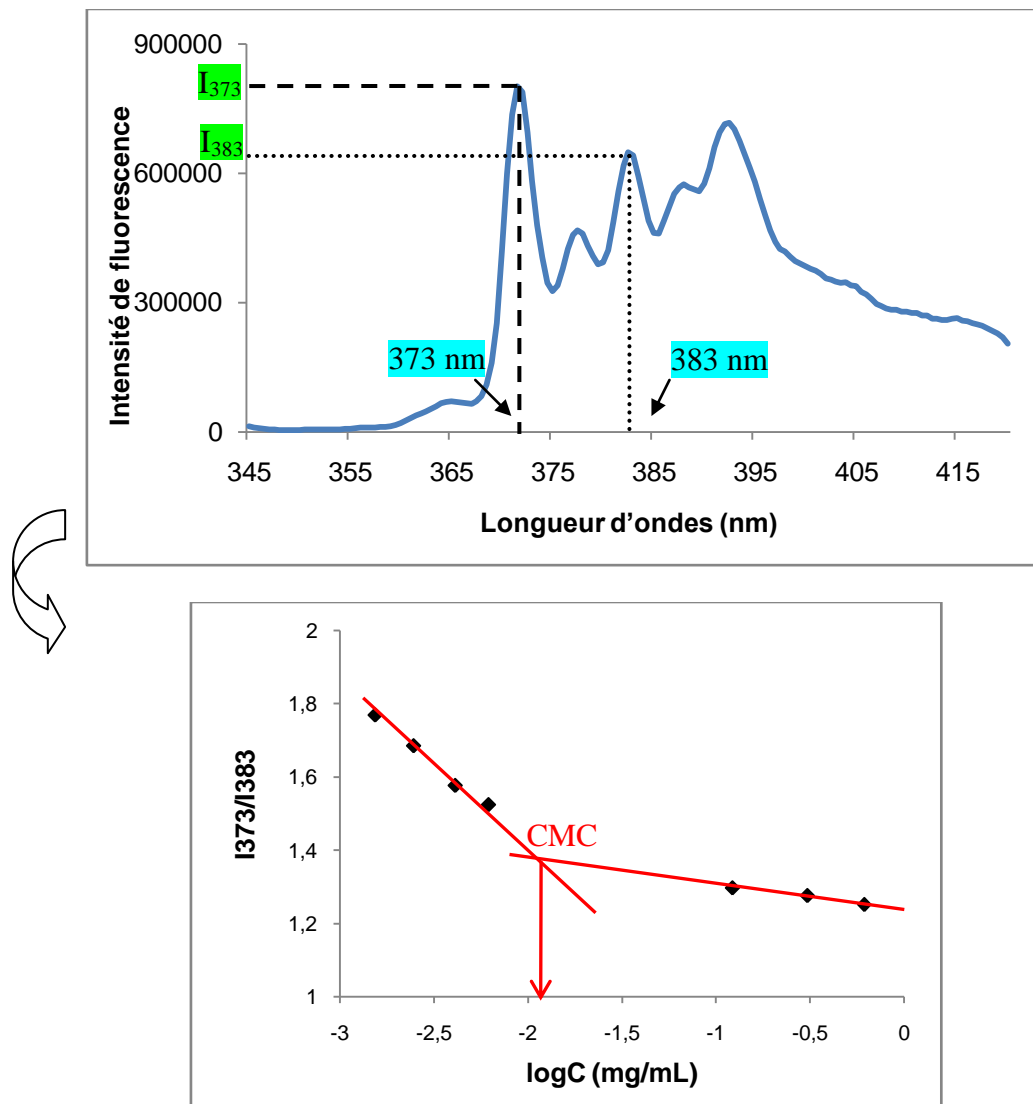
**Figure 13.1.** Mesure de la CMC par calcul de la tension superficielle à l'interface eau/air

D'autres techniques existent pour calculer la CMC, comme la mesure de la fluorescence du pyrène après encapsulation dans les micelles.<sup>26</sup> En effet, le spectre d'émission du pyrène, caractérisé par cinq pics entre 373 nm et 390 nm, dépend de l'environnement dans lequel il se trouve. Plus le pyrène sera dans un environnement hydrophobe, plus le pic à 383 nm va



augmenter par rapport aux autres pics du spectre. Ainsi en présence de micelles, le pyrène va se trouver encapsulé dans un environnement hydrophobe conduisant à une augmentation du signal à 383 nm. Pour déterminer la CMC, le ratio des intensités des pics situés à 373 nm et 383 nm est donc calculé, puis reporté en fonction de la concentration en amphiphile.

(Figure 14.1)



**Figure 14.1.** Détermination de la CMC par la mesure de fluorescence du pyrène

L'intersection des deux droites donne ainsi la valeur de la CMC de l'amphiphile en solution.

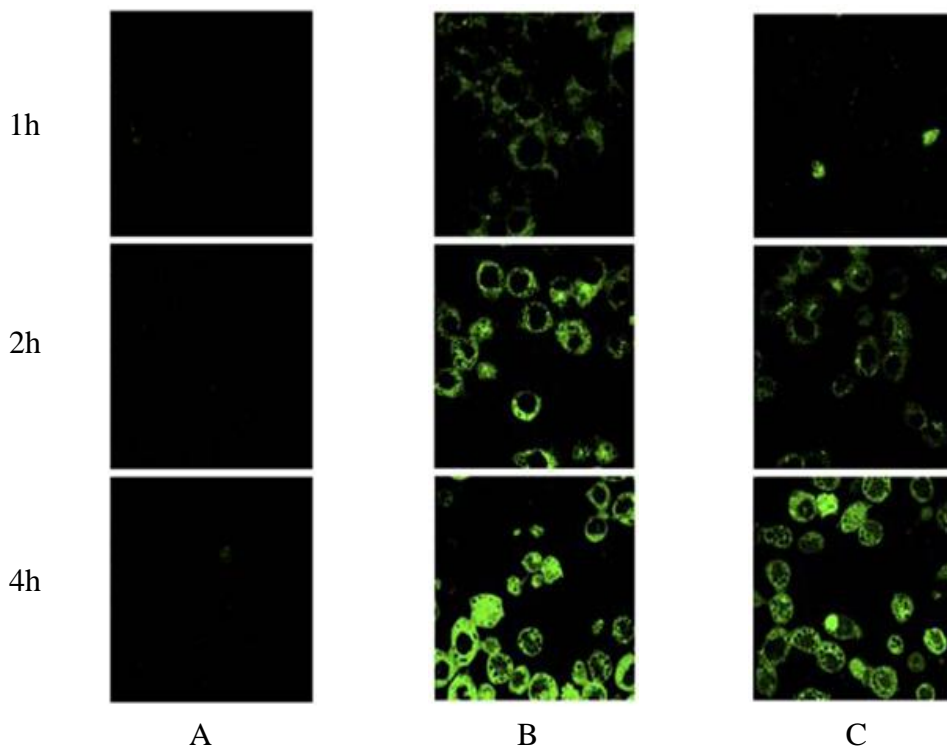
### II.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou chromatographie par perméation de gel (GPC) est fréquemment utilisée pour caractériser les polymères. La SEC permet de séparer les composés en fonction de leur volume hydrodynamique dans laquelle les plus gros composés ont un temps de rétention plus court que les petits. Le temps de rétention du copolymère constituant les micelles avant réticulation ne sera donc pas la même qu'après réticulation et sera fonction du degré de polymérisation. Après réticulation, les chaînes de polymère sont donc plus longues et leurs tailles plus grandes. Cette analyse permet également de déterminer les caractéristiques d'un polymère : sa masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) et en masse ( $M_w$ ), et donc l'indice de polydispersité (PDI) qui indique le degré de polymérisation du polymère. A titre d'exemple, des micelles de copolymère PEG-DMPA contenant des groupements allyliques à leurs extrémités ont été auto-assemblées puis réticulées en présence d'AIBN.<sup>14</sup> L'analyse par SEC des micelles dans le THF a montré que le temps de rétention des copolymères était d'environ 16 minutes sans réticulation, et descendait à 13,5 minutes après réticulation. Cette diminution du temps de rétention a été attribuée à la réticulation des polymères constituant les micelles, car plus les molécules éluées ont des grosses masses molaires, moins elles sont retenues par la colonne. Le principe de la SEC sera exposé plus en détail dans le chapitre 2. Dans le cas de ces micelles, les masses molaires calculées ont montré que chaque polymère réticulé est composé de 15 unités de copolymère de départ. La SEC est donc une méthode d'analyse permettant de prouver la réticulation de micelles sphériques et de déterminer la masse molaire des chaînes polymériques les constituant.

## II.4. Applications des micelles de copolymère

### II.4.1. Utilisation thérapeutique

Les micelles de copolymère sont actuellement étudiées en tant que nouvel agent de délivrance, car elles sont capables de circuler dans le flux sanguin et de pénétrer dans des cellules.<sup>27</sup> Ces propriétés sont dues à leur taille, mais également à la polyvalence de leur surface, qui permet d'y fixer des agents de ciblage, et au caractère hydrophobe de leur cœur, qui permet d'encapsuler des principes actifs. Afin d'évaluer le comportement des micelles et de pouvoir les tracer, une technique consiste à les marquer à l'aide de sondes d'imagerie. A titre d'exemple de ce type d'étude, des micelles de copolymère Pluronic<sup>21</sup> décrites précédemment, ont été marquées par de la rhodamine encapsulée, puis incubées avec des cellules cancéreuses épidermiques (KBv).



**Figure 15.1.** Imagerie de fluorescence de cellules KBv après incubation avec A : la sonde rhodamine seule ; B : sonde rhodamine avec micelles Pluronic ; C : sonde rhodamine avec micelles Pluronic réticulées.

La colonne A montre qu'en présence de sonde seule, aucune fluorescence n'est détectée tandis qu'en présence de micelles, de la fluorescence est détectée dans le cytoplasme des

cellules. D'autre part, les micelles non réticulées semblent pénétrer plus rapidement dans les cellules et en plus grande quantité que les micelles réticulées.

Les micelles de copolymère sont donc facilement internalisées dans des cellules. De plus, grâce à leur cœur hydrophobe, elles peuvent encapsuler un principe actif, ce qui a permis de mettre en évidence leur potentiel en tant qu'agent de délivrance de principes actifs.<sup>6-28</sup> Certaines micelles de copolymère sont ainsi en cours de tests cliniques dans la thérapie contre le cancer.<sup>29</sup>

#### II.4.2. Utilisation en tant qu'agent d'imagerie

Les micelles possèdent un fort potentiel dans le domaine du diagnostique car elles ont en théorie la capacité de concentrer une forte quantité d'agent de contraste dans un petit volume.

Les trois principaux types d'imagerie sont :

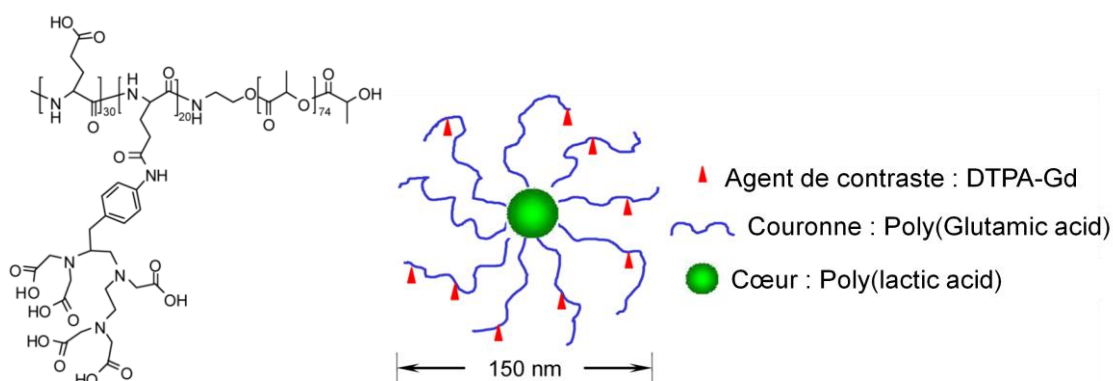
- ✓ la scintigraphie gamma, qui utilise des agents radioactifs comme l'Indium ( $^{111}\text{In}$ ), le Technétium ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) et le Gallium ( $^{67}\text{Ga}$ ),
- ✓ la résonance magnétique, qui utilise les ions paramagnétiques tels que le gadolinium et le manganèse,
- ✓ la tomographie aux rayons X, qui utilise des éléments comme l'iode, le brome ou le baryum.

Les différents modes d'imagerie se distinguent principalement par la concentration requise en agent de contraste dans les tissus et par leur résolution. En effet, alors que la scintigraphie gamma nécessite une concentration en agents radioactifs de  $10^{-10}\text{M}$ , la résonance magnétique nécessite une concentration en ions paramagnétiques de  $10^{-4}\text{M}$  et la tomographie une concentration en iode ou brome de  $10^{-2}\text{M}$ .<sup>30</sup> En ce qui concerne la scintigraphie gamma et la résonance magnétique, les atomes radioactifs et paramagnétiques sont chélatés par des groupes chélatants spécialement introduits sur les polymères. Pour la tomographie, l'agent de

contraste est lié de manière covalente sur chacun des polymères avant la formation des micelles ou est ensuite encapsulé dans leur cœur hydrophobe.

#### II.4.2.a. Scintigraphie gamma et résonance magnétique

Pour ces deux types d'imagerie, les atomes radioactifs et paramagnétiques sont fixés par des têtes chélatantes situées sur les polymères.<sup>31</sup> Ces têtes peuvent être des groupements DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique), NTA (acide nitrilotriacétique) ou encore l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique). Ces groupements sont tous porteurs de plusieurs fonctions acides carboxyliques ayant le rôle d'une pince pour chélater l'agent de contraste. Une étude récente a montré que des ions gadolinium,  $Gd^{3+}$  ont été fixés sur des micelles de copolymère poly(L-glutamic acid)-*b*-polylactide (PG-*b*-PLA) grâce à la présence des têtes DTPA.<sup>32</sup> Le schéma de cette fonctionnalisation est présenté dans la figure 16.1.



**Figure 16.1.** Structure du copolymère PG(DTPA)-*b*-PLA schématisation des micelles marquées par le gadolinium

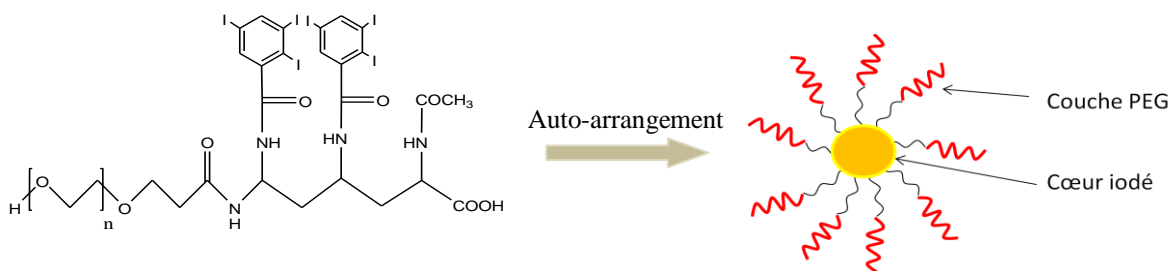
Cependant, des études *in vivo* concernant ces micelles n'ont pas encore été publiées. Par contre, des micelles de copolymère PEG-*b*-poly(L-lysine-DOTA) ont permis de chélater des ions  $Gd^{3+}$  et d'en étudier la biodistribution.<sup>33</sup> L'agent chélatant est le DOTA, un acide tétriacétique sur lequel le gadolinium a été chélaté, directement après synthèse du copolymère. Ainsi, 7 atomes de gadolinium ont été fixés par copolymère, ce qui correspond à

7% de la masse molaire totale du polymère. Ces micelles d'un diamètre de 43 nm ont été injectées à des souris à une dose de 0,05 mmolGd/kg de souris, soit 7,9 mgGd/kg de souris et ont montré une circulation persistante dans le corps. Les micelles se sont fortement accumulées dans la tumeur implantée, même si la majorité a été détectée dans le foie et la rate 24 heures après injection.

Les nombreuses études menées sur l'utilisation des micelles de copolymère en tant qu'agent de diagnostic montrent qu'elles ont un grand avenir dans ce domaine bien qu'à notre connaissance, elles ne soient pas encore en tests cliniques.<sup>34</sup>

#### II.4.2.b. Tomographie aux rayons X

En ce qui concerne la tomographie aux rayons X, les atomes d'iode sont directement greffés sur les chaînes de polymères. Des micelles marquées par de l'iode ont été produites grâce à un copolymère MPEG relié à de la poly-L-lysine, elle-même fonctionnalisée par des groupes dérivés de l'acide triiodobenzoïque.<sup>35</sup> (Figure 17.1)



**Figure 17.1.** Représentation schématique de la formation des micelles iodées

Les micelles ainsi obtenues possèdent un diamètre d'environ 80 nm. La dose de micelles injectées aux souris est de 250 mgI/kg de souris soit 570 mg de micelles par kilogramme de souris. Après injection, elles ont été détectées en majorité dans le foie et la rate et jusqu'à 24 heures dans le sang.

Un mélange de lipides contenant de l'iode,<sup>36</sup> le Lipiodol®, a également été encapsulé dans des micelles de copolymère pluronic/PEG. Ces micelles contenant des lipides iodés possèdent un

diamètre de 153 nm avec un taux d'encapsulation très important de 70 % massique par rapport aux micelles. Par la suite, 80 mg de micelles par souris ont été injectées, soit 56 mg de produit iodé par souris. Après 4 heures, les micelles ont été détectées dans le sang de l'animal et elles se sont accumulées dans le foie et la rate après 24 heures. Un fort contraste a été observé jusqu'à 72 heures après l'injection. De la même façon que pour la scintigraphie gamma et la résonance magnétique, à notre connaissance, les micelles marquées par des atomes d'iode ne sont pas encore en cours de développement clinique.

## II.5. Conclusion sur les micelles sphériques

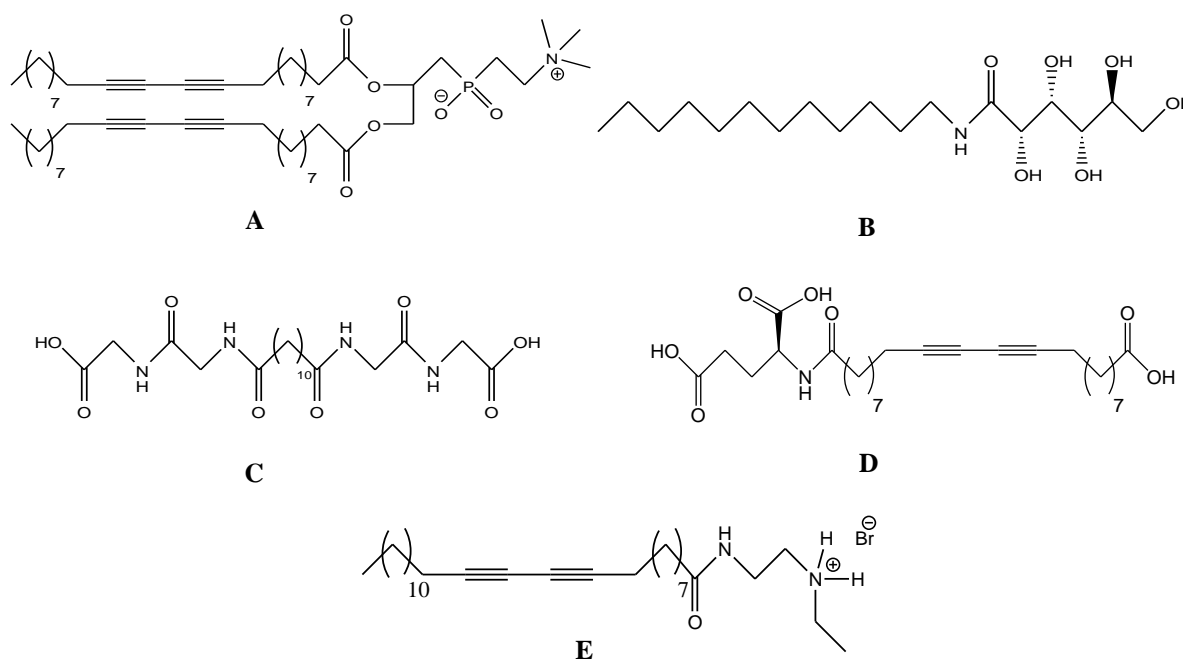
Nous avons vu qu'il existe plusieurs sortes de micelles de copolymère : simples ou réticulées. Les micelles réticulées sont les plus étudiées, car elles possèdent une plus grande stabilité que les micelles simples. Ces micelles trouvent un intérêt particulier du fait de leur capacité à être marquées soit par une sonde fluorescente ou par des agents de contraste, comme des ions radioactifs. Nous allons à présent nous intéresser à un deuxième type d'auto-arrangements : les nanotubules de lipides.

## III. Les nanotubules de lipides

### III.1. Formation des nanotubules de lipides

Les premiers microtubules de lipides ont été formés à partir de phospholipides photopolymérisables, en particulier le DC<sub>8,9</sub>PC, (Figure 18.1, A) aujourd'hui commercialement disponible.<sup>37</sup> Les phospholipides possèdent deux chaînes hydrophobes et un centre de chiralité, qui est longtemps resté la condition indispensable pour former des hélices. Par la suite, de nombreuses molécules avec une seule chaîne hydrophobe et possédant toujours un centre chiral ont permis de former des nanotubules. A titre d'exemple, la

*N*-dodécylgluconamide, possédant une chaîne hydrophobe saturée et une tête polaire constituée d'un sucre, a permis de former des nanotubules.<sup>38-39</sup> (Figure 18.1, **B**) Dans ce type de molécules, la chaîne hydrophobe peut également être insaturée et la tête polaire être constituée de sucres ou d'acides aminés. Cependant, des molécules sans centre chiral ont également permis de former le même type d'auto-arrangements, comme les bolaamphiphiles qui possèdent deux têtes polaires aux extrémités d'une chaîne hydrophobe<sup>38</sup> (Figure 18.1, **C** et **D**). Plus récemment, une molécule possédant une chaîne hydrophobe et une tête polaire non chirale a permis de former des nanotubules en solution aqueuse.<sup>40</sup> (Figure 18.1, **E**).



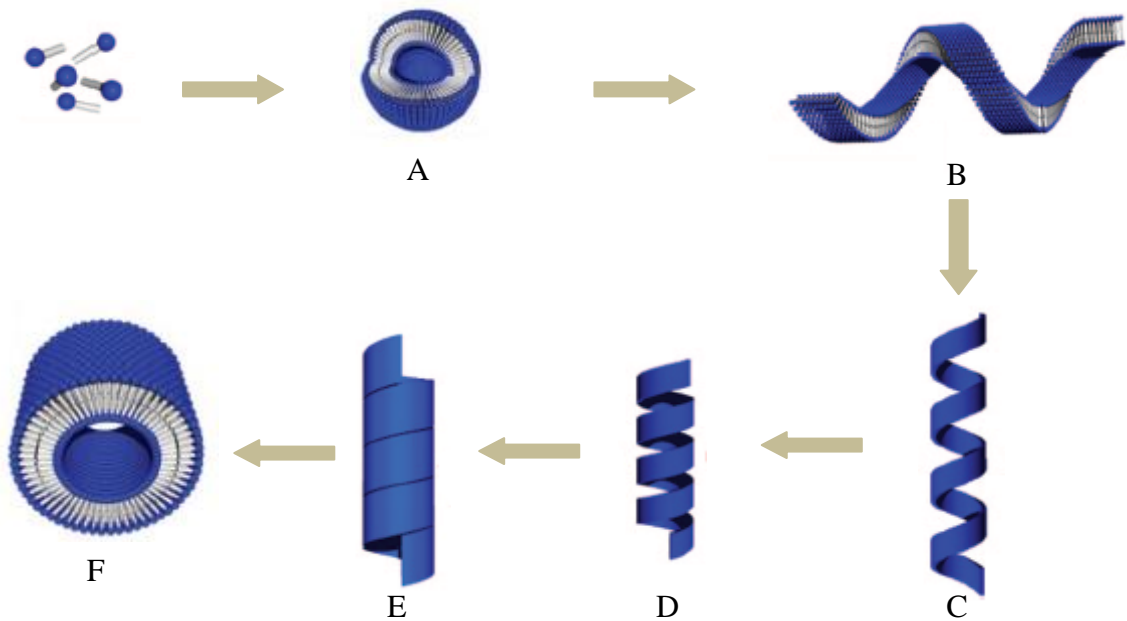
**Figure 18.1.** Exemples de molécules formant des nanotubules, **A** : le phospholipide DC<sub>8,9</sub>PC ; **B** : la *N*-dodécylgluconamide ; **C** et **D**: exemples de bolaamphiphiles ; **E** : le lipide bromure d'éthyl-2(pentacos-10,12-diynoylamino)éthanamminium

Il faut également noter qu'une grande partie des lipides utilisés pour la formation de nanotubules contiennent des groupes diacétylènes dans leur partie hydrophobe, comme les molécules **A**, **D** et **E** de la figure précédente. Ces fonctionnalités sont introduites afin de photopolymériser les nanotubules, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.



La formation des nanotubules de lipides se réalise soit par hydratation d'un film précédemment formé, soit par dissolution directe en solvant aqueux.

Le mécanisme de leur formation se déroule en plusieurs étapes décrites dans la figure 19.1 : l'auto-arrangement sous forme de vésicules bicouches (A), la formation d'hélices (B), le maintien du pas de l'hélice (C), le compactage de l'hélice (D et E) puis la formation du nanotubule (F).<sup>41</sup>



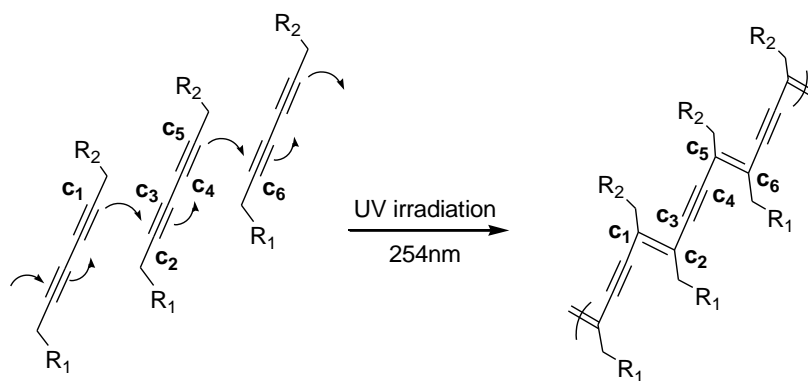
**Figure 19.1.** Mécanisme de formation des nanotubules à partir d'une molécule chirale. A : vésicules ; B : intermédiaire en rubans bicouches ; C : maintien du pas de l'hélice ; D et E : compactage de l'hélice grâce aux interactions entre les molécules ; F : formation de la nanotubule<sup>41</sup>

Les nanotubules de lipides polymérisables étant les plus étudiés, nous allons nous consacrer à leur caractérisation et à leurs applications dans la suite de ce paragraphe.

## III.2. Les nanotubules de lipides polymérisables

### III.2.1. Formation des polydiacétylènes conjugués

La plupart des lipides utilisés pour former des nanotubules contiennent des polydiacétylènes. Sous irradiation UV ou  $\gamma$ , ces groupements diacétylènes peuvent réagir entre eux et former des enchaînements alcène-alcyne, plus couramment appelés ene-yne. (Figure 20.1)



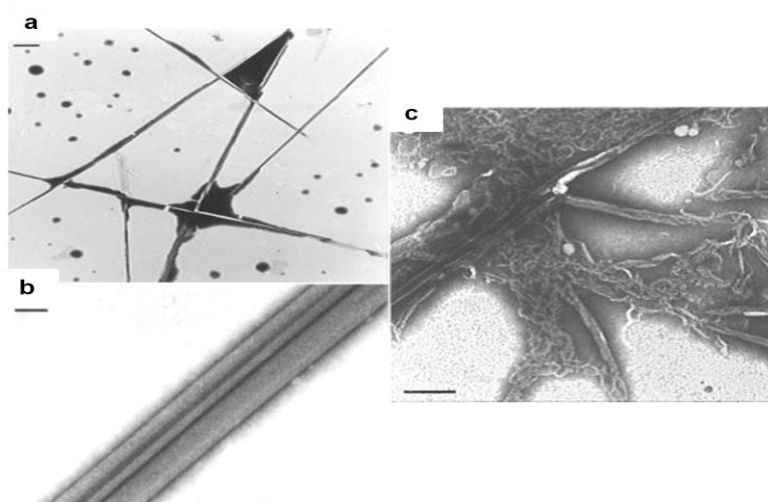
**Figure 20.1.** Représentation de la polymérisation de polydiacétylènes

Le mécanisme de polymérisation est radicalaire et consiste en une addition 1,4 des polydiacétylènes. Le mécanisme réactionnel sera détaillé dans le chapitre 2. Cette polymérisation va avoir une influence sur la structure des nanotubules et leur procurera des propriétés spectrales intéressantes, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

### III.2.2. Techniques de caractérisation des nanotubules de lipides polymérisables

#### III.2.2.a. Microscopie électronique à transmission

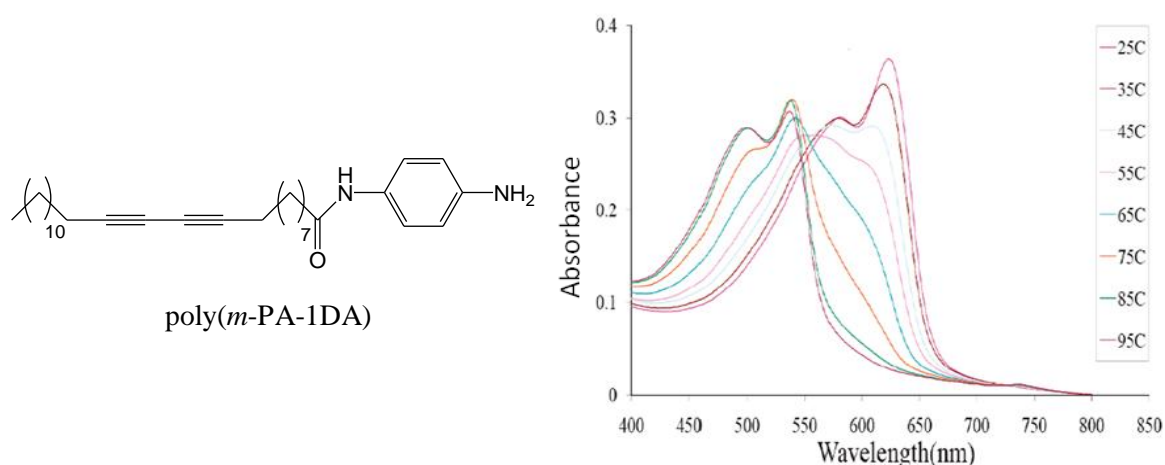
Comme pour les micelles, une des techniques principales de caractérisation est l'étude par microscopie. Elle permet d'observer directement les hélices, rubans et nanotubules formés. Dans le cas de lipides contenant des diacétylènes, les structures sont observées en microscopie avant et après photopolymérisation, afin d'évaluer les changements de structures induits par la polymérisation. Dans la plupart des cas, les structures des auto-arrangements sont modifiées, comme dans le cas du mélange équimolaire de deux phospholipides: DC<sub>8,9</sub>PC/DNPC, où seul le DC<sub>8,9</sub>PC est polymérisable.<sup>42</sup> Les images de MET montrent des nanotubules longs de plusieurs micromètres, avant polymérisation. (Figure 21.1, **A** et **B**) Après polymérisation, certains nanotubules sont conservés mais leur structure est en majorité altérée sous forme de rubans. (Figure 21.1, **C**)



**Figure 21.1.** Image MET de microtubes avant polymérisation : **a** (échelle 500 nm) et **b** (échelle 50 nm) et après polymérisation : **c** (échelle 200 nm)<sup>42</sup>

### III.2.2.b. Etudes par spectrophotométrie UV-visible

Avant irradiation, les spectres d'absorption des nanotubules de lipides ne sont caractérisés par aucun pic. Après irradiation UV, le spectre d'absorption évolue et un pic de forte intensité à 630 nm apparaît ainsi qu'un plus faible à 580 nm. Ce spectre est caractéristique de la forme bleue de ces systèmes conjugués. Lorsque ces systèmes sont soumis à des perturbations extérieures, de pH, solvant ou température, une nouvelle forme apparaît : la forme rouge, caractérisée par des pics à 530 nm et 480 nm. Les courbes UV obtenues après polymérisation de nanotubules de lipides poly(*m*-PA-1DA)<sup>43</sup> pour des températures comprises entre 25°C et 90°C sont présentées sur la figure 22.1.



**Figure 22.1.** Structure du lipide poly(*m*-PA-1DA) et spectres d'absorbance des nanotubules polymérisées en fonction de la température<sup>43</sup>

L'analyse des courbes UV montre que lors du chauffage des nanotubules polymérisées, le maximum d'absorption se déplace de 630 nm à 530 nm. La réversibilité de ce thermochromisme a été étudiée par refroidissement de la solution chauffée à 90°C. Après refroidissement à 25°C, les courbes UV montrent que le système ne revient pas à son état d'origine. Des études sur le thermochromisme et la thermoréversibilité des nanotubules formées de polydiacétylènes seront approfondies dans le chapitre 5, lors de l'étude des auto-arrangements tubulaires.

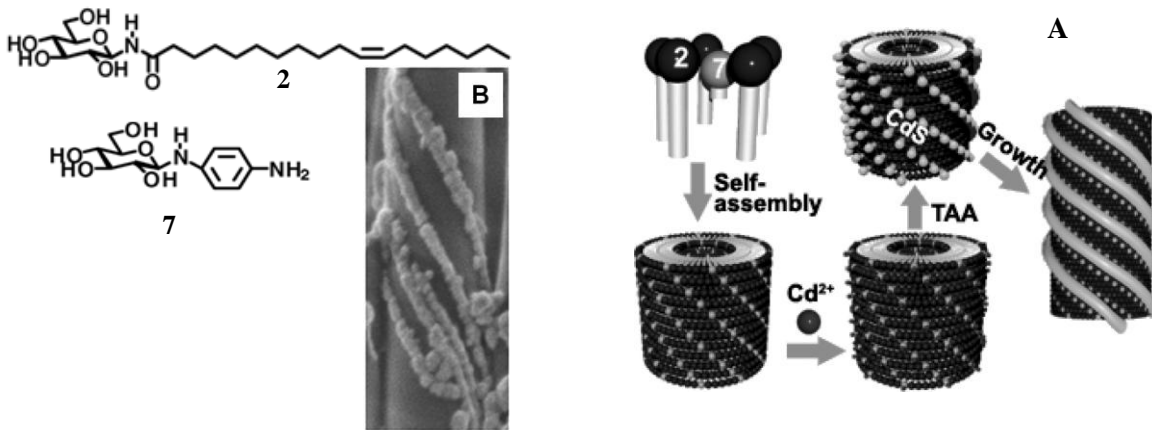
### III.2.2.c. Etudes par spectrométrie infra-rouge

Pour les nanotubules, les études infra-rouge, comme la Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier ou SITR et la spectrométrie Raman sont fréquemment utilisées pour étudier les interactions régissant les auto-arrangements. En effet, comme nous le verrons en détail dans le chapitre 5, des bandes caractéristiques existent dans les auto-arrangements comme les nanotubules. De plus, la polymérisation des diacétylènes peut être suivie par cette technique, grâce à la disparition de la bande caractéristique des diacétylènes vers  $2150\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition des bandes des alcènes conjugués avec les alcynes vers  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Cependant, ces bandes sont de faibles intensités et leur observation n'est pas toujours aisée par FT-IR.

## III.3. Applications

Les structures tubulaires ont attiré l'attention à cause de leur utilisation potentielle principalement dans le domaine de la micro-électronique et le domaine médical.<sup>44</sup> Les nanotubules de lipides peuvent être utilisés en tant que gabarit pour créer des nanotubes métalliques : l'habillage des nanotubules par des ions métalliques, comme le cuivre ou le nickel, permet d'obtenir des nanotubules possédant une forte conductivité ionique ainsi qu'un magnétisme important.<sup>45</sup> Des ions  $\text{Cd}^{2+}$  ont ainsi été fixés à la surface de nanotubules

possédant des têtes sucres et la réaction des ions  $\text{Cd}^{2+}$  avec un thiolate  $\text{S}^{2-}$ , issu de la décomposition de la thioacétamide, a permis d'entourer totalement la surface des nanotubules par enroulement des nanoparticules CdS sous forme d'hélice.<sup>46</sup> (Figure 23.1)



**Figure 23.1.** Structures du lipide **2** et du sucre **7** constituant les nanotubules. **A** : représentation schématique du processus d'enroulement<sup>46</sup> **B** : images MEB de l'enroulement de CdS autour des nanotubules.

Il faut noter que certains nanotubules de lipides possèdent des affinités avec des protéines ce qui leur procure la capacité de cristalliser de façon hélicoïdale une grande variété de protéines. Par exemple, de la Streptavidine s'est spontanément auto-assemblée en hélice autour de nanotubules munis de biotines.<sup>47</sup>

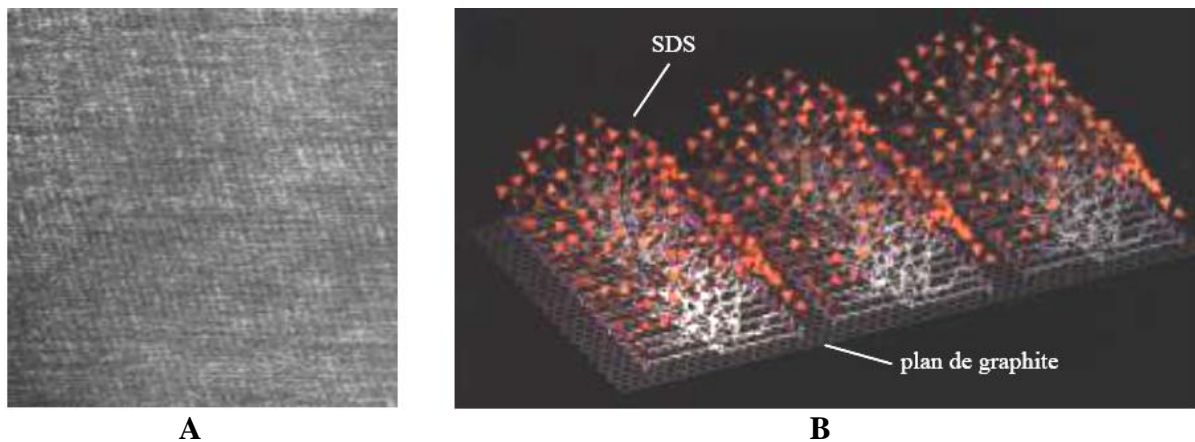
D'autre part, les nanotubules de lipides peuvent être utilisés en tant qu'agent de délivrance ou agent d'imagerie. Ils présentent l'avantage, pour la plupart, d'être biocompatibles et d'avoir une surface interne facilement accessible permettant l'introduction de composés à l'intérieur du tube. D'autre part, le volume interne du tube est important et peut être modulé en fonction du lipide que l'on utilise. Ainsi, des insecticides et des pesticides peuvent être encapsulés dans les nanotubules, tout comme des nanoparticules magnétiques.

Il existe donc de nombreuses applications potentielles pour les nanotubules de lipides, mais notre étude bibliographique a mis en évidence qu'ils étaient sujets à moins d'études que les micelles sphériques de copolymère.

## IV. Les auto-arrangements à la surface de nanotubes de carbone

### IV.1. Formation et caractérisation

C'est en 1994 que Manne *et coll.* ont pour la première fois montré que les molécules amphiphiles, comme le bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (CTAB) avaient la particularité de s'auto-arranger à la surface d'un plan de graphite.<sup>48</sup> Deux ans plus tard, Aksay *et coll.* ont proposé une schématisation en héli-micelles du SDS à la surface d'un plan de graphite.<sup>49</sup> (Figure 24.1)

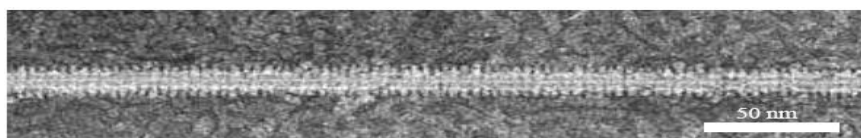


**Figure 24.1.** Image AFM d'arrangements héli-micellaires de CTAB à la surface d'un plan de graphite par Manne *et coll.* (A). Représentation des arrangements de SDS par Aksay *et coll.* (B)

En 1997, Bonard *et coll.*<sup>50</sup> ont montré qu'une solution aqueuse contenant 1% en masse de SDS pouvait suspendre des nanotubes de carbone simples parois (SWNT) pendant plusieurs semaines. Les nanotubes ainsi couverts de charges négatives n'ont pas subi d'agrégation.

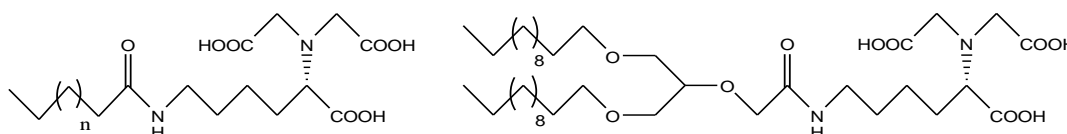
L'adsorption des amphiphiles à la surface de nanotubes de carbone est devenu un axe de recherche au laboratoire où les études menées par Cyril Richard<sup>51</sup> ont permis d'apporter des précisions quant à la nature des arrangements du SDS autour de nanotubes de carbone. Les images de microscopie électronique à transmission sur des nanotubes simple parois (SWNT) aussi bien que sur des nanotubes multi parois (MWNT), ont permis d'observer des striations à

la surface du nanotube suivant l'axe de celui-ci. Les lipides s'arrangeaient sous forme d'hémimicelles, tout comme à la surface du plan de graphite. (Figure 25.1)



**Figure 25.1.** Image MET d'arrangements de SDS à la surface d'un MWNT

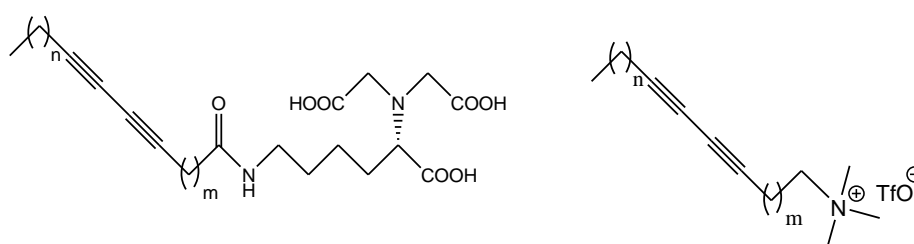
Par la suite, des lipides synthétiques ont été testés sur des nanotubes de carbone, et la plupart ont montré les mêmes propriétés d'adsorption que le SDS. Ces amphiphiles comportaient une tête polaire nitrilotriacétique acide (NTA) et une ou deux chaînes grasses. (Figure 26.1)



**Figure 26.1.** Amphiphiles synthétisés par Cyril Richard ( $6 < n < 14$ )

La tête polaire NTA avait été introduite du fait de sa capacité à complexer du nickel (II). Le motif NTA est en effet utilisé en tant que fixateur de protéines marquées par des séquences poly-histidines sur des monocouches lipidiques.<sup>52</sup>

Par la suite, d'autres amphiphiles ont été développés au laboratoire pour permettre l'extraction des arrangements formés autour des nanotubes sous forme d'anneaux. Ainsi, des amphiphiles possédant des unités photopolymérisables ont été synthétisés.<sup>53</sup> Ces lipides contenant un motif diacétylénique ont permis de consolider, par photopolymérisation, les auto-arrangements autour des nanotubes de carbone. (Figure 27.1)



**Figure 27.1.** Exemples de lipides photo-polymérisables synthétisés ( $4 < n < 11$  et  $1 < m < 9$ )

## IV.2. Applications

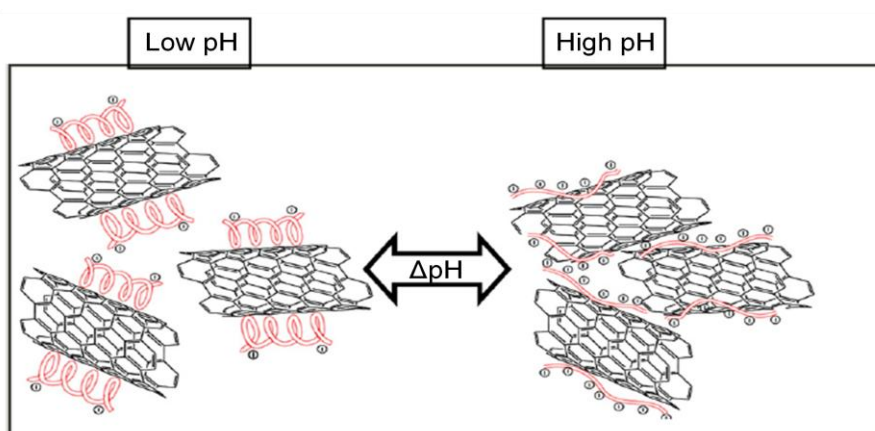
### IV.2.1. Dispersion des nanotubes de carbone en solution aqueuse

Les NanoTubes de Carbone (NTC) ont de nombreuses propriétés électroniques, thermiques, optiques et mécaniques qui leur donnent un grand intérêt dans de nombreux domaines, comme la nanoélectronique<sup>54-55</sup>, le renforcement de polymères,<sup>56-57</sup> ou les senseurs biologiques.<sup>58-59</sup> Cependant, les dispersions stables de NTC sont difficiles à obtenir en solution aqueuse à cause de leur facilité d'agrégation due aux forces de Van der Waals.<sup>60</sup> Il existe ainsi deux grandes méthodes pour suspendre des NTC en solution aqueuse : la fonctionnalisation non covalente et la fonctionnalisation covalente. La fonctionnalisation covalente consiste à modifier chimiquement la surface des nanotubes en introduisant par exemple des groupements acides carboxyliques, capables de réagir par la suite avec des entités polaires, leur permettant de se suspendre en solution aqueuse.<sup>61-62</sup> La fonctionnalisation non covalente consiste, quant à elle, à l'interaction de la surface hydrophobe des NTC avec des molécules comme des surfactants<sup>63-64</sup> ou des lipides synthétiques<sup>65-66</sup>, les interactions  $\pi$ - $\pi$  avec des composés aromatiques<sup>67-68</sup> ou l'enroulement de polymères.<sup>69</sup> Un désavantage majeur de la fonctionnalisation covalente est que la présence de groupes à la surface des NTC peut altérer les propriétés électriques, mécaniques ou optiques de ces nanotubes.<sup>70</sup> Ainsi, la fonctionnalisation non covalente est actuellement en fort développement et nous allons à présent détailler une étude de Grunlan *et coll.* où les dispersions de SWNT en solution aqueuse peuvent être modulées en fonction du pH.

En effet, cette étude a montré que des dispersions de NTC sont obtenues uniquement quand les polymères utilisés peuvent se dérouler autour du nanotube. Ainsi, en fonction du polymère utilisé, une variation de pH de la solution permet d'obtenir des NTC en suspension ou



agrégés.<sup>71</sup> La figure 28.1 explique l'hypothèse avancée pour un polymère polyanionique possédant des acides faibles. Ainsi, à faible pH, le polymère est partiellement déprotonné et il se trouve sous forme d'hélices autour des NTC. Les NTC ne peuvent alors pas s'agréger ce qui engendre la formation d'une suspension stable en solution aqueuse. (Figure 28.1, à gauche) A l'inverse, lorsque le polymère est entièrement déprotonné, il se déroule du fait des répulsions électrostatiques et vient se coller sur la surface des NTC, ce qui provoque leur agrégation. (Figure 28.1, à droite)



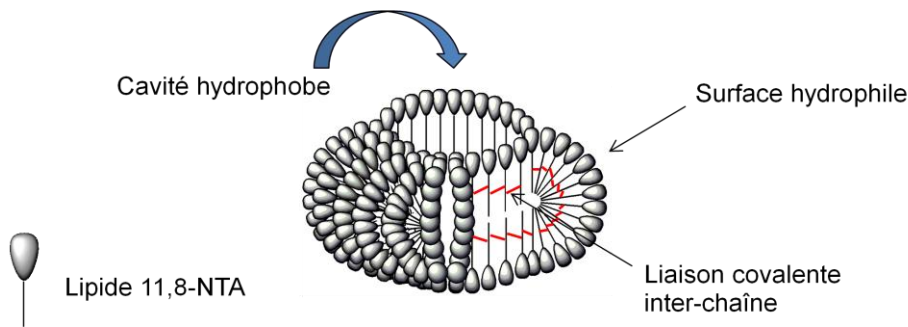
**Figure 28.1.** Représentation schématique de l'agrégation et de la dispersion en fonction du pH de la solution aqueuse avec un polycation faible

Il en va de même avec des NTC couverts d'acide folique, dont la suspension est possible à pH basique car l'acide folique est lui-même soluble. Par contre, par ajout d'acide chlorhydrique (pH=5,8), l'acide folique précipite ce qui provoque l'agrégation des NTC. D'autre part, cette propriété est réversible, car si le pH de la solution est basifié, les NTC se retrouvent à nouveau en suspension.<sup>72</sup>

#### IV.2.2. Les constructions lipidiques polymérisées

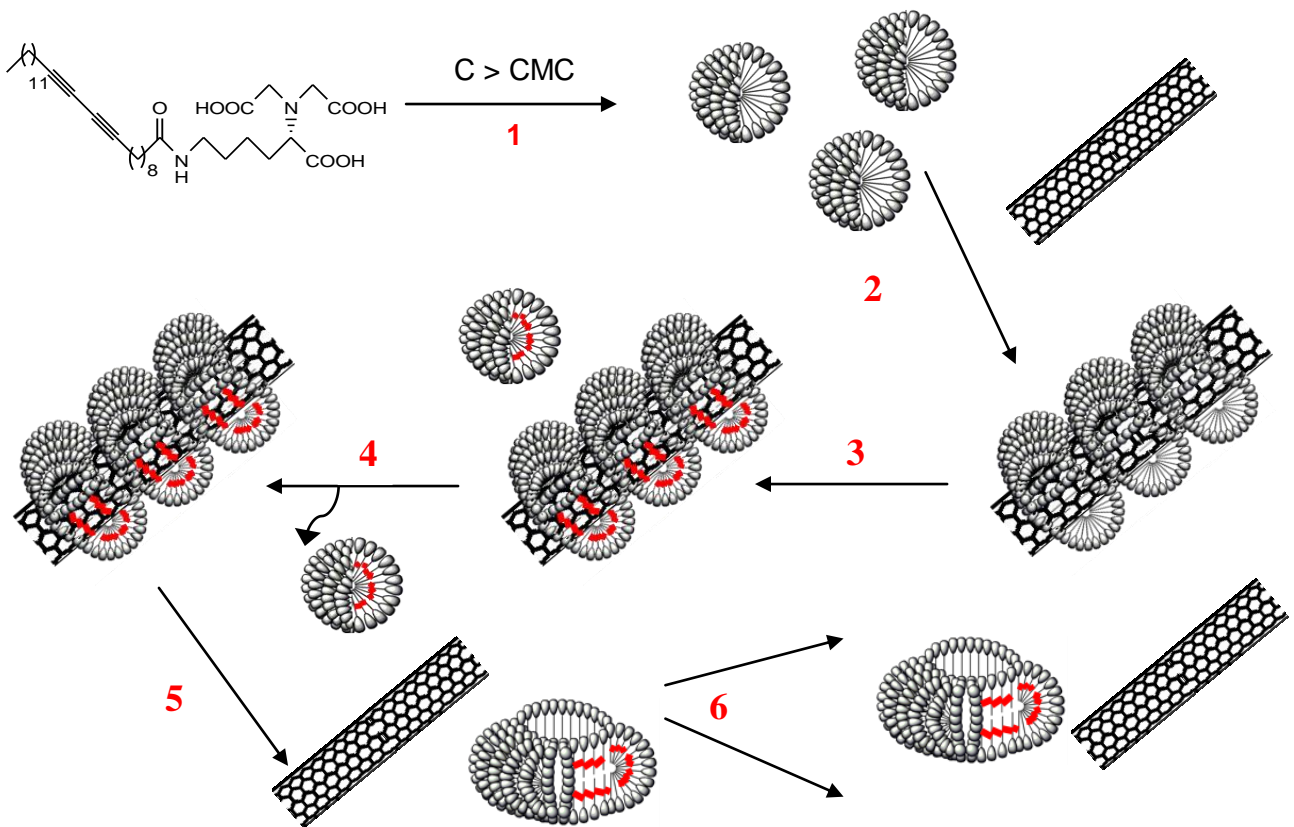
Le concept des Constructions Lipidiques Polymérisées ou CLP a été développé par Charles Mioskowski et est basé sur la formation des héli-micelles adsorbées à la surface des NanoTubes de Carbone (NTC), puis sur leur extraction. Les NTC sont donc utilisés comme

gabarit pour la formation des CLP, ce qui permet de créer de nouvelles structures offrant une surface externe hydrophile et un cœur hydrophobe. (Figure 29.1) Idéalement, le cœur possède une cavité provenant du gabarit du nanotube. Cependant, cette cavité n'a jusqu'à présent jamais pu être directement observée.



**Figure 29.1.** Représentation schématique des CLP

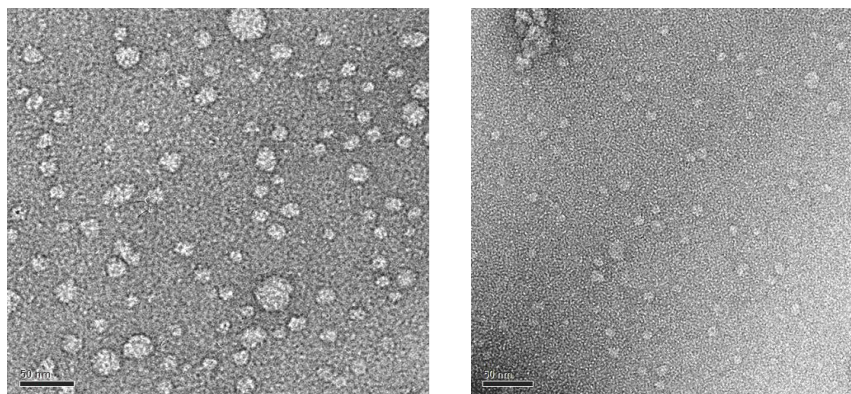
Des études ont été menées par Cédric Thauvin sur la formation des CLP à partir de l'amphiphile 11,8-NTA.<sup>73</sup> Plusieurs modes d'extraction ont été envisagés : le gel d'électrophorèse et l'ultra-sonication. La deuxième méthode a fourni une plus grande quantité de CLP avec des diamètres de l'ordre de 20 nm. Par la suite, Alexandre Morere a travaillé sur l'adaptation de la synthèse des CLP à l'échelle industrielle, ce qui a permis d'optimiser les conditions. Ainsi, lors de la synthèse de CLP durant cette thèse, nous nous baserons sur les conditions optimisées et décrites dans la figure 30.1.



**Figure 30.1.** Représentation schématique d'obtention des CLP à partir du lipide 11,8-NTA et de NTC

Les différentes étapes de ce processus sont :

1. Formation de micelles du lipide 11,8-NTA à une concentration supérieure à la CMC dans le tampon TRIS pH 8,
2. Sonication en présence de MWNT nTec ratio 1/10, 30 minutes dans un bain à ultrasons,
3. Photopolymérisation dans un four UV (48 W) pendant 10h,
4. Centrifugation des échantillons pour séparer les micelles restantes des nanotubes habillés (3 fois 10 minutes à 14000\*g), puis remplacement du milieu prélevé pas du TRIS,
5. Ultra-sonication, en présence d'éther diisopropylique, pour extraire les CLP de la surface des nanotubes (30 minutes à 100W). La phase organique est évaporée sous pression réduite et la phase aqueuse est récupérée pour l'étape suivante,
6. Centrifugation des échantillons (10 minutes à 14000\*g) et récupération du surnageant où se trouvent les CLP. (Figure 31.1) Les nanotubes nus se trouvant dans le culot.



**Figure 31.1.** Comparaison des images MET de CLP (à gauche) et de micelles polymérisées (à droite). Barre d'échelle : 50 nm

Ainsi, les CLP ont été testées pour la solubilisation de molécules hydrophobes, comme le Red30. Cependant, aucune différence significative n'a été remarquée par rapport aux micelles polymérisées : les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 8% en masse dans les deux cas. Il faut également noter que ces taux d'encapsulation sont légèrement inférieurs à ceux obtenus pour les micelles non polymérisées, qui étaient de l'ordre de 10% en masse.

Après cet exposé de trois types d'auto-arrangements en solution aqueuse, nous allons à présent revenir aux micelles sphériques et détailler les différentes méthodes utilisées pour les fonctionnaliser. En effet, lorsque l'on veut utiliser les micelles en tant qu'agent de vectorisation ou de diagnostic, il est nécessaire de les rendre détectables par l'introduction d'une sonde fluorescente

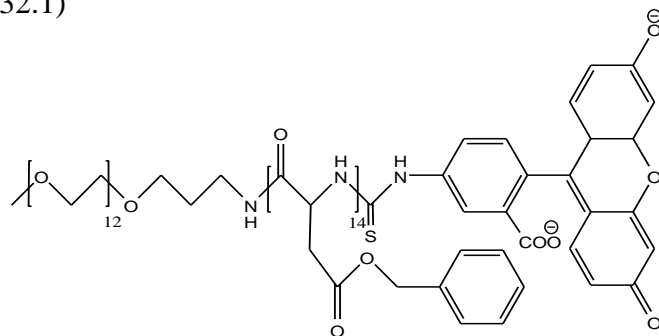
## V. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées

Il existe deux grandes méthodes pour obtenir des micelles sphériques de polymère fonctionnalisées : la fonctionnalisation des polymères avant formation des micelles et la fonctionnalisation après formation des micelles. La première méthode a l'avantage de permettre la caractérisation des polymères au niveau moléculaire, alors que la deuxième méthode ne permet qu'une caractérisation macroscopique et statistique. Après la formation des micelles, leur structure est étudiée par les mêmes techniques que celles décrites dans le paragraphe II. Des exemples de ces différentes méthodes vont être exposés dans ce paragraphe.

### V.1. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées à partir de polymères fonctionnalisés

#### V.1.1. Exemples de polymères fonctionnalisés

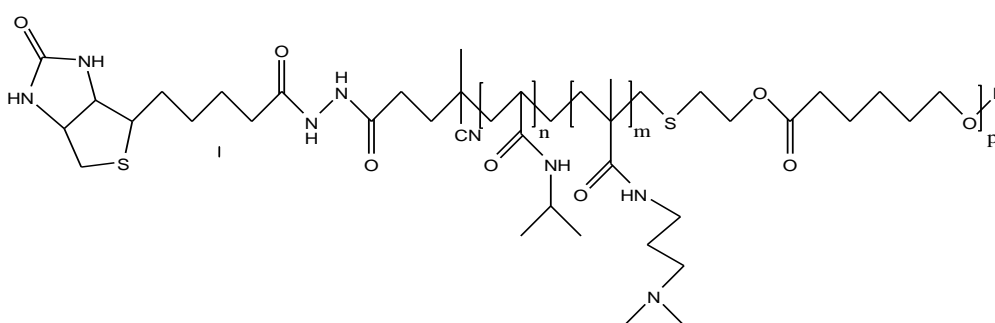
La fonctionnalisation la plus utilisée est la fixation d'une fluorescéine ou d'une rhodamine à l'extrémité hydrophobe d'un polymère.<sup>74-75-76</sup> Dans le cas du copolymère PEG<sub>12</sub>-*b*-PBLA<sub>14</sub>, le dérivé isothiocyanate de la fluorescéine (FITC) est couplé au groupe amine du polymère dans le DMSO.<sup>77</sup> (Figure 32.1)



**Figure 32.1.** Structure du copolymère PEG<sub>12</sub>-*b*-PBLA<sub>14</sub>-FITC<sup>77</sup>

Cette technique permet aussi d'introduire des groupements fonctionnels à façon, comme la biotine, dont l'utilisation est très répandue dans le domaine biomédical. Un copolymère peut donc à la fois contenir de la biotine et être marqué par une sonde fluorescente, comme la

fluorescéine. C'est le cas du copolymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL-FITC*,<sup>78</sup> synthétisé grâce à trois couplages : un premier entre la biotine et le dérivé acide carboxylique du polymère COOH-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-OH pour obtenir le polymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-OH*. Un deuxième couplage entre le groupe hydroxyle du polymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-OH* et un dérivé poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) est réalisé pour aboutir au copolymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL* présenté sur la figure 33.1.



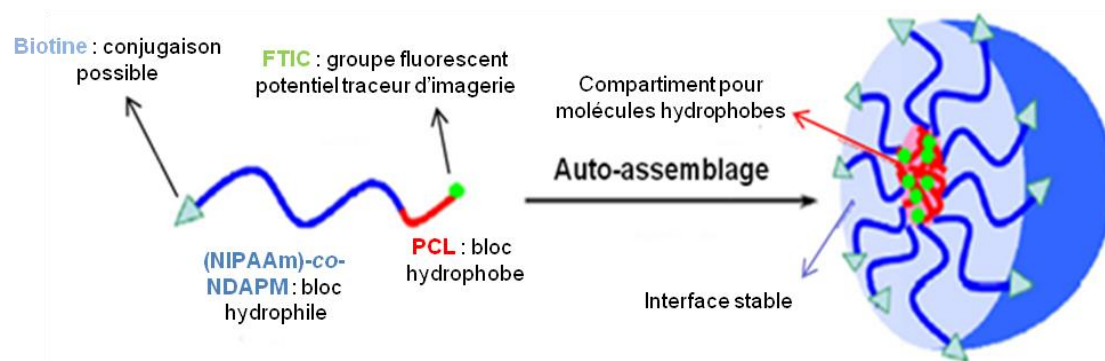
**Figure 33.1.** Représentation du polymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL*<sup>78</sup>

Pour finir, un troisième couplage est réalisé entre l'hydroxyde terminal de l' $\epsilon$ -caprolactone du copolymère et la fluorescéine sous forme isothiocyanate (FITC). Le copolymère fluorescent est ainsi obtenu avant d'être auto-arrangé en solution aqueuse pour former des micelles fluorescentes.

### V.1.2. Formation des micelles

Les micelles peuvent être formées de plusieurs façons : par hydratation d'un film de copolymère précédemment formé, par une dialyse de la solution de copolymère en solvant organique contre une solution aqueuse, ou par l'ajout de solution aqueuse dans une solution organique de copolymère.

Dans les deux exemples donnés précédemment, comme dans la plupart des cas, les sondes fluorescentes se situent sur la partie hydrophobe du copolymère donc se trouveront à l'intérieur des micelles. Afin de représenter la formation de ces micelles, Zhuo *et coll.* ont proposé une représentation schématique de l'auto-arrangement du copolymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL-FTIC* en solution aqueuse. (Figure 34.1)



**Figure 34.1.** Schématisation de la formation des micelles *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL-FTIC*<sup>78</sup>

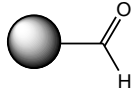
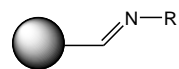
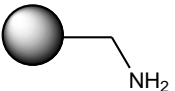
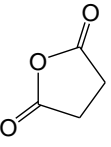
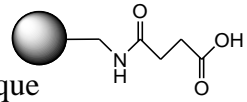
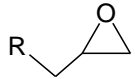
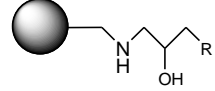
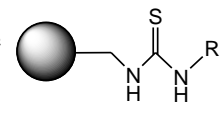
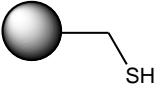
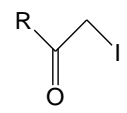
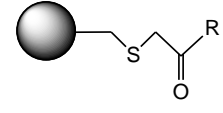
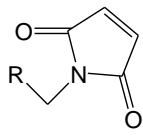
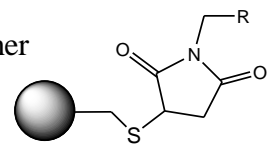
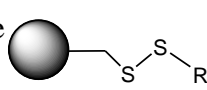
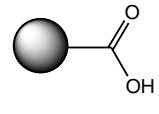
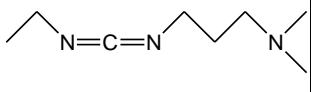
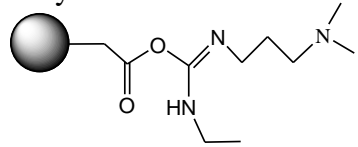
Les sondes fluorescences se retrouvent bien à l'intérieur du cœur hydrophobe de la micelle, tandis que les biotines sont en surface. Le diamètre de ces micelles, déterminé par DLS, a montré que le fait d'introduire une sonde hydrophobe dans leur cœur de la micelle ne produit pas de changement majeur de taille. Les micelles de copolymère *biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL-FTIC* possèdent un diamètre d'environ 150 nm. Les images réalisées en TEM de telles micelles marquées montrent la présence de particules sphériques, comme dans le cas de micelles non marquées.

## V.2. Obtention de micelles sphériques fonctionnalisées par fonctionnalisation de micelles préformées

La fonctionnalisation de micelles préformées peut avoir lieu de deux façons différentes : par fonctionnalisation covalente ou non covalente, c'est-à-dire par encapsulation. Des exemples de ces deux fonctionnalisations vont être donnés dans ce paragraphe.

### V.2.1. Fonctionnalisation covalente de micelles préformées

Différents groupes fonctionnels peuvent être introduits à la surface des micelles afin de modifier leurs réactivités. Quelques uns de ces fonctions et les réactions de couplage qui leur sont associées sont regroupées dans le tableau 2.1.<sup>79</sup>

Groupes fonctionnels présents sur les micelles	Réactifs de couplage	Produit obtenu sur les micelles
Aldéhyde 	Amine primaire $\text{H}_2\text{N}-\text{R}$	Base de Schiff 
Amine 	Anhydride succinique 	Acide carboxylique 
	Epoxyde 	Alcool 
	Isothiocyanate $\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{S}$	Isothiourée 
Thiol 	Iodoacétyle 	Thioether 
	Maléimide 	Thioether 
	Disulfide $\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R}'$	Pont disulfure 
Acide carboxylique 	Carbodiimide 	O-Acylisourée 

**Tableau 2.1.** Exemples de groupes fonctionnels permettant la fonctionnalisation de micelles préformées et réactions de couplage qui leur sont associées



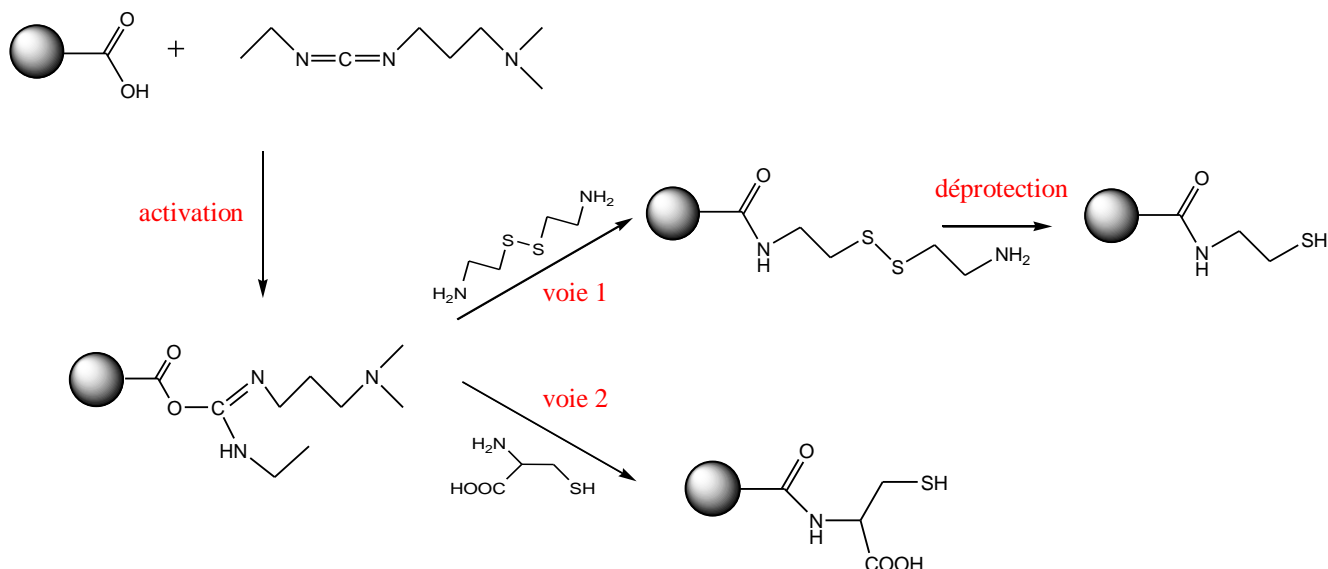
Le couplage que nous allons plus particulièrement développer dans la suite du paragraphe est le couplage entre un acide carboxylique, présent sur les micelles et une amine primaire. Il peut s'effectuer en deux temps par l'intermédiaire d'un acide activé, soit directement par l'utilisation d'un agent de couplage. Cette dernière possibilité est la plus fréquemment utilisée. Dans ce cas, les micelles contenant des acides carboxyliques sont dissoutes dans un tampon aqueux, dont le pH est compris entre pH 4,7 et pH 7,5. L'agent de couplage, en général EDC ou EDAC, puis l'amine primaire sont additionnées. La réaction est agitée à 2 heures à température ambiante puis dialysée contre un tampon.

En utilisant cette réaction de dérivatisation, il est possible d'introduire une grande diversité de fonctions réactives en faisant varier l'amine utilisée.

#### V.2.1.a. Introduction de thiols sur des micelles préformées par couplage peptidique

Nobs *et coll.* ont décrit deux protocoles pour la fixation de fonctions thiols sur les nanoparticules de poly(DL-lactic acid) ou PLA à partir de leurs acides carboxyliques, en utilisant soit la cystamine, soit la cystéine comme espèce nucléophile.<sup>80</sup> La première étape commune consiste en l'activation des acides par l'EDAC dans le tampon phosphate (pH 4,7, 0,1M) suivi soit de :

- ✓ l'attaque nucléophile de la cystamine, suivie de la coupure du pont disulfure par le DTT ou le TCEP (Figure 35.1, voie 1)
- ✓ l'attaque nucléophile de la cystéine (voie 2)



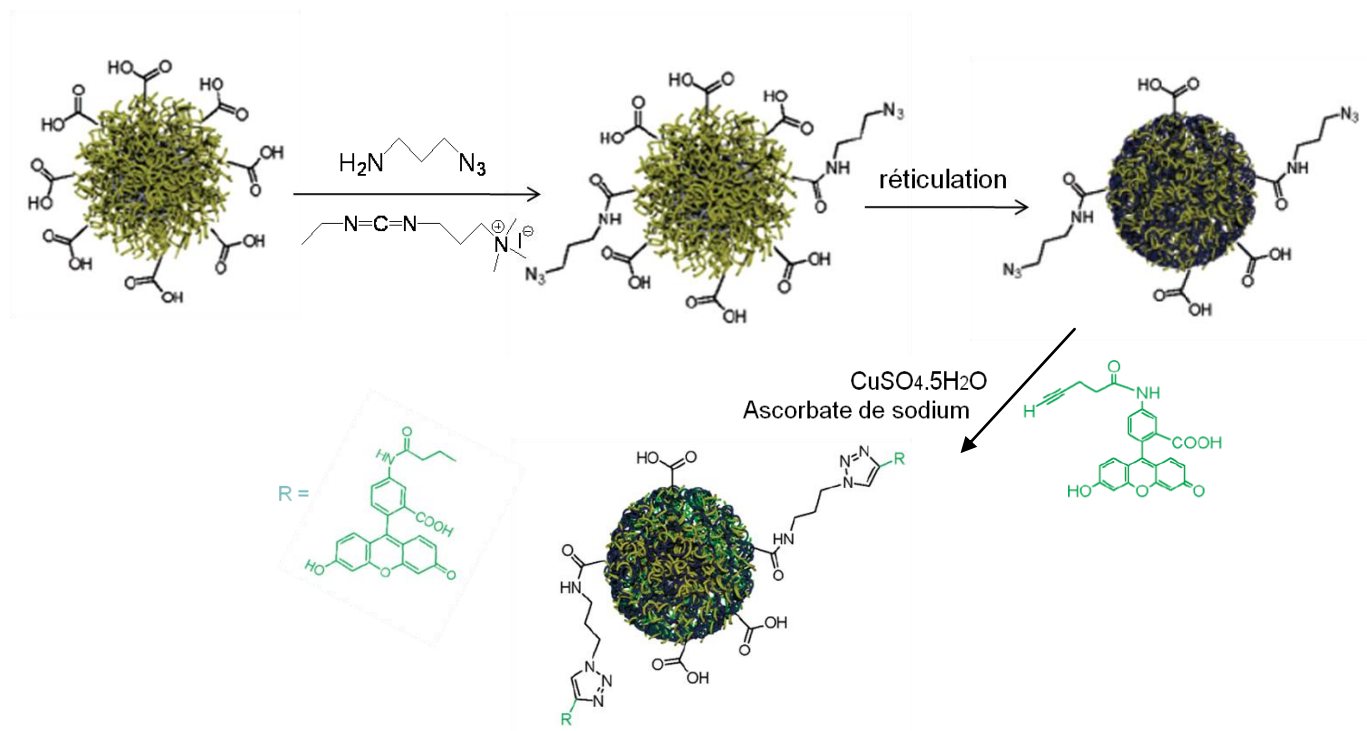
**Figure 35.1.** Voies de synthèses de fixation de thiols sur les particules PLA

L'activation des acides carboxyliques est réalisée dans le tampon phosphate pH 4,7 en présence d'EDAC (570 équivalents par rapports aux acides) durant 3 heures, puis les particules sont isolées par centrifugation. Après resuspension dans le tampon phosphate, la cystamine dihydrochloride ou la cystéine (1300 équivalents par rapport aux acides) est ajoutée et les solutions sont à nouveau agitées pendant 3 heures, puis les particules sont isolées par centrifugation. Pour la voie 1, les ponts disulfures sont coupés par ajout de DTT (dithiotreititol) dans le tampon phosphate pH 4,7 ou de TCEP (Tris(2-CarboxyEthyl)-Phosphine hydrochloride) dans le tampon MES pH 4,7. Les solutions sont agitées 24 heures puis les micelles sont isolées par centrifugation. La quantité de thiols fixés est quantifiée par dosage d'Ellman dans le tampon phosphate pH 7,2 en présence de DTNB (5,5'-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoic acid)). Le DTNB réagit en effet avec les thiols pour libérer un chromophore absorbant à 412 nm, le NTB. La quantité de NTB libérée permet ainsi de calculer le nombre de thiols sur les particules. Les conditions de réactions se sont révélées plus efficaces pour la voie 1 que pour la voie 2. En effet, avec la voie 2, une charge d'environ 8,5 mmoles de thiols par mole de micelles a été déterminée, c'est-à-dire environ 1100 thiols par particule de PLA. Alors que pour la voie 1, 0,9 mmoles de thiols par mole de PLA ont été détectées, soit

112 thiols par particules de PLA. Durant cette étude, des réactions contrôlées ont été réalisées, en mettant en solution des micelles et de la cystéine mais en absence d'EDAC. La quantification par le dosage d'Ellman n'a pas révélé la présence de groupement thiol sur les micelles, ce qui indique que dans les expériences précédentes, les thiols ont bien été fixés de la manière spécifique, par l'action de l'EDAC sur les particules.

### V.2.1.b. Introduction d'azides sur des micelles préformées par couplage peptidique

Le groupe de Wooley<sup>81</sup> a décrit une méthode de fonctionnalisation de micelles réticulées par la couronne à l'aide d'un groupement azide. Ces micelles pourront ensuite être fonctionnalisées par chimie de « click » avec une fluorescéine alcyne. Le principe de la fonctionnalisation se déroule en trois étapes et est décrite dans la figure 36.1.



**Figure 36.1.** Principe de la fonctionnalisation des micelles poly(acrylic acid)-*b*-polystyrène<sup>81</sup>

La première étape est l'activation des fonctions acides carboxyliques présentes à la surface des copolymères poly(acrylic acid)-*b*-polystyrène. Celle-ci est réalisée dans l'eau, en présence

d'EDC méthiodide (0,3 équivalents par rapport aux fonctions acides), un dérivé de l'EDC, et de 3-azidopropylamine (0,25 équivalents). Après dialyse et par analyse infra-rouge des micelles obtenues, les auteurs ont déduit que la totalité de la 3-azidopropylamine avait réagi et que 25% des acides carboxyliques était à présent substitués par des azides. Les micelles sont ensuite réticulées par la couronne par la méthode décrite dans le paragraphe II.2.2.b et les azides fixés sont mis à réagir par chimie de « click » afin de rendre les micelles fluorescentes. Pour cela, de la fluorescéine alcyne est ajoutée (1,1 équivalents par rapport aux azides) en présence d'ascorbate de sodium (0,5 équivalents) et de cuivre (I) (0,25 équivalents) dans le tampon phosphate pH 7,3.

Les produits obtenus à chaque étape sont purifiés par dialyse contre le tampon phosphate pH 7,3. Le rendement de la réaction de click a été déterminé par spectrométrie UV-visible et s'est révélé quantitatif, c'est-à-dire que la totalité des azides initialement présents ont été substitués par des fluorescéines. Ainsi, la surface de chaque micelle est constituée de 75% d'acides carboxyliques et de 25% de fluorescéine. Des mesures d'émission de fluorescence de ces micelles ont montré qu'une extinction de fluorescence était observée, par rapport à la fluorescéine seule en solution, ce qui a permis aux auteurs de conclure que les fluorescéines étaient bien fixées sur les micelles. Il n'a cependant pas été précisé à quel nombre de fluorescéine ce pourcentage correspondait par micelle.

D'autre part, les analyses par DLS des micelles avant fonctionnalisation ont montré des diamètres de 47 nm, tandis que le diamètre après fixation de la fluorescéine était de 44 nm. Ni la réticulation, ni la fonctionnalisation n'ont donc induit de modification de la taille des micelles. Les analyses de microscopie, MET et MAF, ont révélé des structures sphériques avant et après fonctionnalisation.

## V.2.2. Fonctionnalisation non covalente de micelles préformées

La deuxième grande méthode pour marquer des micelles de polymère est d'encapsuler une molécule hydrophobe dans le cœur des micelles. Dans ce cas, le grand avantage est que la molécule est naturellement adsorbée dans le cœur de la micelle et aucune réaction chimique n'a besoin d'être mise en place. Cette molécule peut être une sonde fluorescente, un principe actif ou les deux à la fois.<sup>82-83</sup> En ce qui concerne les sondes fluorescentes, la fluorescéine ou la rhodamine sont fréquemment utilisées, même si des sondes infra-rouges sont de plus en plus courantes.<sup>84-85</sup>

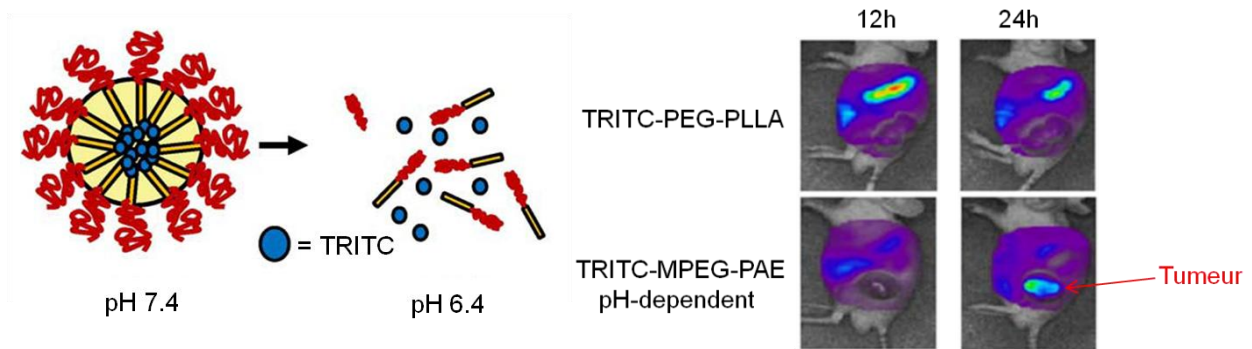
L'encapsulation de sondes fluorescentes dans les micelles peut avoir lieu pendant ou après la formation des micelles. Par exemple, dans le cas de l'encapsulation de la carboxyfluorescéine dans des micelles de copolymère diblocs de polysilanes et d'acide poly(méthacrylique),<sup>86</sup> l'encapsulation a lieu par agitation de la sonde avec la solution aqueuse de micelles pendant quatre jours. L'excès de sonde est éliminé par un gel d'exclusion stérique.

La sonde fluorescente peut également être encapsulée pendant la formation des micelles, comme lors de l'encapsulation de la tétraméthylrhodamine isothiocyanate ou TRITC dans les micelles de copolymère MPEG-PAE (poly-aminoester).<sup>87</sup> Pour ce faire, la sonde a été dissoute dans du méthanol et agitée en présence du copolymère préalablement placé dans un mélange chloroforme/méthanol (1/1). La solution a ensuite été concentrée pour former un film qui a été réhydraté par du tampon phosphate dans des micelles de copolymère. Afin d'éliminer l'excès de TRITC, le mélange obtenu a été filtré sur un filtre 0,45µm Millipore puis dialysé. Ainsi, des micelles de copolymère MPEG-PAE ont été chargées avec 10% de TRITC par rapport à la masse des micelles. Les propriétés de ces micelles vont être détaillées dans le paragraphe suivant.

### V.3. Applications des micelles sphériques fonctionnalisées

Afin d'étudier le comportement en présence de cellules et le comportement *in vivo* des différentes micelles fonctionnalisées avant ou après leur formation, ces dernières ont été munies de sondes fluorescentes. Les micelles marquées par liaison covalente (*biotin-P-(NIPAAm)-co-NDAPM)-b-PCL-FITC*),<sup>78</sup> tout comme celles marquées par encapsulation<sup>23-24</sup> ont montré une forte internalisation dans des cellules. En ce qui concerne les études *in vivo*, les micelles fonctionnalisées par liaisons non covalentes montrent un avantage important : la possibilité de relarguer la sonde fluorescente. Cette propriété est exploitée grâce à des micelles qui sont par exemple, sensibles au pH du milieu dans lequel elles se trouvent.<sup>88-89-90</sup>

Les micelles MPEG-PAE décrites dans le paragraphe précédent possèdent cette particularité d'être sensible au pH de la solution aqueuse : pour un pH de 6,4, les micelles se dissocient, tandis qu'elles conservent leur structure pour des pH supérieurs à 6,4, notamment au pH physiologique 7,4. Les auteurs ont préalablement montré qu'au pH d'une tumeur (pH 6,4), la libération d'un agent encapsulé était beaucoup plus rapide qu'à pH 7,4.<sup>87</sup> Dans cette étude, de la tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC) a été encapsulée dans les micelles avec un taux d'encapsulation de 10 % en masse de micelles. Ces dernières ont ensuite été injectées à des souris porteuses d'une tumeur. Les tumeurs ayant un pH 6,4, plus faible que le pH physiologique (pH 7,4), les auteurs ont utilisé ces micelles pour libérer la sonde fluorescente spécifiquement dans la tumeur. Des micelles contrôles de copolymère PEG-PLLA ont également été marquées par fluorescence et injectées. Le principe de libération de la sonde ainsi que les images des souris à 12 heures et 24 heures après l'injection sont présentées figure 37.1.



**Figure 37.1.** Schématisation de la dissociation des micelles MPEG-PAE à pH6.4 et images des souris après injection de micelles TRITC-PEG-PLLA et TRITC-MPEG-PAE<sup>87</sup>

Les micelles dont la stabilité ne dépend pas du pH ont été détectées dans tout le corps, poumon, reins, foie et tumeur jusqu'à 24 heures après injection. A l'inverse, les micelles dépendantes du pH, MPEG-PAE, ont été détectées dans la tumeur 24 heures après injection. Les organes ont ensuite été prélevés et la fluorescence a été quantifiée. Pour les micelles MPEG-PAE, la fluorescence a été détectée dans la tumeur avec une intensité 11 fois plus importante que pour les micelles témoins, et 14 fois plus forte que dans les autres organes. Ces expériences montrent que par leur caractère pH-dépendant, les micelles MPEG-PAE sont capables de cibler plus efficacement une tumeur que des micelles classiques. Il est à noter qu'une molécule anticancéreuse a également pu être encapsulée dans ces micelles, ce qui suggère qu'elles pourraient être prochainement testées dans une thérapie contre le cancer. Il faut tout de même remarquer que ces résultats ont été déduits du fait que les micelles libèrent plus efficacement la sonde fluorescente à pH 6,4, mais cette étude ne tient pas compte de la diffusion passive des micelles et on peut se demander si la détection d'une forte intensité de fluorescence dans la tumeur après 24 heures ne vient pas simplement d'une diffusion passive.

## **VI-Conclusion**

Nous venons de voir que les amphiphiles pouvaient s'auto-arranger sous différentes formes possédant chacune ses caractéristiques et ses fonctions. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à décrire la synthèse de micelles sphériques réticulées et leur fonctionnalisation de façon covalente ou non covalente, pour être utilisées comme agent de délivrance ou pour l'imagerie médicale.

L'étude que nous allons présenter maintenant porte sur l'étude de micelles sphériques comportant une partie hydrophobe diacétylénique et d'une tête polaire acide nitrilotriacétique, appelée NTA. Après leur formation, ces micelles sont photo-polymérisées, grâce aux diacétylènes, ce qui induit des changements structuraux. L'étude de ces changements structuraux et leur influence sur la stabilité des micelles vont être étudiés dans la prochaine partie.



## Références

- (1) Torchilin, V.P. Micellar nanocarriers : pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1-16
- (2) Kunitake, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, *31*, 709-726
- (3) Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces; Academic Press; New York, **1985**
- (4) McBain, J.W. Constitution of soap in solution-sodium myristate and sodium laurate *Trans. Faraday Soc.* **1913**, *9*, 99
- (5) Yokoyama, M.; Inoue, S.; Kataoka, K.; Yui, N.; Sakurai, Y.; Preparation of adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. A new type of polymeric anticancer agent, *Makromol. Chem. Rapid. Commun.* **1987**, 431-435
- (6) Adams, M.L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G.S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1343-1355
- (7) Chiappetta, D.A.; Sosnik, A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drug, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 303-317
- (8) Caba, B.L.; Zhang, Q.; Carroll, M.R.J. ; Woodward, R.C. ; St.Pierre, T.G. ; Gilbert, E.P. ; Riffle, J.S. ; Davis, R.M. Nanostructure of PEO-polyurethane-PEO triblock copolymer micelles in water, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *344*, 81-89
- (9) Rodriguez-Hernandez, J.; Chécot, F.; Gnanou, Y. ; Lecommandoux, S. Toward 'smart' nano-objets by self-assembly of copolymers in solution, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 691-724
- (10) O'Reilly, R.K.; Hawker, C.J.; Wooley, K.L. Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1068-1083
- (11) Prochaska, K.; Baloch, M.K. Basic principles of thermal degradation and thermal stabilization of poly(vinyl chloride). Synergism of stabilizer action, *Makromol. Chem.* **1979**, *180*, 2521-2523
- (12) Guo, A.; Liu, G. Yao, J. Star polymers and nanospheres from cross-linkable diblock copolymers, *Macromolecules* **1996**, *29*, 2487-2493
- (13) Hoppenbrouwers, E.; Li, Z.; Liu, G. Triblock nanospheres with amphiphilic coronal chains, *Macromolecules* **2003**, *36*, 876-881
- (14) Tian, L.; Yam, L.; Wang, J.; Tat, H.; Urich, K. Core crosslinkable polymeric micelles from PEG-lipid amphiphiles as drug carriers, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2317-2324
- (15) Rheingans, O.; Hugenberg, N.; Harris, J.R.; Fischer, K.; Maskos, M. Nanoparticles built of cross-linked heterotelechelic, amphiphilic poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(ethylenoxide) diblock copolymers, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4780-4790
- (16) Hu, X.; Chen, X.; Wei, J.; Liu, S.; Jing, X. Core crosslinking of biodegradable block copolymer micelles based on poly(ester carbonate), *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 456-463
- (17) Thurmond, K.B.; Kowalewski, T.; Wooley, K.L. Water-soluble Knedel-like structures : the preparation of shell-cross-linked small particles, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7239-7240

- (18) Wooley, K.L. Shell crosslinked polymer assemblies : nanoscale constructs inspired from biological systems, *J.Polym.Sci., Part A : Polym. Chem.* **2000**, *38*, 1397-1407
- (19) Wei, H.; Cheng, C.; Chang, C.; Chen, W.Q.; Cheng, S.X.; Zhang, X.Z.; Zhuo, R.X. Synthesis and applications of shell cross-linked thermoresponsive hybrid micelles based on poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate)-*b*- poly (methyl methacrylate), *Langmuir*, **2008**, *24*, 4564-4570
- (20) Kim, H.K.; Park, T.G. Surface stabilization of diblock PEG-PLGA micelles by polymerization of *N*-vinyl-2-pyrrolidone, *Macromol. Rapid. Commun.* **2002**, *23*, 26-31
- (21) Yang, T.F.; Chen, C.N.; Chen, M.C.; Lai, C.H.; Liang, H.F.; Sung, H.W. Shell-crosslinked Pluronic L121 micelles as a drug delivery vehicle, *Biomaterials* **2006**, *28*, 725-734
- (22) Sezgin, Z.; Yüksel, N.; Baykara, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *64*, 261-268
- (23) Mahmud, A.; Lavasanifar, A. The effect of block copolymer structure on the internalization of polymeric micelles by human breast cancer cells, *Coll. Surf.* **2005**, *45*, 82-89
- (24) Li, Y.; Qi, X.R.; Maitani, Y.; Nagai, T. PEG-PLA diblock copolymer micelles-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier : in vitro and in vivo characterizations, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 1-10
- (25) You, J.; Hu, F.Q.; Du, Y.Z.; Yuan, H. Polymeric micelles with glycolipid-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2450-2456
- (26) Wilhelm, M.; Zhao, C.L.; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M.A.; Mura, J.L.; Riess, G.; Croucher, M.D. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1033-1040
- (27) Torchilin, V.P.; Lukyanov, A.N.; Gao, Z.; Papahadjopoulos-Sternberg, B. Immunomicelles : targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 6039-6044
- (28) Ogier, J.; Arnault, T.; Doris, E. Recent advances in the field of nanometric drug carriers, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 693-711
- (29) Davis, M.E.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. Nanoparticles therapeutics : an emerging treatment modality for cancer, *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 771-782
- (30) Torchilin, V.P. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 235-252
- (31) Torchilin, V.P. Polymeric contrast agents for medical imaging, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2000**, *1*, 183-215
- (32) Zhang, G.; Zhang, R.; Wen, X.; Li, L.; Li, C. Micelles based on biodegradable poly(L-glutamic acid)-*b*-polylactide with paramagnetic Gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale MRI-visible delivery system, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 36-42
- (33) Shiraishi, K.; Kawano, K.; Minowa, T.; Maitani, Y.; Yokoyama, M. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, *J. Controlled Rel.* **2009**, *136*, 14-20
- (34) Mody, V.V.; Nounou, M.I.; Bikram M. Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 795-807

- (35) Trubetskoy, V.S.; Gazelle, G.S.; Wolf, G.L.; Torchilin, V.P. Block-copolymer of polyethylene glycol and polylysine as a carrier of organic iodine : design of long-circulating particulate contrast medium as X-ray computed tomography, *J. Drug. Targ.* **1997**, *4*, 381-388
- (36) Konga, W.H.; Lee, W.J.; Cui, Z.Y.; Bae, K.H.; Park, T.G.; Kima, J.H.; Park, K.; Seo, S.W. Nanoparticulate carrier containing water-insoluble iodinated oil as a multifunctional contrast agent for computed tomography imaging, *Biomaterials* **2007**, *28*, 5555-5561
- (37) Georger, J.H.; Singh, A.; Price, T.T.; Schnur, J.M.; Yager, P.; Schoen, P.E. Helical and tubular microstructures formed by polymerizable phosphatidylcholines, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6169-6175
- (38) Lee, H.Y.; Nam, S.R.; Hong, J.I. Self-assembles organic microtubules from amphiphilic molecules, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 226-235
- (39) Zhou, W.; Li, Y.; Zhu, D. Progress in polydiacetylene nanowires by self-assembly an self-polymerization, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 222-229
- (40) Lee, S.B.; Koepsel, R.; Stolz, D.B.; Warriner, H.E.; Russell, A.J. Self-assembly of biocidal nanotubes from a single-chain diacetylene amine salt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13400-13405
- (41) Zhou, Y.; Shimizu, T. Lipid nanotubes : a unique template to create diverse one-dimensional nanostructures, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 625-633
- (42) Svenson, S.; Messersmith, P.B. Formation of polymerizable phospholipid nanotubules and their transformation into a network gel, *Langmuir* **1999**, *15*, 4464-4471
- (43) Wacharasindhu, S.; Montha, S.; Boonyiseng, J.; Potisatityuenyong, A.; Phollookin, C.; Tumcharern, G.; Sukwattanasinitt, M. Tuning of thermochromism properties of polydiacetylene toward universal temperature sensing materials through amide hydrogen bonding, *Macromolecules* **2010**, *43*, 716-724
- (44) Zhou, Y. Lipid nanotubes : formation, templating nanostructures and drug nanocarriers, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2008**, *33*, 183-196
- (45) Zabetakis, D. Hollow metal cylinders produced from diacetylenic lipid, *J. Mater. Res.* **2000**, *15*, 2368-2374
- (46) Zhou, Y.; Ji, Q.; Masuda, M.; Kamiya, S. ; Shimizu, T. Helical arrays of CdS nanoparticles tracing on a functionalized chiral template of glycolipid nanotubes, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 403-406
- (47) Ringler, P.; Müller, W.; Ringsdorf, H., Brisson, A. Functionalized lipid tubules as tools for helical crystallization of protein, *Chem. Eur. J.* **1997**, *4*, 620-625
- (48) Manne, S.; Cleveland, J.P.; Gaub, H.E.; Stucky, G.D.; Hansma, P.K. Direct visualization of surfactant hemimicelles by force microscopy of the electrical double layer, *Langmuir* **1994**, *10*, 4409-4413
- (49) Aksay, I.A.; Trau, M.; Manne, S.; Honma, I.; Yao, N.; Zhou, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P.M.; Gruner, S.M. Biomimetic pathways for assembling inorganic thin films, *Science* **1996**, *273*, 892-898
- (50) Bonard, J.M.; Stora, T.; Salvétat, J.P.. Maier, F. ; Stöckli, T. ; Duschl, C. ; Forro, L.; de Heer, W.A.; Châtelain, A. Purification and size-selection of carbon nanotubes *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 827-831

- (51) Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T.W.; Mioskowski, C. Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes, *Science* **2003**, *300*, 775-778
- (52) Dorn, I.T.; Neumaier, K.R.; Tampé, R. Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2753-2763
- (53) Rickling, S.; Schultz, P. Mioskowski, C. Brevet **2003** FR2853657
- (54) Futaba, D. N.; Hata, K.; Yamada, T.; Hiraoka, T.; Hayamizu, Y.; Kakudate, Y.; Tanaike, O.; Hatori, H.; Yumura, M.; Iijima, S. Size-selective growth of double-walled carbon nanotubes forests from engineered iron catalyst, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 987-994
- (55) Avouris, P.; Chen, Z.; Perebeinos, V. Carbon-based electronics, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 605-615
- (56) Bredeau, S.; Peeterbroeck, S.; Bonduel, D.; Alexandre, M.; Dubois, P. From carbon nanotube coating to high-performance polymer composites, *Polym. Int.* **2008**, *57*, 547-553
- (57) Du, Y.; Hu, N.; Zhou, H.; Li, P.; Zhang, P.; Zhao, X.; Dang, G.; Chen, C. Dispersions of multi-walled carbon nanotubes in poly(aryl ether ketone) obtained by in situ polymerization, *Polym. Int.* **2009**, *58*, 832-837
- (58) Peng, G.; Tisch, U.; Haick, H. Detection of nonpolar molecules by means of carrier scattering in random networks of carbon nanotubes: toward diagnosis of diseases via breath samples, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1362-1368
- (59) Zilberman, Y.; Tisch, U.; Pisula, W.; Feng, X.; Müllen, K.; Haick, H. Sponglike structures of hexa-peri-hexabenzocoronene derivatives enhance the sensitivity of chemiresistive carbon nanotubes to nonpolar volatile organic compounds of cancer, *Langmuir* **2009**, *25*, 5411-5416
- (60) Terrones, M.; Terrones, H.; Banhart, F.; Charlier, J. -C.; Ajayan, P. M. Coalescence of single-walled carbon nanotubes, *Science* **2000**, *288*, 1226-1229
- (61) Singh, P.; Campidelli, S.; Giordani, S.; Bonifazi, D.; Bianco, A.; Prato, M. Organic functionalisation and characterization of single-walled carbon nanotubes, *Chem. Rev. Soc.* **2009**, *38*, 2214-2230
- (62) Hirsch, A. Functionalization of single-walled carbon nanotubes, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1853-1859
- (63) Shin, J.Y.; Premkumar, T.; Geckeler, K.E. Dispersion of single-walled carbon nanotubes by using surfactants: are the type and concentration important? *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6044-6048
- (64) Moore, V.C.; Strano, M.S.; Haroz, E.H.; Hauge, R.H.; Smalley, R.E.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Individually suspended single-walled carbon nanotubes in various surfactants, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1379-1382
- (65) Mackiewicz, N.; Surendran, G.; Remita, H.; Keita, B.; Zhang, G.; Nadjo, L.; Hagège, A.; Doris, E.; Mioskowski, C. Supramolecular self-assembly of amphiphiles on carbon nanotubes: A versatile strategy for the construction of CNT/Metal nanohybrids, application to electrocatalysis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8118-8111

- (66) Islam, M.F.; Rojas, E.; Bergey, D.M. ; Johnson, A.T. ; Yodh, A.G. High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 269-273
- (67) Assali, M.; Pernia Leal, M.; Fernandez, I. ; Batti, R. ; Mioskowski, C. Khiar, N. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with glycolipids: glyconanomaterials with specific lectin-affinity, *Soft Matter* **2009**, *5*, 948-950
- (68) 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
- (69) Nish, A.; Hwang, J.Y.; Doig, J.; Nicholas, R.J. Highly selective dispersion of single-walled carbon nanotubes using aromatic polymers, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 640-646
- (70) Garg, A.; Sinnott, S.B. Effect of chemical functionalization on the mechanical properties of carbon nanotubes, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *295*, 273-278
- (71) Etika, K.C.; Cox, M.A.; Grunlan, J.C. Tailored dispersion of carbon nanotubes in water with pH-responsive polymers, *Polymer* **2010**, *51*, 1761-1770
- (72) Ikeda, A.; Totsuka, Y.; Nobusawa, K.; Kikuchi, J.I. Reversible solubilisation and precipitation of carbon nanotubes by temperature and pH control in water, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5785-5789
- (73) Thauvin, C.; Rickling, S.; Schultz, P.; Celia, H.; Meunier, S.; Mioskowski, C. Carbon nanotubes as templates for polymerized lipid assemblies, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 743-748
- (74) Shi, Y.; Kim, S.; Huff, T.B.; Borgens, R.B.; Park, K.; Shi, R.; Cheng, J.X. Effective repair of traumatically injured spinal cord by nanoscale block copolymer micelles, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 80-87
- (75) Sawant, R.R.; Sawant, R.M.; Kale, A.A.; Torchilin, V.P. The architecture of ligand attachment to nanocarriers controls their specific interaction with target cells, *J. Drug. Target* **2008**, *16*, 596-600
- (76) Wu, D.Q.; Lu, B.; Chang, C. ; Chen, C.S. ; Wang, T. ; Zhang, Y.Y.; Cheng, S.X.; Jiang, X.J.; Zhang, X.Z.; Zhuo, R.X. Galactosylated fluorescent labeled micelles as a liver targeting drug carrier, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1363-1371
- (77) Hori, K.; Nishihara, M.; Yokoyama, M. Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels : macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *99*, 549-562
- (78) Li, Y.Y.; Zhang, X.Z.; Cheng, H.; Zhu, J.L. ; Li, U.N. ; Cheng, S.X. ; Zhuo, R.X. Fluorescent thermo-responsive biotin-P(NIPAAm-co-NDAMP)-b-PCL micelles for cell-tracking and drug delivery, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 505101-505109
- (79) Hermanson, G.T. Bioconjugated techniques, Second Edition
- (80) Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allémann, E. Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods, *Int. J. Pharm.* **2003**, *250*, 327-337
- (81) O'Reilly, R.K.; Joralemon, M.J.; Wooley, K.L. ; Hawker, C.J. Functionalization of micelles and shell cross-linked nanoparticles using click chemistry, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5976-5988
- (82) Tamaki, Y. Novel drug delivery system for age-related macular degeneration using nanotechnology, *Nanobiotechnology* **2007**, *3*, 107-115

- (83) Wu, W.C.; Chen, C.Y.; Tian, Y.; Jang, S.H.; Hong, Y.; Liu, Y.; Hu, R.; Tang, B.Z.; Lee, Y.T.; Chen, C.T.; Chen, W.C.; Jen, A.K.Y. Enhancement of aggregation-induced emission in dye-encapsulating polymeric micelles for bioimaging, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1413-1423
- (84) Sun, G.; Berezin, M.Y.; Fan, J.; Lee, H.; Ma, J.; Zhang, K.; Wooley, K.L.; Achilefu, S. Bright fluorescent nanoparticles for developing potential optical imaging contrast agents, *Nanoscale*, **2010**, *2*, 548-558
- (85) Papagiannaros, A.; Kale, A.; Mongayt, D.; Hartner, W.C.; Torchilin, V.P. Near infrared planar tumor imaging and quantification using nanosized Alexa 750-labeled phospholipid micelles, *Int. J. Med.* **2009**, *4*, 123-131
- (86) Sanji, T.; Nakatsuka, Y.; Ohnishi, S.; Sakurai, H. Preparation of nanometer-sized hollow particles by photochemical degradation of polysilane shell cross-linked micelles and reversible encapsulation of guest molecules, *Macromolecules* **2000**, *33*, 8524-8526
- (87) Min, K.H.; Kim, J.H.; Bae, S.M.; Shin, H.; Kim, M.S.; Park, S.; Lee, H.; Park, R.W.; Kim, I.S.; Kim, K.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y.; Lee, D.S. Tumoral acid pH-responsive MPEG-poly( $\beta$ -amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy, *J. Controlled Rel.* **2010**, *144*, 259-266
- (88) Giacomelli, C.; Le Men, L.; Borsali, R. ; Lai-Kee-Him, J. ; Brisson, A. ; Armes, S.P. ; Lewis, A.L. Phosphorylcholine-based pH-responsive diblock copolymer micelles as drug delivery vehicles : light scattering, electron microscopy, and fluorescence experiments, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 817-828
- (89) Arimura, H.; Ohya, Y.; Ouchi, T. Formation of core-shell type biodegradable polymeric micelles from amphiphilic poly(aspartic acid)-block-poly lactide diblock copolymer, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 720-725
- (90) Hwang, S.J.; Kim, M.S.; Han, J.K.; Lee, D.S.; Kim, J.S.; Choi, E.K.; Park, H.J.; Kim, A.S. pH-sensitivity control of PEG-poly(beta-amino ester) block copolymer micelle, *Macromol. Res.* **2007**, *15*, 437-442

## **CHAPITRE 2**

### **Préparation de micelles sphériques par photopolymérisation d'amphiphiles diacétyléniques à tête polaire NTA**





# **Chapitre 2**

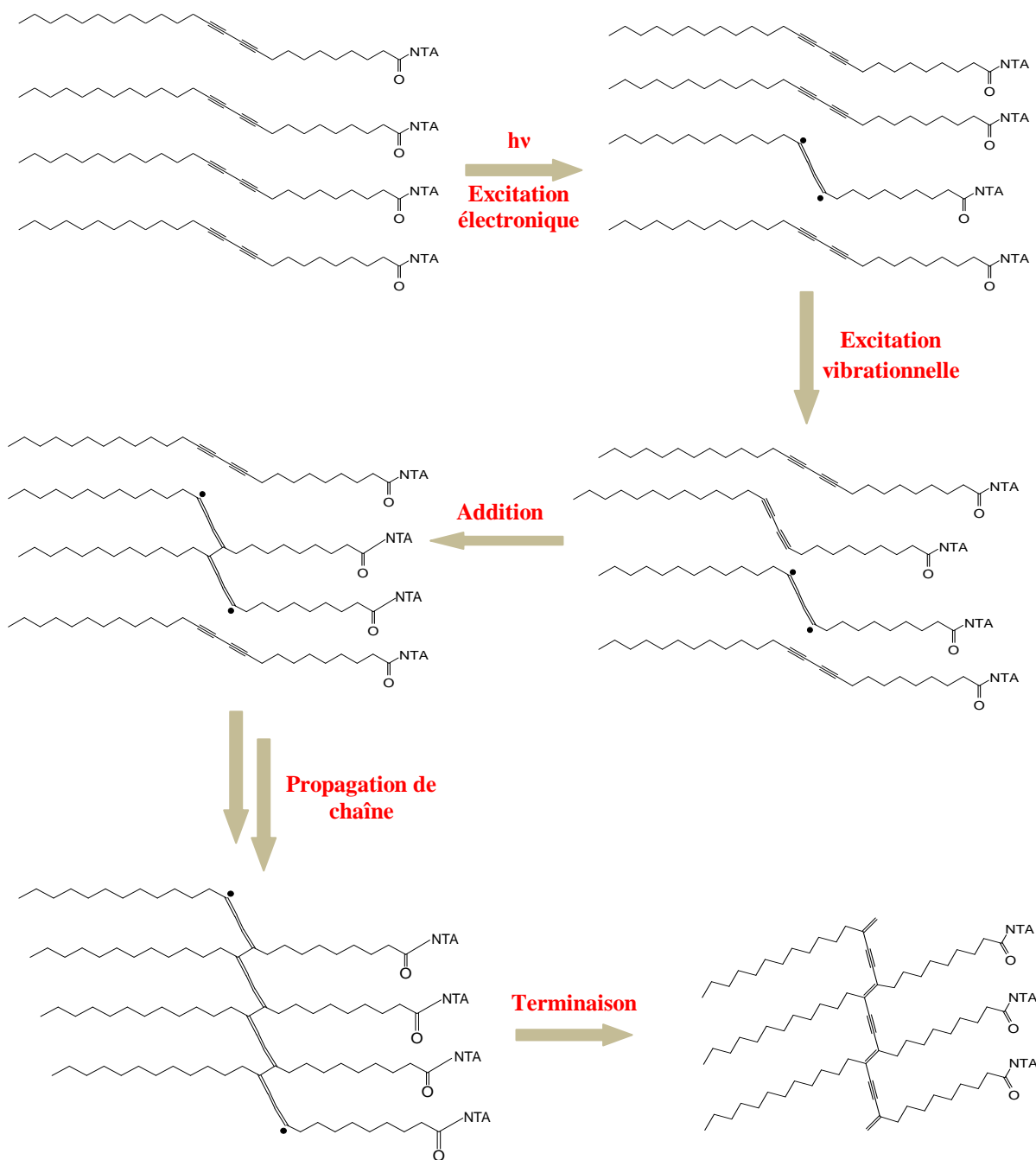
## **Préparation de micelles sphériques par photopolymérisation d'amphiphiles diacétyléniques à tête polaire NTA**

---

Les lipides amphiphiles étudiés au laboratoire contiennent des groupes diacétylènes pouvant polymériser sous forme d'enchaînements alcène-alcyne, appelés ene-yne, sous irradiation UV ou  $\gamma$ . La polymérisation est ainsi initiée par de l'énergie lumineuse ce qui est un mode de polymérisation « propre », car ne nécessitant pas l'apport de composés chimiques externes. Afin d'aboutir à la formation de conjugués ene-yne, deux conditions principales doivent être réunies : les chaînes grasses doivent être orientées avec un angle de  $45^\circ$  les unes par rapport aux autres et les distances entre elles doivent être constantes et de moins de  $0,5\text{Å}$ .<sup>1</sup>

### **I. Mécanisme de polymérisation des polydiacétylènes**

L'étape clé la polymérisation des polydiacétylènes (PDA) est l'addition 1,4, c'est-à-dire entre le premier carbone du diacétylène de la chaîne I et le quatrième carbone de la chaîne II, d'un diradical formé par irradiation lumineuse. Le mécanisme radicalaire impliqué se déroule en quatre étapes : formation d'une espèce diradical par excitation des électrons sous l'effet d'une irradiation UV ou  $\gamma$ , excitation vibrationnelle des motifs diacétyléniques, addition d'un diacétylène voisin pour former un diradical dimère puis propagation de la réaction entre les chaînes.<sup>2,3</sup> (Figure 1.2)



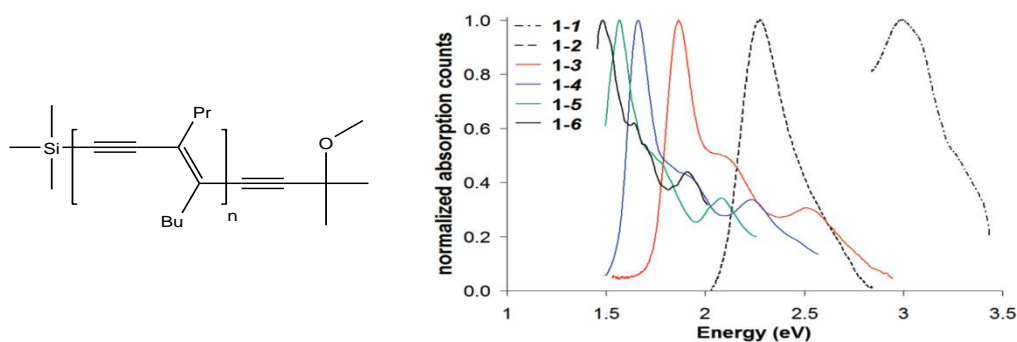
**Figure 1.2.** Mécanisme de polymérisation des PDA par un intermédiaire diradicalaire<sup>1</sup>

Les systèmes eny-yne résultant de la polymérisation sont fortement conjugués et ont des caractéristiques spectrales particulières qui dépendent de la délocalisation des électrons  $\pi$ .<sup>4</sup>

Les deux orbitales frontières, l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HOMO) et la plus basse vacante (LUMO), possèdent des niveaux d'énergie d'autant plus proches que la

conjugaison dans le polymère est forte. Ainsi, plus un polymère sera conjugué, moins un électron aura besoin d'énergie pour être excité et passer de la HOMO à la LUMO. Or, la relation de Planck définit l'énergie  $E$  associée à une transition :  $E = h / \lambda$ , où  $h$  la constante de Planck et  $\lambda$ , la longueur d'onde de cette transition. Ainsi, plus une énergie de transition sera faible, plus la longueur d'onde associée à cette transition sera élevée. L'augmentation de la délocalisation des électrons  $\pi$  est ainsi associée à une augmentation de la longueur d'onde d'absorption par les électrons : c'est l'effet bathochrome.

Par exemple, les propriétés optoélectroniques d'oligodiacétylènes (ODA) se sont révélées différentes en fonction de la longueur de conjugaison.<sup>5,6</sup> (Figure 2.2)



**Figure 2.2.** Structure de l'oligodiacétylène  $1 < n < 6$  et spectres d'absorption des radicaux ODA<sup>•+</sup> en fonction de la longueur de chaîne

Pour cette étude, des oligodiacétylènes contenant des longueurs de chaînes entre 1 et 8 unités ont été synthétisés, afin de produire les radicaux issus de ces oligodiacétylènes (ODA<sup>•+</sup>). Les mesures des énergies de transition de ces différentes espèces ont montré une évolution importante en fonction des longueurs de chaîne. La figure 2.2 montre que quand les longueurs de chaîne augmentent, l'énergie mesurée diminue et par conséquent, la longueur d'onde d'absorption augmente. Les longueurs d'ondes d'absorption associées sont les suivantes :

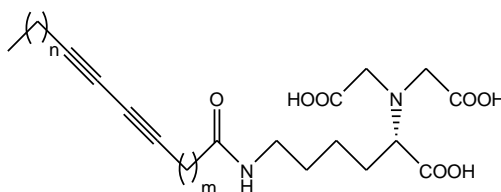
$$n = 1 \rightarrow \lambda_{\max} = 413 \text{ nm} < n = 3 \rightarrow \lambda_{\max} = 666 \text{ nm} < n = 6 \rightarrow \lambda_{\max} = 840 \text{ nm}$$

Une augmentation de la longueur de chaîne de 1 à 6 maillons permet d'augmenter de façon importante la longueur d'onde d'absorption et confirme que la longueur de la délocalisation

électronique peut être évaluée par spectrométrie UV-visible. Ainsi, les PDA fortement conjugués ont des longueurs d'onde d'absorption situées dans le rouge, c'est à dire entre 600 et 700 nm, et seront vus avec une couleur bleue : on dira alors qu'ils sont dans la forme « bleue ». A l'inverse, des PDA faiblement conjugués absorberont dans le bleu, c'est-à-dire entre 400 et 500 nm, ils auront donc une couleur rouge, et on dira qu'ils sont dans la forme « rouge ».

## II. Etude de la photopolymérisation de l'amphiphile diacétylénique à tête polaire NTA dans les micelles sphériques

Lorsque l'amphiphile diacétylénique possédant une tête polaire acide nitrilotriacétique, (Figure 3.2) est dissous dans de l'eau à pH basique ( $\text{pH} > 8$ ) à une concentration de 5 mg/mL, il forme des micelles sphériques.



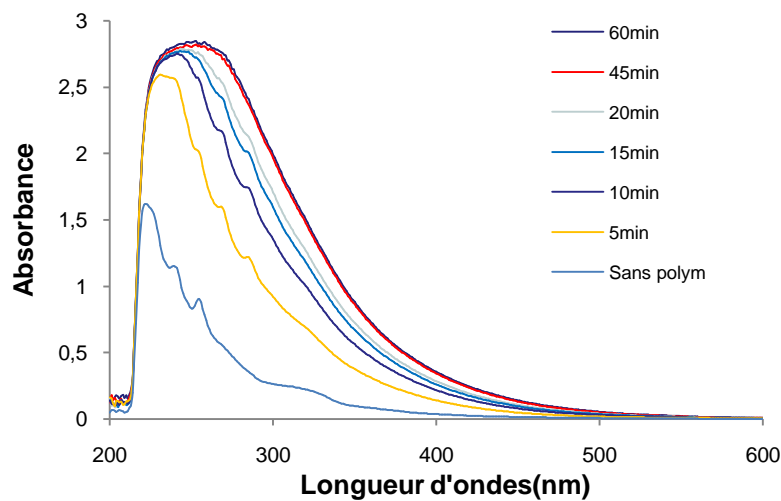
**Figure 3.2.** Structure de l'amphiphile diacétylénique possédant une tête polaire NTA

Cet amphiphile, comme tous ceux que nous verrons dans la suite du manuscrit, est un lipide diacétylénique et peut donc polymériser sous l'effet d'une irradiation UV ou  $\gamma$ . Le but de cette étude est d'évaluer les effets de la polymérisation sous irradiation UV, notamment les changements structuraux qu'elle peut induire dans les micelles et la stabilisation qu'elle peut apporter.

Dans la suite du manuscrit, nous noterons les micelles formées de l'amphiphile diacétylénique à tête polaire NTA non polymérisées :  $\text{MNP}_{\text{NTA}}$ , et les micelles formées de l'amphiphile diacétylénique à tête polaire NTA polymérisées :  $\text{MP}_{\text{NTA}}$ .

## II.1. Préparation des micelles

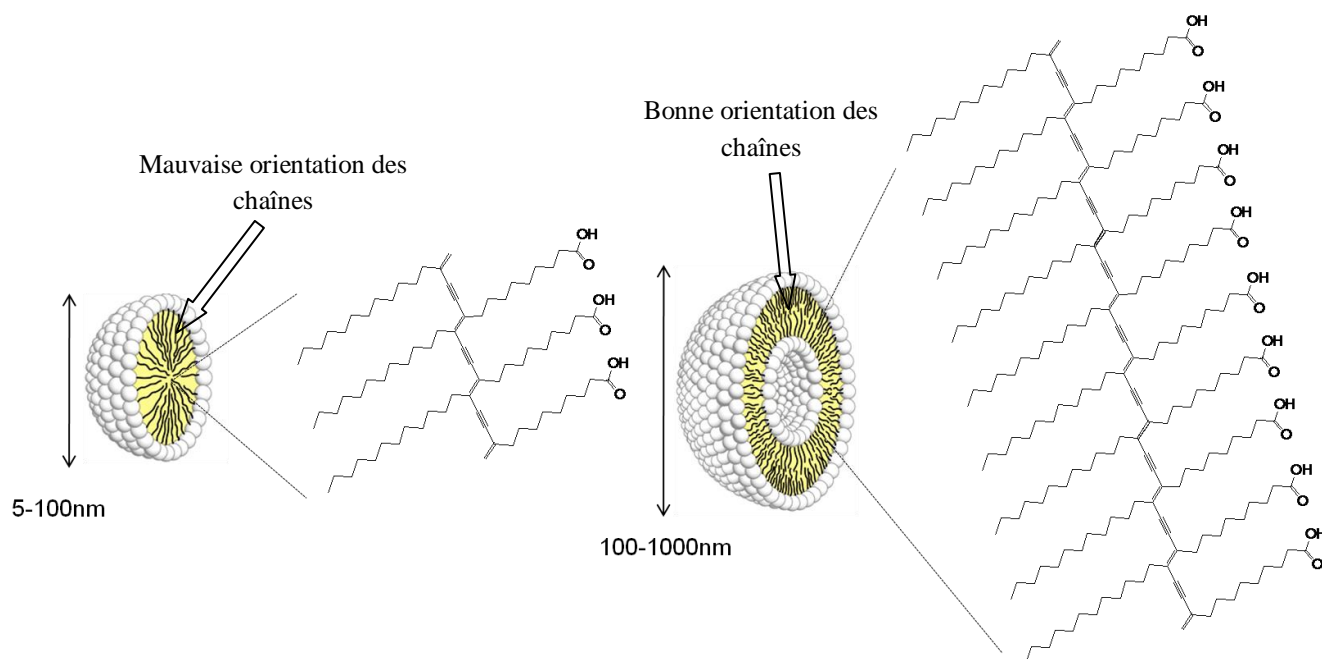
L'amphiphile diacétylénique à tête polaire NTA est dissous à une concentration de 5 mg/mL dans une solution de tampon Tris pH 10 (0,1M) par sonication dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. Les micelles sont ensuite photopolymérisées par irradiation sous une lampe UV fournissant une puissance de 1000 Watt à 254 nm. Des études précédemment menées au sein du laboratoire ont montré que 45 minutes d'irradiation sous 1000 W étaient nécessaires pour atteindre le maximum d'absorption. (Figure 4.2)



**Figure 4.2.** Spectres d'absorbance des micelles NTA à 1mg/mL entre 0 minutes et 60 minutes de polymérisation sous 1000W à 254 nm

Avant photopolymérisation, les groupes diacétylènes présents dans les lipides absorbent entre 200 et 350 nm. (Figure 4.2. courbe bleue, sans polym) Mais après polymérisation, l'absorbance des micelles augmente pour s'étendre jusqu'à 470 nm et la couleur de la solution est jaune. Cette augmentation de l'absorbance indique que l'on obtient des systèmes conjugués, d'après les observations faites dans le paragraphe précédent. D'autre part, nous n'observons pas des absorbances élevées contrairement à la polymérisation dans des liposomes polydiacétyléniques, pour lesquelles les absorbances atteignent 630 nm.<sup>7-8</sup> Cette différence peut être expliquée par les plus grandes contraintes géométriques présentes dans les MNP<sub>NTA</sub>. Nous supposons que les conditions nécessaires pour la formation de liaisons

ene-yne, c'est-à-dire un angle de  $45^\circ$  et une distance constante entre les chaînes, sont totalement réunies dans le cas des liposomes grâce à leur plus faible rayon de courbure. A l'inverse, les  $MNP_{NTA}$ , de tailles plus petites, ont un plus grand rayon de courbure ce qui induit une mauvaise orientation des chaînes durant la polymérisation. Ainsi, la polymérisation ne pourra avoir lieu qu'entre un petit nombre de chaînes. (Figure 5.2)



**Figure 5.2.** Comparaison de la longueur de conjugaison après photo-polymérisation dans des micelles et dans les liposomes<sup>9</sup>

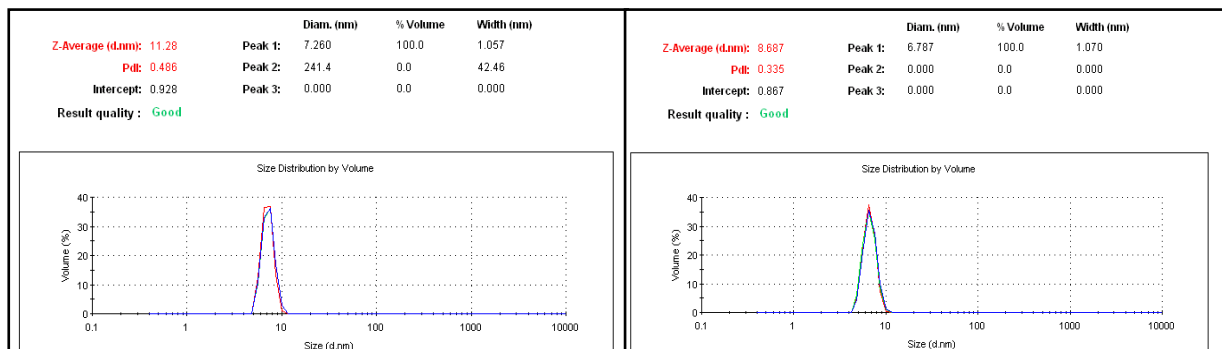
La figure 5.2 montre que par les contraintes imposées pour la polymérisation, les électrons ne peuvent se délocaliser que sur une courte distance dans les  $MP_{NTA}$ , contrairement aux liposomes, et que les longueurs d'ondes d'absorption associées sont plus faibles.

Nous verrons dans le chapitre 5 un exemple de polymérisation de nanotubules dans lesquelles l'orientation des chaînes est favorable, ce qui permet l'obtention de solutions de couleur violette après irradiation.

## II.2. Etude comparative de la structure des micelles avant et après photopolymérisation

### II.2.1. Analyse par diffusion dynamique de la lumière et microscopie électronique à transmission

Des analyses de diffusion dynamique de la lumière ou dynamic light scattering (DLS) et de microscopie électronique à transmission (MET) ont permis de déterminer le diamètre hydrodynamique des micelles et leur forme. Ces deux analyses n'ont pas révélé de différences majeures avant et après polymérisation. En effet, la taille obtenue par DLS pour les micelles non polymérisées est de  $7,2 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$  tandis que celle des micelles polymérisées est de  $6,7 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ . Les mesures sont reproduites trois fois et les incertitudes sont calculées comme étant la moitié de la largeur à mi-hauteur du pic. (Figure 6.2)

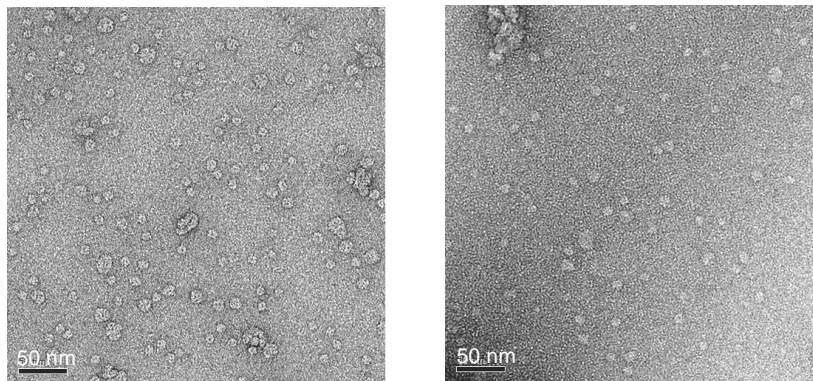


**Figure 6.2.** Distribution en volume de la taille des  $\text{MNP}_{\text{NTA}}$  (à gauche) et  $\text{MP}_{\text{NTA}}$  (à droite).  
Concentration : 5 mg/mL dans le Tris pH10 (0,1M)

Il faut noter que l'analyse réalisée en intensité révèle la présence d'agrégats d'une taille de 100 nm qui sont toujours présents lors de la formation des micelles avant et après polymérisation ; ils représentent cependant une faible quantité de particules car ils ne sont pas détectés par l'analyse en volume. Des filtrations sur filtre MilliPore  $0,45\mu\text{m}$  ont été réalisées afin d'éliminer d'autres poussières, mais aucune différence n'a été observée.

Des images en microscopie (MET) ont été réalisées à une concentration de 0,1 mg/mL sur des grilles de carbone après coloration à l'acétate d'uranyle. Cette concentration a été choisie car

pour des concentrations plus élevées, un tapis de micelles était présent sur la grille. Pour les  $MNP_{NTA}$  et les  $MP_{NTA}$ , des structures sphériques possédant un diamètre d'environ 10 nm ont été observées. (Figure 7.2)



**Figure 7.2.** Images MET des  $MNP_{NTA}$  (à gauche) et des  $MP_{NTA}$  (à droite). Barre d'échelle : 50 nm.  
Concentration : 0,1 mg/mL dans le Tris pH10 (0,1M)

Ces observations concordent avec celles réalisées sur les micelles de copolymère introduites dans le chapitre 1, où peu ou pas de différences avaient été observées avant et après réticulation par analyse de DLS et de MET. On peut toutefois noter que les micelles que nous obtenons ont des diamètres plus petits que des micelles de copolymère. A titre d'exemple, les micelles de copolymère PEG-*b*-P(LA-co-MAC) décrites dans le paragraphe II.3.1 du chapitre 1, possédaient un diamètre de 70 nm avant réticulation et de 62 nm après réticulation.

### II.2.2. Analyse par diffusion des neutrons aux petits angles

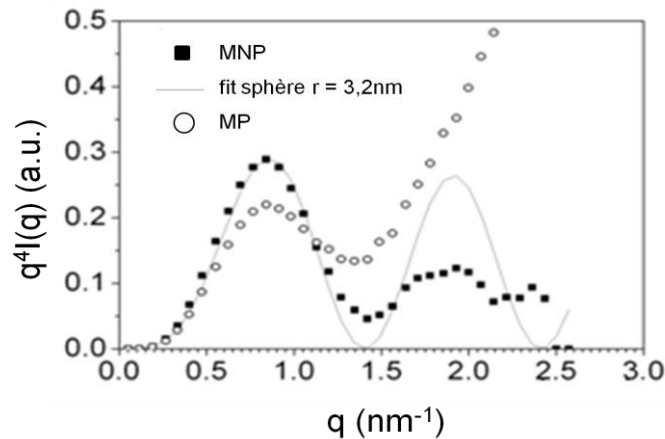
Afin de déterminer la structure interne des micelles, des expériences de diffusion des neutrons aux petits angles (Small-Angle Neutron Scattering ou SANS) ont été réalisées par Jean-Michel Guenet, du laboratoire des systèmes complexes moléculaires et macromoléculaires organisés, situé à l'Institut Charles Sadron. Ainsi, des solutions de  $MNP_{NTA}$  et  $MP_{NTA}$  dans de l'eau deutérée basique ont été réalisées afin d'être analysées par SANS. Les courbes obtenues par utilisation de la représentation de Kratky ( $q^2 I(q)$  vs  $q$ ) sont



exposées dans la figure 8.2. En ce qui concerne les MNP, on peut superposer la courbe obtenue avec le facteur de forme  $P(q)$  d'une sphère solide:

$$P(q) = \left[ 3 \frac{\sin(qr) - qr \cos(qr)}{q^2 r^2} \right]^2$$

où  $r$  est le rayon de la sphère.



**Figure 8.2.** Représentation de Kratky des  $\text{MNP}_{\text{NTA}}$  (ronds noirs) et des  $\text{MP}_{\text{NTA}}$  (ronds blancs)

Pour les  $\text{MNP}_{\text{NTA}}$ , une très bonne corrélation est obtenue pour des valeurs de  $q$  faibles avec un rayon  $r = 3,2$  nm. Pour des  $q$  élevés, la courbe est plus éloignée du tracé théorique car le rapport signal/bruit est plus fort, donc la qualité du signal moins bonne. Cependant, le fait important est que le maximum de la courbe théorique correspond à celui de la courbe expérimentale. Cette bonne corrélation indique aussi que les  $\text{MNP}_{\text{NTA}}$  sont fortement monodisperses en taille car dans le cas contraire, les oscillations seraient rapidement atténuées. De plus, la valeur d'un rayon de 3,2 nm est en accord avec la valeur trouvée par DLS, qui était de 3,6 nm.

En ce qui concerne les  $\text{MP}_{\text{NTA}}$ , la corrélation avec la courbe théorique d'une sphère dure n'est satisfaisante que pour les faibles valeurs de  $q$ . La forte augmentation de l'intensité pour les grandes valeurs de  $q$  peut indiquer que du matériel s'est détaché des micelles et possède une structure plus étendue.

### II.2.3. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.3.4 du chapitre 1, la chromatographie d'exclusion stérique, ou Size Exclusion Chromatography (SEC), est une méthode de chromatographie en phase liquide, qui permet de séparer des composés en fonction de leur volume hydrodynamique. Les analyses de SEC présentées dans ce paragraphe ont été réalisées par Alain Rameau, du laboratoire caractérisation de l'Institut Charles Sadron.

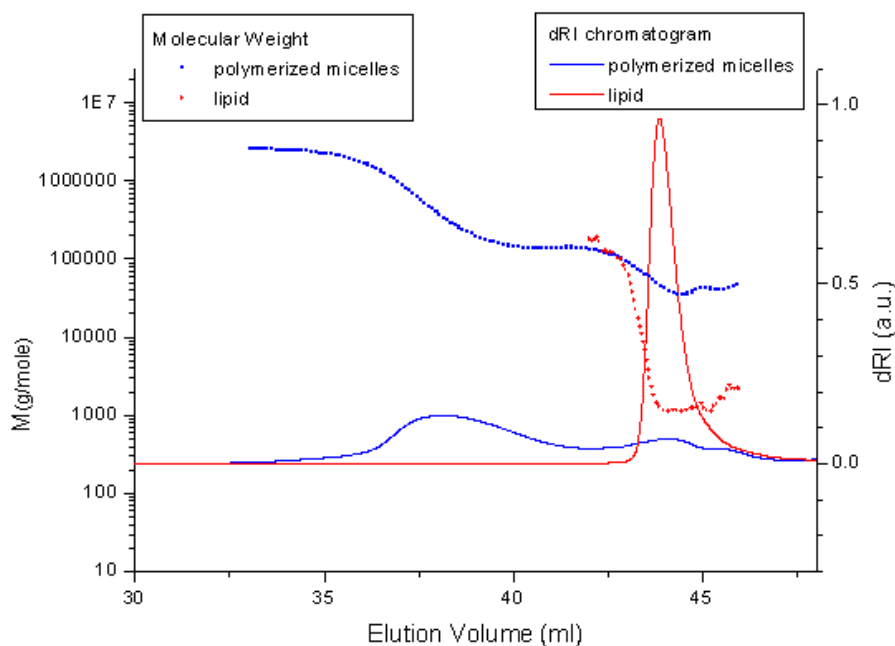
Cette analyse est souvent utilisée pour déterminer le degré de polymérisation d'un polymère.<sup>10</sup>

Le choix de l'éluant est important car il doit permettre d'optimiser la solubilité du polymère afin d'obtenir la meilleure dissociation des différents composés et ainsi la meilleure élution possible. La plupart du temps, la SEC est réalisée dans un solvant organique, comme le tétrahydrofurane (THF). C'est le solvant que nous avons choisi pour nos analyses car nous avons observé qu'il a permis une bonne solubilisation des micelles, notamment pour réduire le nombre d'agrégats en solution. Avant de réaliser les mesures, les micelles polymérisées ont dû être séchées pour être redispersées dans le THF. Pour cela, la solution de micelles dans la solution de Tris a été acidifiée avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et les micelles ont été extraites avec un mélange chloroforme/THF. La protonation des acides carboxyliques a ainsi permis de transférer les micelles de la phase aqueuse à la phase organique, qui est ensuite séchée pour récupérer le produit sec.

Les analyses de SEC ont été réalisées par deux modes de détections : une détection réfractométrique et une détection par diffusion de lumière. La détection réfractométrique donne une réponse proportionnelle à la concentration du polymère en solution par rapport à la courbe de calibration du polystyrène. Cette méthode est basée sur le fait que les comportements en solution du polystyrène et du polymère sont identiques. On peut ainsi déterminer une masse molaire apparente du polymère. La deuxième méthode combine un réfractomètre et une détection par diffusion de lumière grâce à laquelle la masse molaire

absolue du polymère peut être déterminée. En effet, le signal détecté est proportionnel à une valeur expérimentale  $dn/dc$ , correspondant la variation de  $n$ , l'indice de réfraction du polymère, en fonction de sa concentration  $c$ . La valeur de  $dn/dc$  est déterminée grâce à un réfractomètre. Lors d'une analyse de SEC, les pics détectés sont associés à une courbe  $\log(M_w) = f(V_e)$ .  $M_w$  représente la masse molaire absolue du polymère dont les variations sont tracées en fonction du volume d'élution  $V_e$ . L'interprétation de cette courbe permet alors de déterminer la masse molaire absolue du polymère. Les deux méthodes réfractométrique et par diffusion de lumière ont été appliquées pour l'analyse des  $MNP_{NTA}$  et des  $MP_{NTA}$ , qui ont été filtrées avec un filtre  $0,45 \mu m$  avant l'injection.

En ce qui concerne les micelles non polymérisées  $MNP_{NTA}$ , l'analyse réfractométrique ne révèle qu'un seul pic, d'une masse molaire apparente de  $620 \text{ g/mole}$ . (Figure 9.2, courbe rouge trait plein) Cette valeur est proche de la valeur théorique ( $618 \text{ g/mole}$ ). Le calcul de la masse molaire absolue, par diffusion de lumière, donne quant à elle une valeur de  $2400 \text{ g/mole}$ . Cette valeur est plus grande que la première à cause de la présence de quelques gros agrégats qui perturbent l'analyse, mais dont la quantité est si faible, de l'ordre de 1 à 2%, qu'ils n'étaient pas détectés par le réfractomètre. En effet, leur présence est repérable par la courbe  $\log(M_w) = f(C)$  qui est décalée vers les volumes d'élution plus faibles, donc vers les masses plus grandes. (Figure 9.2, courbe rouge en pointillés)



**Figure 9.2.** Analyses SEC/MALS des  $MNP_{NTA}$  (en rouge) et des  $MP_{NTA}$  (en bleu)

Les analyses des micelles polymérisées  $MP_{NTA}$  montrent la disparition quasi-totale du pic de l'amphiphile de départ et l'apparition d'un large pic entre les volumes d'élution 33 et 43 mL. (Figure 9.2, courbe bleue trait plein) La présence de ce nouveau pic à des volumes d'élution plus faibles montre que les  $MP_{NTA}$  sont constituées de polymères de plus grandes masses molaires que l'amphiphile de départ.

Par analyse de diffusion de lumière, les masses molaires calculées sont comprises entre 150 000 g/mole et 2 000 000 g/mole. (Figure 9.2, courbe bleue en pointillés) Par analogie avec la valeur trouvée pour les  $MNP_{NTA}$ , ces deux masses molaires correspondent à des chaînes de polymères constituées de 62 à 830 amphiphiles de départ. Nous pouvons supposer que les petites valeurs (entre 62 et 150 amphiphiles) constituent les chaînes polymérisées dans les micelles et que les grandes valeurs sont des agrégats que nous n'avons pas réussi à dissocier. Ces agrégats sont attribués à une dissolution partielle des  $MP_{NTA}$  en solution. En effet, lors de l'optimisation des conditions d'analyse, le nombre de ces gros agrégats s'est vu diminuer lorsque les conditions de dissolution étaient plus dures, c'est-à-dire par chauffage et sonication. Cependant, un long chauffage (3 heures) et une sonication intense (45 minutes), ne

nous ont pas permis d'éliminer complètement ces agrégats. L'analyse ainsi obtenue nous a paru satisfaisante pour vérifier qu'après photopolymérisation, la disparition quasi-totale du produit de départ est effective et que la formation de chaînes de polymère a bien lieu.

#### II.2.4. Détermination des concentrations micellaires critiques

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale (II.3.3), la détermination de la concentration micellaire critique (CMC) de micelles avant ou après polymérisation est souvent utilisée pour évaluer la stabilisation apportée par la polymérisation. Plusieurs techniques existent pour calculer les CMC, et dans notre étude, nous avons choisi la méthode d'encapsulation du pyrène.<sup>11</sup> Des solutions de concentrations croissantes en micelles dans le Tris pH10 (0,1M) ont été préparées : de  $0,5 \cdot 10^{-3}$  mg/mL à 0,6 mg/mL. Ces solutions de micelles (1 mL) ont ensuite été mélangées à 1 $\mu$ L d'une solution de pyrène (1 mM dans le DMSO). Les spectres d'émission de fluorescence du pyrène ont été utilisés pour calculer les CMC des MNP<sub>NTA</sub> et des MP<sub>NTA</sub>. Les spectres d'émission réalisés pour les MNP<sub>NTA</sub> sont présentés figure 10.2 pour une longueur d'onde d'excitation à 339 nm.

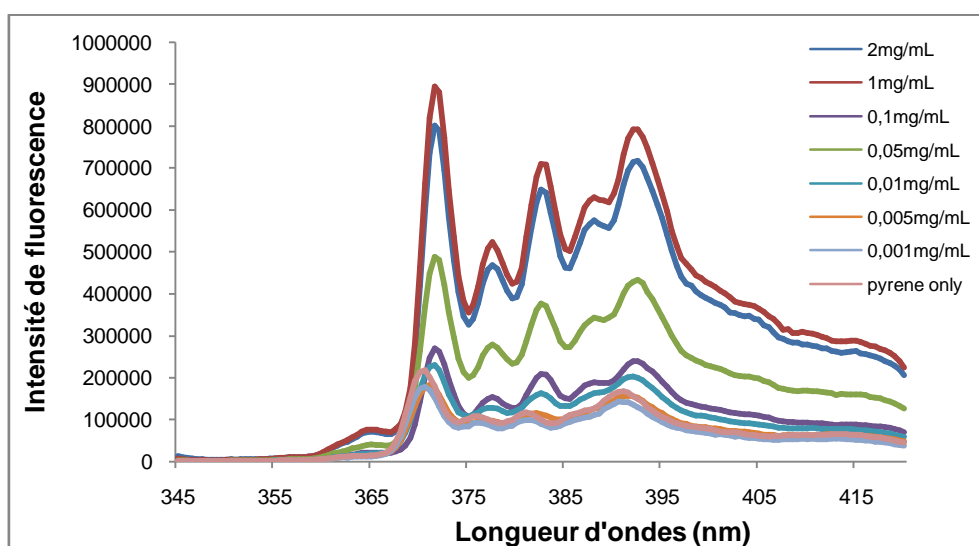


Figure 10.2. Spectres d'émission du pyrène dans des solutions de concentrations différentes de MNP<sub>NTA</sub>

Afin d'exploiter ces courbes, il faut tracer le ratio des intensités à 373 nm ( $I_{373}$ ) et à 383 nm ( $I_{383}$ ) en fonction de la concentration en micelles, en mg/mL. La courbe  $I_{373}/I_{383} = f(C)$  est représentée sur la figure 11.2.

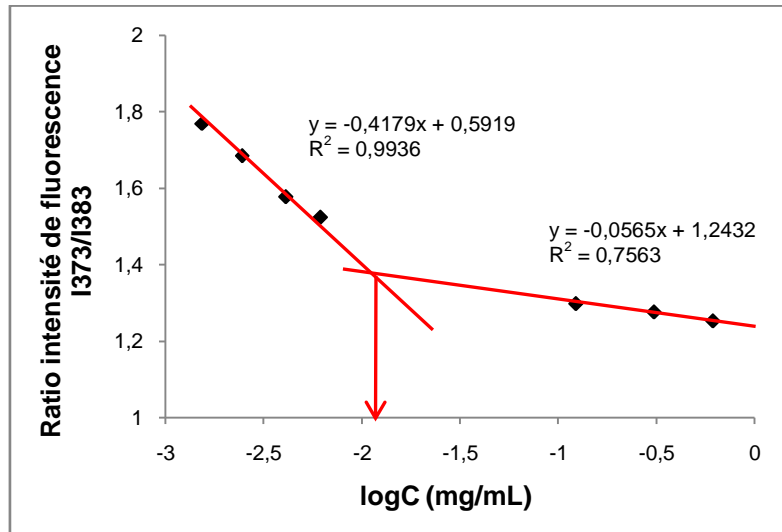


Figure 11.2. Courbes  $I_{373}/I_{383} = f(C)$  pour les  $MNP_{NTA}$

L'intersection entre les droites donne la valeur de la CMC : 15 mg/L. Les mêmes mesures ont été réalisées pour les  $MP_{NTA}$ . Les spectres d'émission du pyrène à différentes concentrations de micelles ont permis de tracer la courbe  $I_{373}/I_{383} = f(C)$  correspondante présentée sur la figure 12.2.

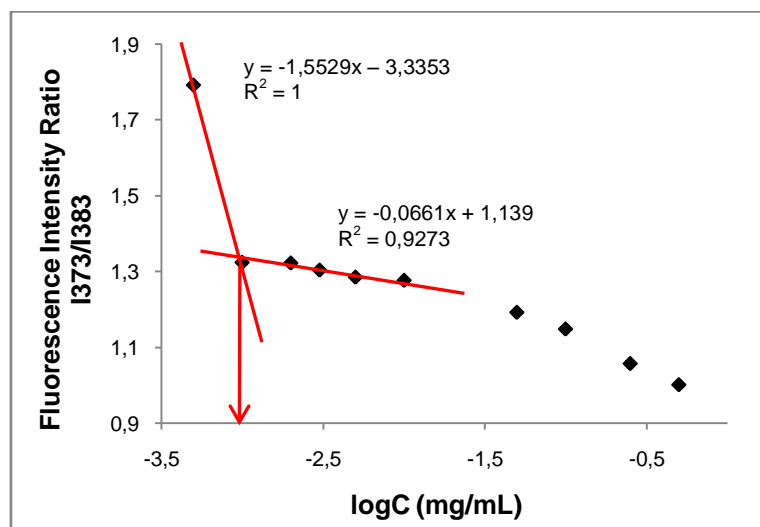


Figure 12.2. Courbe  $I_{373}/I_{383} = f(C)$  pour les  $MP_{NTA}$

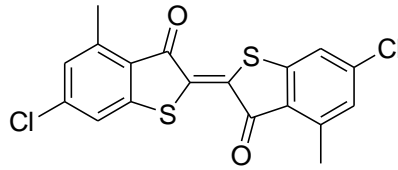
La zone dans laquelle se trouve la CMC des  $MP_{NTA}$  correspond à de très faibles concentrations, à la limite de précision de la méthode, mais on peut estimer que sa valeur est inférieure à 1 mg/L. Cependant, la mesure des tensions de surface ou des conductivités sont des méthodes permettant quant à elles de déterminer des CMC pour de plus faibles concentrations, que nous pourrions mettre en place pour obtenir une valeur exacte.

La forte différence de CMC entre les  $MNP_{NTA}$  et les  $MP_{NTA}$  montre que la dissociation des molécules dans les micelles polymérisées a lieu à une concentration bien plus faible (moins de 1 mg/L) que pour les micelles non polymérisées (15 mg/L) et que la photopolymérisation a induit une stabilisation des micelles.

Il faut noter que les valeurs obtenues sont comparables avec les CMC de micelles de copolymère PEG-*b*-P(LA-*co*-MAC), présentées dans le chapitre 1. En effet, avant réticulation du cœur, la CMC était de 14,8 mg/L et a été diminuée de moitié après réticulation.<sup>12</sup> Dans ce cas précis, la valeur des  $MNP_{NTA}$  est similaire mais la stabilisation obtenue après polymérisation est plus grande, qu'après réticulation du cœur. Or, les  $MNP_{NTA}$  ont été polymérisées pour fournir des polymères linéaires non réticulés. Nous envisagerons donc, à la fin de ce chapitre, de synthétiser des micelles polymérisables et réticulables, afin d'apporter une stabilisation encore plus grande.

### II.2.5. Etude de l'encapsulation d'une molécule hydrophobe

Afin de calculer le taux d'encapsulation dans les micelles avant et après polymérisation, la molécule hydrophobe Red30 a été utilisée. (Figure 13.2) Le coefficient d'extinction du Red30 a préalablement été déterminé et une expérience contrôle ne contenant que du Red30 dans une solution de Tris pH10 a montré que celui-ci était complètement insoluble.



**Figure 13.2.** Structure du Red30

La première étape est de dissoudre le Red30 dans du méthanol à la concentration de 15 mg/mL. 1mL de cette solution est ensuite ajouté à 5 mL d'une solution de  $MNP_{NTA}$  dans du Tris pH10 (0,1M) à 1 mg/mL. Le même protocole est appliqué aux  $MP_{NTA}$ . Les solutions sont ensuite soniquées à 70°C puis centrifugées pour éliminer l'excès de Red30. Le chauffage à 70°C permet l'élimination du méthanol et la décantation du Red30. Les micelles contenant le Red30 sont dosées par spectrométrie UV pour calculer la quantité de Red30 présent dans les micelles.

Les taux d'encapsulation massiques ainsi déterminés dans les  $MNP_{NTA}$  sont de  $10.1\% \pm 1.4$  wt/wt et  $7.7\% \pm 1.0$  wt/wt pour les  $MP_{NTA}$ . Le taux d'encapsulation est donc 25% plus important pour les micelles non polymérisées que pour les micelles polymérisées. Comme nous l'avons vu lors du calcul de la CMC, les  $MNP_{NTA}$  et  $MP_{NTA}$  ont des comportements clairement différents en solution. Les  $MNP_{NTA}$  ont un caractère plus dynamique, puisqu'elles sont dissociées plus facilement que les  $MP_{NTA}$ . Ce caractère plus dynamique des  $MNP_{NTA}$  se retrouve ici, car grâce à la plus grande mobilité des amphiphiles les constituant, elles peuvent mieux « emprisonner » le composé hydrophobe. Les  $MP_{NTA}$  possèdent une structure plus rigide et une cohésion plus grande que les  $MNP_{NTA}$ , ce qui ne leur permet pas d'encapsuler autant de molécules que les  $MNP_{NTA}$ . Il faut également noter que les images de MET et les analyses en DLS n'ont pas révélé de changement de forme ou de taille après encapsulation du Red30, ce qui montre que les structures ont été conservées.

Les taux d'encapsulation que nous avons obtenus ont été comparés avec ceux obtenus avec des micelles de copolymère décrits dans la littérature. Les taux d'encapsulation sont en

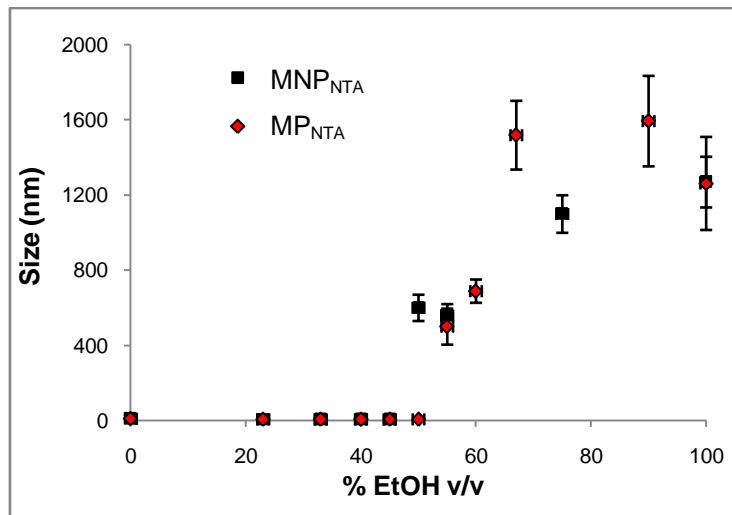


général compris entre 1,5% et 50%.<sup>13</sup> Par exemple, de l'acétate de prednisone a été encapsulé avec un taux de 21.5 wt%<sup>14</sup> et de l'octaéthylporphine avec un taux de 11.9 wt%.<sup>15</sup> Ces valeurs nous indiquent que nos micelles polydiacétyléniques sont des systèmes compétitifs par rapport aux systèmes existants.

## II.2.6. Etude du comportement dans un mélange avec un solvant organique

Lors de l'étude réalisée sur l'encapsulation du Red30, il nous est apparu que les  $MNP_{NTA}$  possédaient une structure plus rigide que les  $MP_{NTA}$ . Il nous semblait alors intéressant d'étudier leur comportement respectif en présence de solvant organique. En effet, l'addition d'un solvant organique va perturber les systèmes à cause des interactions entre ces solvants et les chaînes lipidiques qui peuvent détruire partiellement ou totalement les micelles.<sup>16</sup> Ainsi, si la taille des micelles ne varie pas avec l'ajout d'un solvant organique, cela signifie qu'elle n'a pas été détruite et que sa structure micellaire est intacte.

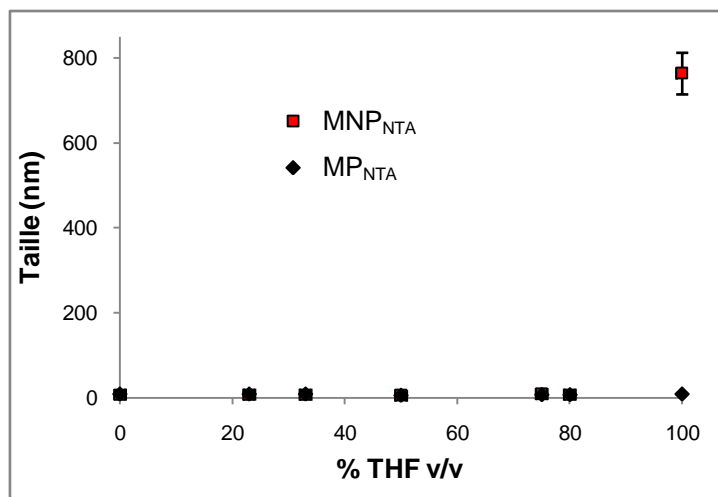
Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'addition d'éthanol sur la structure des  $MNP_{NTA}$  et de  $MP_{NTA}$ . Pour ce faire, un pourcentage croissant d'éthanol a été ajouté dans des solutions de  $MNP_{NTA}$  et de  $MP_{NTA}$  à 5 mg/mL dans le Tris pH10 (0,1 M). L'évolution de la taille des micelles non polymérisées et polymérisées a été suivie par diffusion de lumière, et nous avons calibré l'appareil en tenant compte du pourcentage d'éthanol introduit. Nous avons choisi d'introduire un pourcentage volumique croissant, entre 0 et 100% d'éthanol, afin de détecter le pourcentage pour lequel les  $MNP_{NTA}$  et les  $MP_{NTA}$  n'étaient plus détectables en solution.



**Figure 14.2.** Evolution de la taille des MNP<sub>NTA</sub>(carrés noirs) et MP<sub>NTA</sub>(losanges rouges) en fonction du pourcentage volumique en éthanol

Les courbes obtenues sur la figure 14.2 montrent que les variations de taille entre les deux types de micelles sont sensiblement identiques. Dans les deux cas, au-dessous de 50% d'éthanol, les micelles sont intactes, tandis que pour des pourcentages supérieurs à 50%, les tailles augmentent considérablement. Cela indique une destruction des structures micellaires et la formation d'agrégats probablement non structurés. Les deux types de micelles semblent seulement se distinguer entre 50 % et 55% en éthanol. Ce faible écart nous a paru plutôt décevant car aucune différence majeure entre les MNP<sub>NTA</sub> et de MP<sub>NTA</sub> n'a pu être détectée.

Nous avons alors poursuivi l'étude avec un autre solvant organique, afin de tenter de mettre en évidence une différence de comportement entre les MNP<sub>NTA</sub> et les MP<sub>NTA</sub>. Le tétrahydrofurane a alors été choisi et a été introduit à un pourcentage volumique compris entre 0 et 100% aux solutions de micelles dans le Tris pH 10. Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 15.2.



**Figure 15.2.** Evolution de la taille des MNP<sub>NTA</sub> (rectangle rouges) et MP<sub>NTA</sub> (losanges noirs) en fonction du pourcentage volumique de THF en solution

Cette fois, une différence a été observée pour un pourcentage de 100% en THF, où les micelles non polymérisées n'existent plus en solution, contrairement aux micelles polymérisées qui ont conservé leur taille. Par contre, pour des pourcentages en THF inférieur à 80%, les tailles des MNP<sub>NTA</sub> et des MP<sub>NTA</sub> se sont révélées identiques, c'est-à-dire environ 8 nm. Pour des pourcentages compris entre 80% et 100%, des mesures ont été réalisées mais des valeurs très faibles ont été trouvées (environ 2 nm). Ces valeurs nous ont paru aberrantes et nous en avons déduit que malgré la calibration de l'appareil en tenant compte du THF, celui-ci n'était plus en mesure de fournir une analyse correcte en présence d'une aussi grande quantité de solvant organique.

Cette expérience nous a cependant permis de conclure que la polymérisation a renforcé la structure des micelles puisque les MP<sub>NTA</sub> leur permettent de conserver leurs structures dans le THF pur. Cependant, l'ajout de solvant organique par analyse DLS de la taille des micelles, ne nous a pas conduits au pourcentage de solvant à partir duquel les micelles sont dissociées en solution.

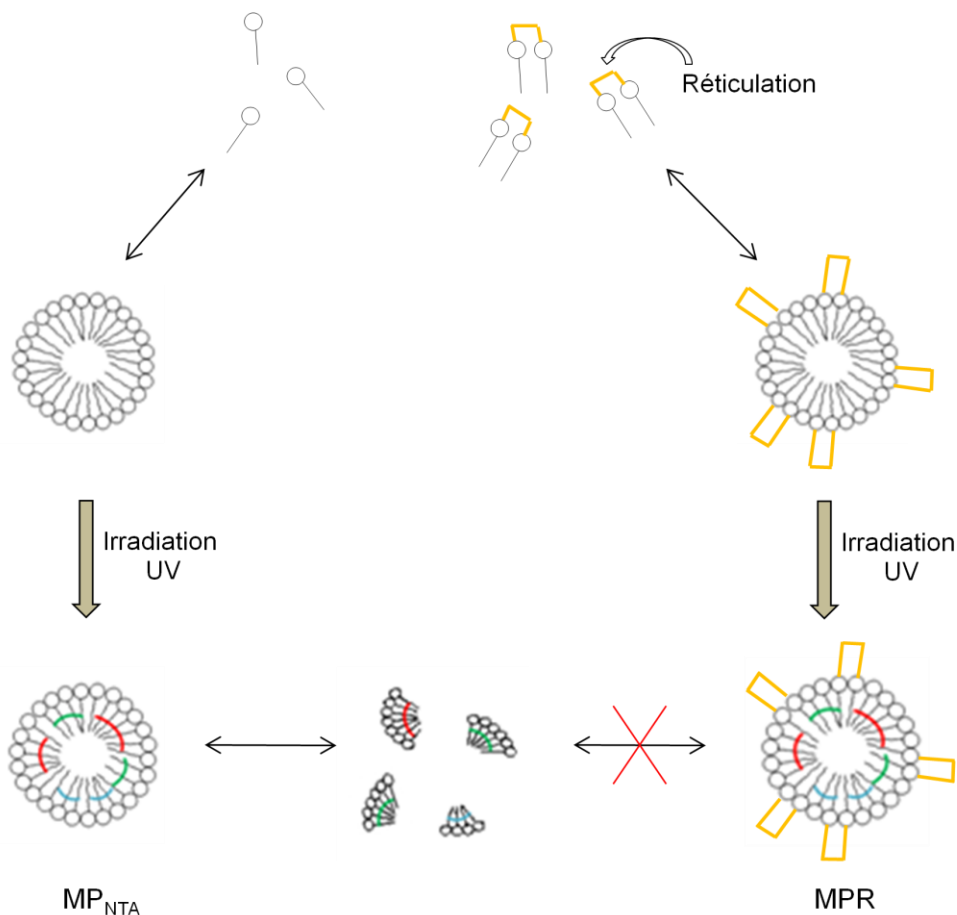
## II.2.7. Conclusion

Les différentes mesures effectuées sur les  $MNP_{NTA}$  et les  $MP_{NTA}$  ont montré que la polymérisation ne modifiait pas la structure nanométrique des micelles, car leurs tailles et leurs formes étaient conservées. Les analyses par DLS et SANS ont montré des micelles d'environ 3,5 nm de rayon, proche de la valeur théorique de 3,9 nm.

Par la suite, la présence de liaisons ene-yne a été démontrée par spectrométrie UV-visible et la structure des micelles avant et après polymérisation ont été décrites par SANS et par SEC. Ces micelles polymérisées possèdent d'autre part une CMC plus de dix fois plus basse qu'avant polymérisation, ce qui nous a permis d'affirmer que leur stabilité en solution aqueuse avait fortement augmenté. Pour finir, l'encapsulation d'une molécule hydrophobe a permis de découvrir que les micelles polymérisées pouvaient charger 25% de produit en moins que les micelles non polymérisées, ce qui indique qu'elles ont une structure moins flexible, certainement à cause des liaisons ene-yne formées.

## III. Vers des structures photopolymérisables et réticulables

La photo-polymérisation des amphiphiles diacétyléniques à tête polaire NTA dans les micelles, a permis de produire des micelles sphériques stabilisées. Cependant, ces  $MP_{NTA}$  sont constituées de chaînes de polymères linéaires, et on peut imaginer que l'ajout d'une réticulation sur ces chaînes pourrait encore augmenter la stabilisation. En effet, les  $MP_{NTA}$  sont en équilibre avec des chaînes de polymères, et la concentration pour laquelle cet équilibre a lieu a été déterminée par le calcul de la CMC. Le fait d'introduire une réticulation entre deux amphiphiles devrait pouvoir empêcher cette dissociation et permettre de conserver la structure intacte, même à de très faibles concentrations. Une représentation schématique montrant la formation des  $MP_{NTA}$  et des micelles polymérisables et réticulables (MPR) et leur différence de comportement en solution est présentée dans la figure 16.2



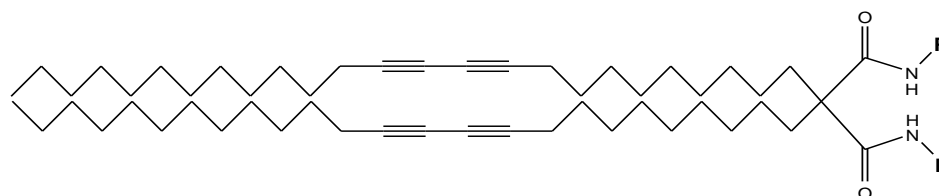
**Figure 16.2.** Représentation schématique de la formation des  $MP_{NTA}$  et des MPR

C'est dans le but d'obtenir des micelles polymérisables et réticulées, que nous avons débuté la synthèse d'amphiphiles diacétyléniques réticulables.

### III.1. Vers la synthèse d'un réticulant bibrin

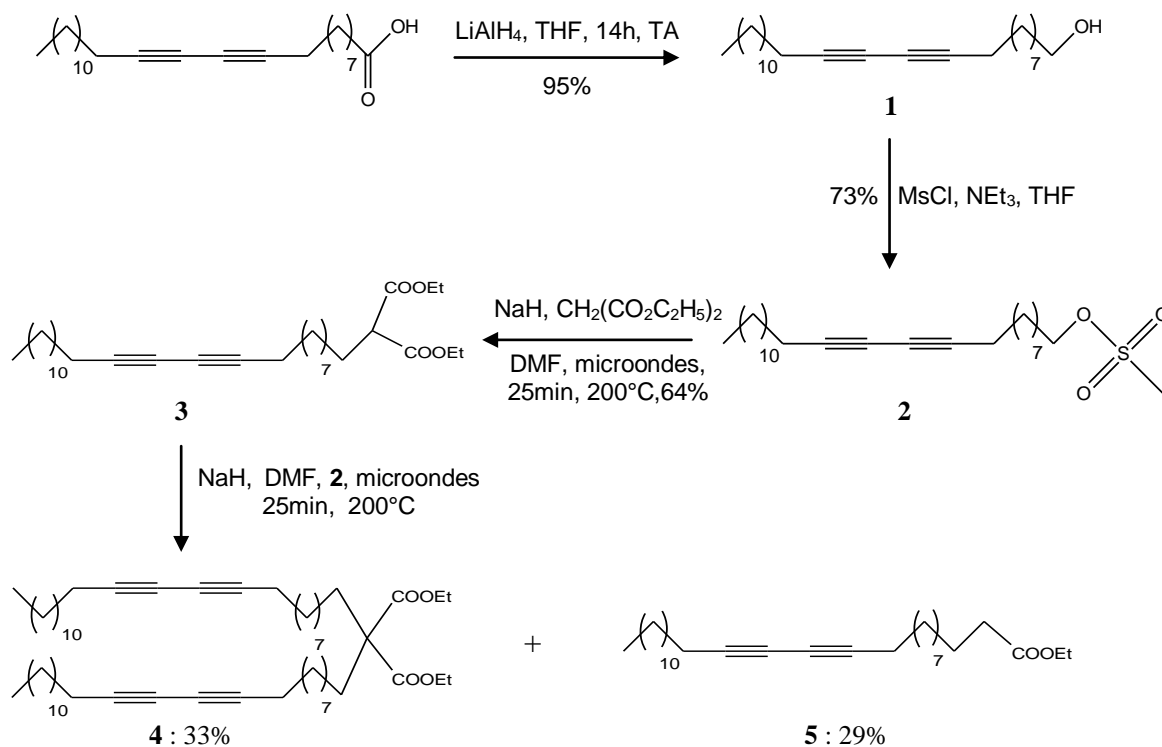
Des amphiphiles munis de deux brins photopolymérisables ont déjà été synthétisés et utilisés pour l'auto-assemblage de liposomes diacétyléniques, sur le modèle des phospholipides.<sup>17</sup> La molécule cible que l'on souhaite synthétiser est représentée sur la figure 17.2. La tête polaire **P** pourra être soit la tête NTA soit une tête PEG. La tête polaire NTA a été choisie afin de rendre l'étude comparative plus aisée par rapport à l'étude réalisée précédemment. De plus, nous devons tenir compte du paramètre d'assemblage  $P = v/(a_0.l_c)$ , où  $v$  est le volume de la chaîne hydrophobe,  $a_0$  la surface de la tête polaire et  $l_c$  la longueur de la chaîne. Nous savons que dans le cas de  $MP_{NTA}$ , nous obtenons des micelles sphériques, la valeur du paramètre  $P$

est donc inférieure à 0,33. Si nous doublons le volume de la chaîne hydrophobe, tout en doublant l'aire de la tête polaire, la valeur du paramètre P ne devrait pas varier et il est raisonnable de penser que nous obtiendrons également des micelles sphériques.



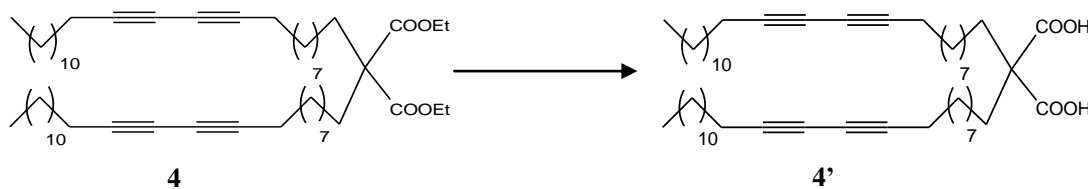
**Figure 17.2.** Structure de la molécule bibrin cible

Le schéma de synthèse débute par la réduction de l'acide 10,12-pentacosadinoïque en alcool **1** qui est ensuite transformé en groupe partant sous la forme du mésyle **2**. La substitution du mésylate par le méthyle malonate se fait par irradiation sous micro-ondes pendant 20 minutes pour obtenir le lipide malonate **3**. Celui-ci est ensuite mis à réagir dans une deuxième réaction d'alkylation du malonate avec une autre molécule mésylée **2** pour fournir la molécule **4** et un produit secondaire **5**. (Figure 18.2)



**Figure 18.2.** Synthèse de l'intermédiaire **4**

Afin d'obtenir la molécule bibrin cible, nous avons voulu saponifier le diester **4** pour former le diacide **4'**. (Figure 19.2)



**Figure 19.2.** Schéma de synthèse du diacide **4'** à partir du diester **4**

Afin d'effectuer la saponification, différentes conditions réactionnelles basiques et acides ont été testées en nous inspirant de la littérature. Une sélection de ces conditions est présentée dans le tableau 1.2.

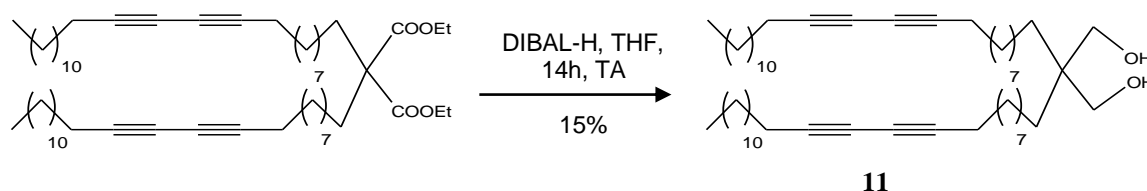
Réactifs	LiOH (10eq)	LiOH (10eq)	BBr <sub>3</sub> (5eq)	TMSCl (3eq) NaI (3eq)	AlCl <sub>3</sub> (6eq)
Solvant	THF/MeOH	THF/MeOH	DCM	THF	EtSH
Température/ temps de réaction	TA/14h	140°C/40min	TA/14h	Reflux/24h	TA/14h
Produits formés	<b>4</b>	<b>4</b>	- Produits de dégradation	- <b>4</b> (57%) - Produits de dégradation	- Produits de dégradation

**Tableau 1.2.** Conditions réactionnelles testées pour la saponification du diester **4**

Nous avons tout d'abord voulu saponifier le diester **4** dans des conditions classiques en présence d'hydroxyde de lithium à température ambiante pendant une nuit. L'analyse RMN du brut réactionnel a révélé uniquement la présence du produit de départ. Le diester **4** a ensuite été engagé en présence d'hydroxyde de lithium sous irradiation micro-ondes à 140°C successivement pendant 5 minutes, 20 minutes et 40 minutes. Pour chacune de ces conditions,

seul le produit de départ a été récupéré dans le brut réactionnel. Nous nous sommes alors tournés vers des conditions de saponification en milieu acide. Ainsi, des acides de Lewis comme le tribromure de bore<sup>18</sup> ( $\text{BBr}_3$ ), et le trichlorure d'aluminium<sup>19</sup> ( $\text{AlCl}_3$ ) en présence d'éthanethiol ( $\text{EtSH}$ ) ont été testés. Des conditions en présence de  $\text{NaI}$  et  $\text{TMSCl}$ <sup>20</sup> ont également été testées. Pour chaque condition, le brut réactionnel a été extrait en présence d' $\text{HCl}$  1N et d'acétate d'éthyle, puis une analyse RMN a été réalisée. Malheureusement, les différentes conditions testées n'ont pas permis d'obtenir le diacide souhaité, car nous avons récupéré soit le produit de départ, soit des produits de dégradation.

Nous nous sommes alors tournés vers la synthèse d'une autre famille de lipides pour lesquels la tête polaire serait couplée par substitution nucléophile. Pour cela, nous avons envisagé de réduire les esters de la molécule **4** en alcools. (Figure 20.2)

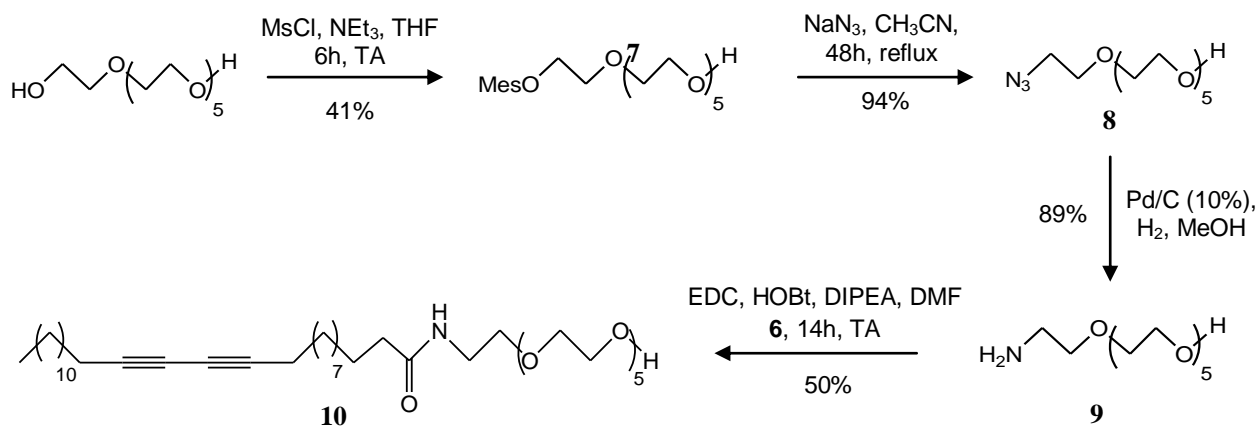


**Figure 20.2.** Synthèse du diol **11**

Différentes conditions réductrices ont été testées : en présence de DIBAL-H, de  $\text{LiAlH}_4$  ou encore de  $\text{Al}(\text{O}t\text{Bu})_3\text{H}$ . Ces réducteurs ont été mis à réagir avec le diester **4** à température ambiante ou sous irradiation micro-ondes et seule la réaction en présence de DIBAL-H pendant 14 heures à température ambiante a fourni la molécule **11**, avec un rendement de 15%. Les autres conditions n'ont permis de récupérer que le produit de départ et des produits de dégradation. Cependant, ce rendement de 15% n'était pas suffisant pour permettre de synthétiser une quantité raisonnable de produit, c'est pourquoi nous avons changé de stratégie et avons envisagé la synthèse d'un autre lipide pour lequel la réticulation post-polymérisation reposerait sur la formation d'un pont disulfure. Mais avant de détailler les synthèses réalisées,







**Figure 22.2.** Schéma de synthèse du composé **10**

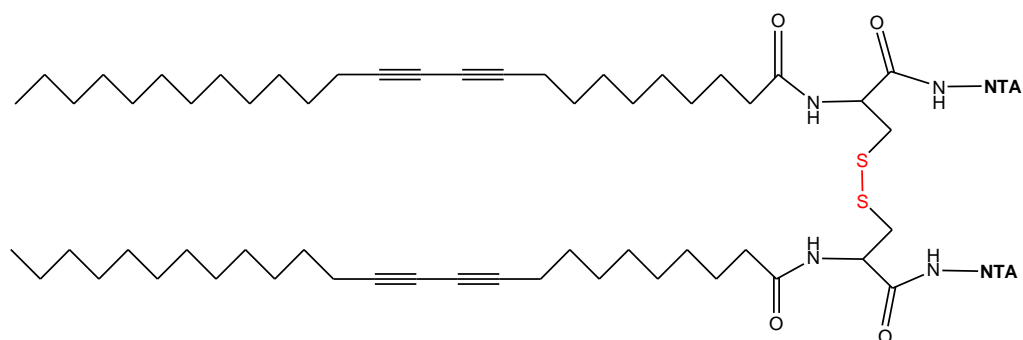
Le composé **10** a ainsi été obtenu et ses auto-arrangements dans l'eau se sont révélés très différents de ceux des autres lipides. En effet, ce ne sont pas des micelles sphériques qui ont été obtenues, mais des tubules et des hélices. L'étude structurale de ces arrangements sera présentée dans le chapitre 5.

### III.2. Vers la synthèse d'un amphiphile réticulant muni d'un pont disulfure ou d'un thiol

#### III.2.1. Vers la synthèse d'un amphiphile bibrin comportant un pont disulfure

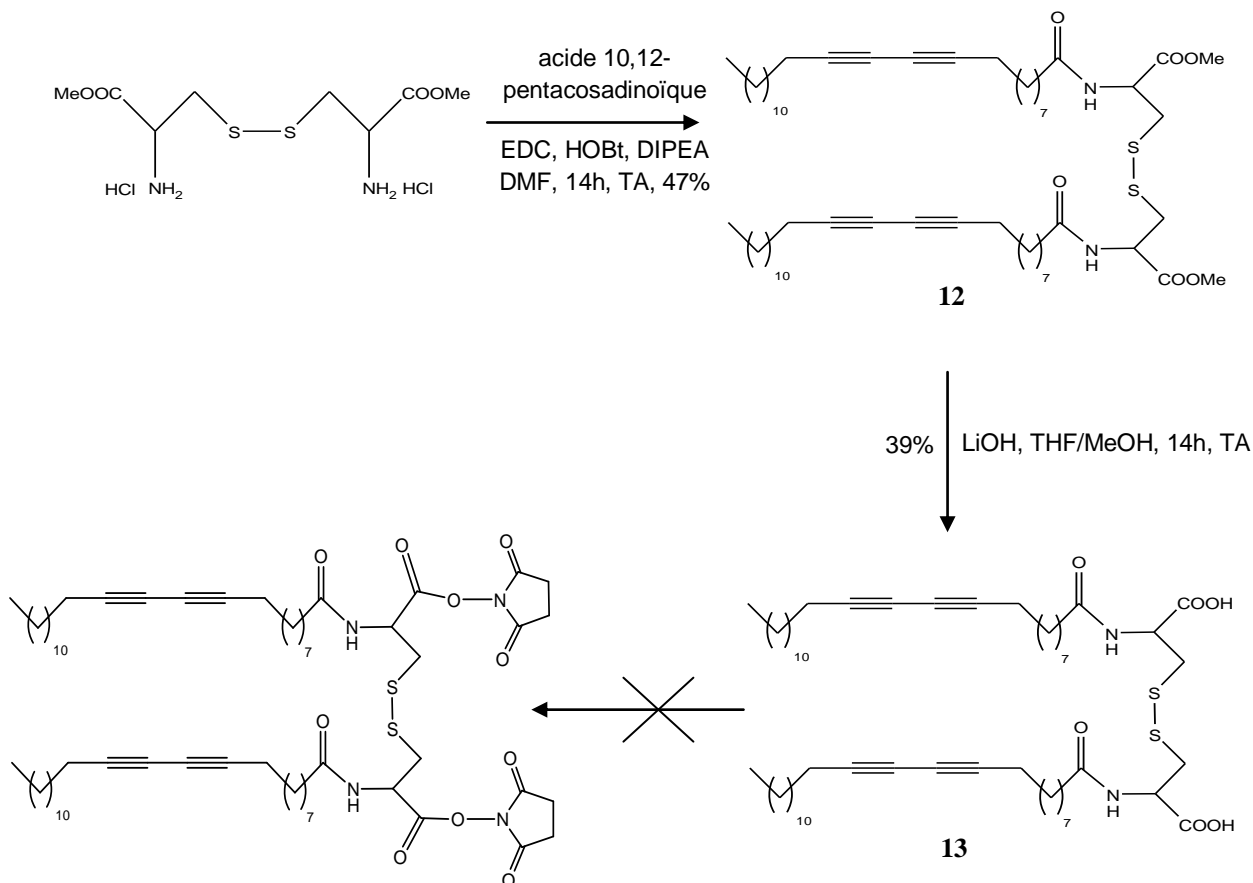
Nous avons envisagé d'introduire un pont disulfure sur un amphiphile diacétylénique afin de moduler la stabilité des micelles en fonction du milieu redox dans lequel elles se trouvent. En effet, en conditions réductrices et de manière réversible, le pont disulfure peut être rompu en libérant les thiols.<sup>22-24</sup> Ainsi, les micelles formées n'ont pas les mêmes propriétés physiques en conditions oxydantes ou réductrices. Nous avons alors envisagé de synthétiser une molécule possédant deux chaînes alkyles, introduites avec l'acide 10,12- pentacosadinoïque et reliées entre elles par un pont disulfure. Les têtes polaires NTA seront ensuite introduites afin

de permettre la formation de micelles en solution aqueuse et par la suite, d'obtenir des résultats comparables à ceux des  $MP_{NTA}$ . (Figure 23.2)



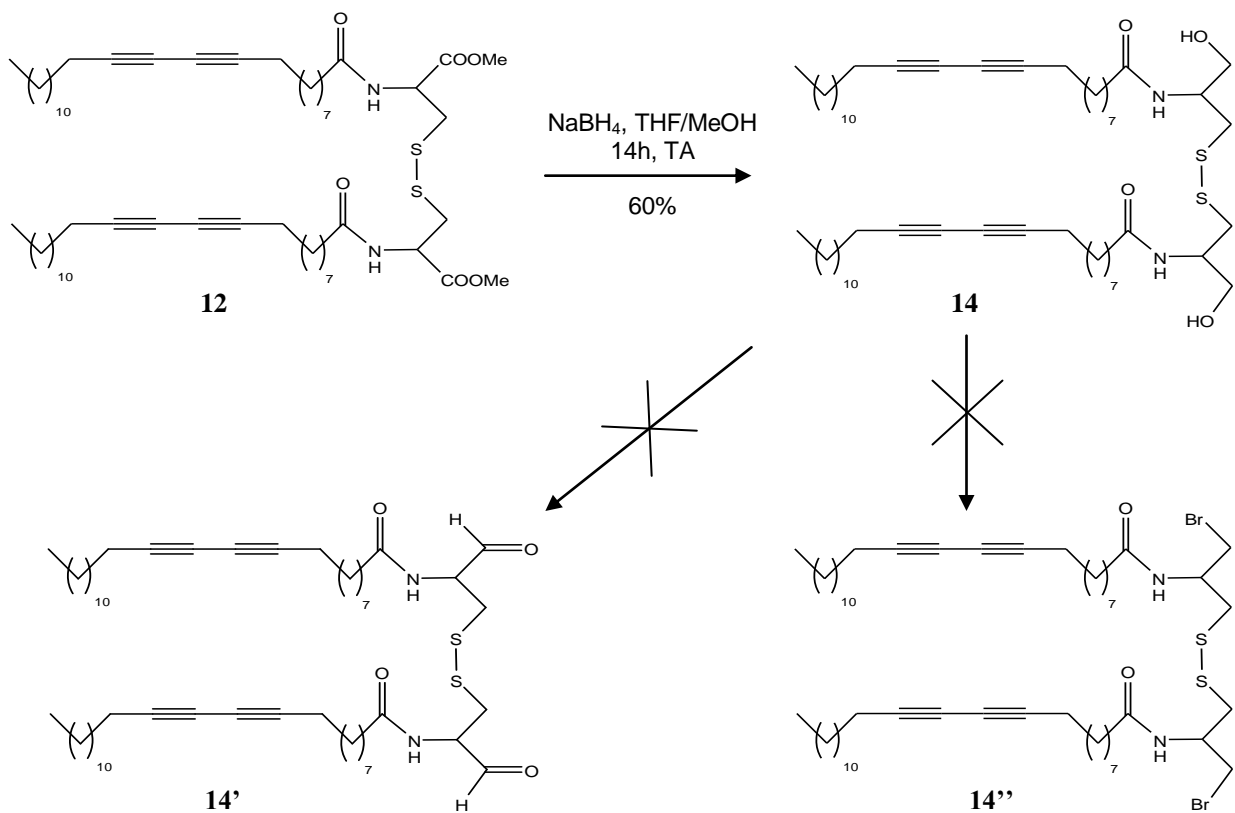
**Figure 23.2.** Molécule cible bibrin contenant un pont disulfure

La voie de synthèse développée est décrite dans la figure 24.2. Le diméthylester de la L-cystine est tout d'abord mis à réagir sur l'acide 10,12-pentacosadinoïque pour obtenir le composé **12**, possédant deux chaînes lipidiques, avec un rendement de 47%. Les esters sont ensuite saponifiés en présence d'hydroxyde de lithium pour fournir le diacide **13**. Par la suite, nous avons engagé le diacide **13** avec la molécule  $NH_2$ -NTA, en présence d'EDC, d'HOBt et de DIPEA. Ces conditions de couplage ont été choisies car ce sont celles utilisées efficacement sur l'acide 10,12-pentacosadinoïque. Cependant, aucun produit de couplage n'a été récupéré dans ces conditions. Afin de vérifier que l'activation des acides est possible, nous avons voulu effectuer une réaction séquentielle par isolation des acides activés intermédiaires en présence de *N*-hydroxysuccinimide et d'EDC dans le dichlorométhane (DCM). La purification du brut réactionnel a été réalisée de façon similaire à celle utilisée pour la synthèse de l'amphiphile à tête polaire NTA, c'est-à-dire par ajout d'une solution saturée de chlorure de sodium et une extraction avec du DCM. Ainsi, le brut réactionnel analysé par RMN a montré les pics caractéristiques des amphiphiles diacétyléniques mais pas de pics pouvant être attribués à des acides activés. (Figure 24.2)



**Figure 24.2.** Schéma de synthèse de la molécule bibrin **13**

Nous avons alors pensé que l'activation des acides était délicate et une autre voie de synthèse a été imaginée pour arriver à un produit dérivé permettant les mêmes caractéristiques fonctionnelles. De façon similaire à la réduction effectuée dans une synthèse précédente (Figure 20.2), nous avons choisi de réduire les esters en alcools afin d'obtenir la molécule **14** en présence de NaBH<sub>4</sub>. Le diol **14** a ainsi été obtenu avec un rendement de 60%. Puis, nous avons envisagé soit d'oxyder les alcools en aldéhydes pour obtenir le dérivé **14'**, soit de les substituer par deux atomes de brome afin d'obtenir le dérivé **14''**. (Figure 25.2)



**Figure 25.2.** Schéma de synthèse des dérivés dialdéhydes **14'** et dibromos **14''**

Malheureusement, les fonctions hydroxyles du composé **14** n'ont pu être bromées ni par  $\text{PBr}_3$ ,<sup>25</sup> ni par utilisation de la combinaison  $\text{CBr}_4$  avec  $\text{PPh}_3$ ,<sup>26</sup> pour obtenir le dérivé **14''**. Dans les deux cas, des purifications sur silice ont été effectuées, mais aucun des produits isolés et analysés par RMN ne se sont révélés être le dérivé **14'**. Nous avons alors voulu oxyder le composé **14** avec le réactif de Dess-Martin<sup>27</sup> et avec le réactif de Swern<sup>28</sup> afin d'obtenir le dialdéhyde **14''**, mais l'analyse du brut réactionnel par RMN n'a pas montré la présence caractéristique des protons des aldéhydes.

### III.2.2. Vers la synthèse d'un amphiphile monobrin comportant un thiol

Par la suite, nous avons voulu synthétiser un amphiphile synthétisable à partir de l'amphiphile **23**, dont la synthèse est décrite dans le chapitre 3, afin d'obtenir l'amphiphile **23'**. Cette synthèse présente l'avantage de partir d'un amphiphile possédant déjà une tête polaire sur laquelle il faut ajouter un groupement thiol. La rétrosynthèse de la molécule cible est représentée sur la figure 26.2.

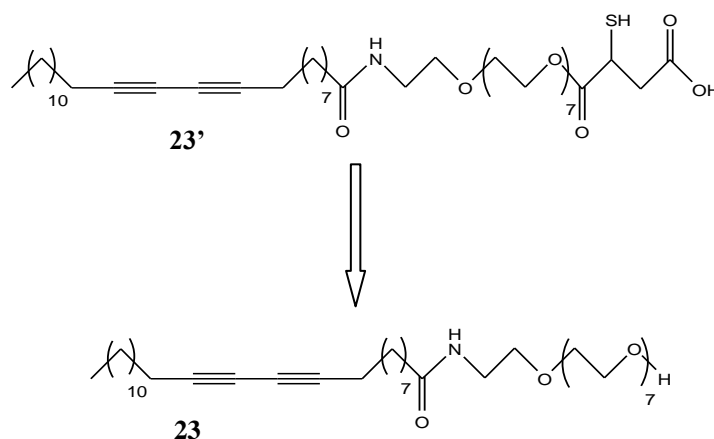
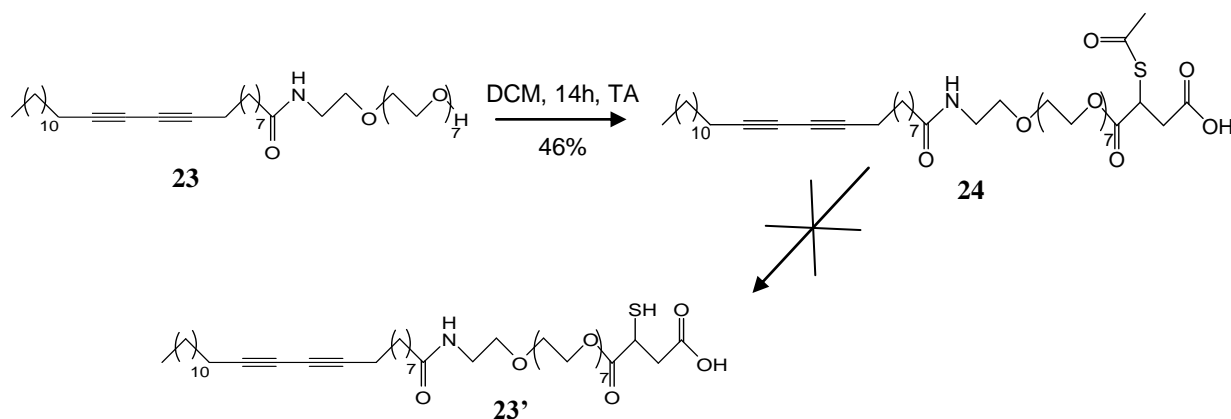


Figure 26.2. Structure de la molécule **23'** cible

Pour cela, nous avons d'abord fait réagir l'alcool terminal de l'amphiphile **23** sur l'anhydride S-acétylmercaptosuccinique pour obtenir la molécule **24** avec un rendement de 46 %. Les conditions classiques de déprotection de thioacétate sont réalisées en présence de méthoxyde de sodium (NaOMe) en quantité catalytiques dans le méthanol.<sup>29</sup> Le composé **24** a donc été mis à réagir avec 0,25 équivalent de NaOMe puis 1 équivalent de NaOMe : dans les deux cas, l'intégralité du composé de départ **24** a été récupéré. Nous avons donc introduit un plus grand nombre d'équivalents de NaOMe (10 eq), mais cette fois, la réaction a abouti à la saponification de l'ester et seul le produit **23** a été isolé. Les conditions basiques d'hydrolyse du thioacétate n'ayant pas abouti, nous avons tenté une déprotection en milieu acide<sup>30-31</sup> par ajout d'acide chlorhydrique en solution dans le méthanol (1,7 eq). Après 14 heures à température ambiante, seul le composé de départ **24** était visible en chromatographie sur

couche mince mais l'ajout d'acide chlorhydrique supplémentaire (1,7 eq) puis le chauffage à reflux pendant 2 heures ont conduit à la dégradation du composé **23** et n'ont pas permis d'obtenir le composé **23'** voulu. (Figure 27.2)



**Figure 27.2.** Schéma de synthèse envisagé pour la molécule **23'**

Lors de la déprotection de la molécule **24**, la liaison ester formée entre l'amphiphile **23** et la partie thioacétate est la partie sensible de la molécule et sa rupture qui n'a pas permis d'obtenir la molécule **23'**. En effet, les liaisons esters sont beaucoup plus sensibles aux conditions acides ou basiques que les amides par exemple. Ainsi, nous pourrions envisager de reprendre la synthèse d'un amphiphile de type **23**, mais muni d'une amine primaire à son extrémité. De cette façon, une fois la partie thioacétate fixée sur l'amphiphile, la déprotection devrait être beaucoup plus aisée, et l'étude portant sur la synthèse de micelles polymérisables réticulées devrait être menée à bien.

## IV-Conclusion

Des amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête polaire NTA ont été auto-arrangés en solution aqueuse. Ces micelles ont été photopolymérisées sous irradiation UV pour fournir des  $MP_{NTA}$  qui se sont révélées posséder la même forme et la même taille qu'avant polymérisation. L'efficacité de la polymérisation a cependant été attestée par plusieurs méthodes d'analyses et l'étude structurale de ces  $MP_{NTA}$  a été acceptée pour publication dans le journal scientifique *Macromolecular Chemistry and Physics* cette année.

Suite à cette étude, nous avons voulu synthétiser des amphiphiles photopolymérisables et réticulables. Même si aucune voie de synthèse n'a abouti, des possibilités sont encore envisageables. Ainsi obtenus, ces amphiphiles pourraient être étudiés par les mêmes techniques que celles décrites précédemment, notamment par le calcul de leurs CMC, leurs distributions en SEC et en SANS. De grandes différences devraient alors être observées dans ces micelles réticulées pour fournir des composés encore plus stables et qui révéleront peut-être d'autres surprises structurales, comme ce fut le cas pour l'amphiphile **10**, dont nous décrirons les auto-arrangements dans le chapitre 5.



## Références

- (1) Mowery, M.D.; Cai, M.; Menzel, H.; Evans, C.E. Nanometer-scale design and fabrication of polymer interfaces using polydiacetylene monolayers, *J. Vac. Sci. Technol.* **1999**, *17*, 2136-2141
- (2) Okawa, Y.; Aono, M. Linear chain polymerization initiated by a scanning tunneling microscope tip at designated positions, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 2317-2322
- (3) Sixl, H.; Kollmar, C.; Huber, R.; Sigmund, E. Theory of the radical-electron configurations and optical excitations in short-chain polydiacetylene oligomers, *Phys. Rev.* **1987**, *36*, 2747-2756
- (4) Michinobu, T.; Osako, H.; Shigehara, K. Alkyne-linked poly(1,8-carbazole)s : a novel class of conjugated carbazole polymers, *Macromol. Rapid Comm.* **2008**, *29*, 111-116
- (5) Pilzak, G.S.; Fratiloiu, S.; Baggerman, J.; Grozema, F.C.; Sudhölter, E.J.R.; Siebbeles, L.D.A.; Zuilhof, H. Radical cations of all-trans oligodiacetylenes : optical absorption and reactivity toward nucleophiles, *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 11095-11100
- (6) Pilzak, G.S.; Van Gruijthuijsen, K.; Van Doorn, R.H.; Van Lagen, B.; Sudhölter, E.J.R.; Zuilhof, H. Hybrid conjugated organic oligomers consisting of oligodiacetylene and thiophene units : synthesis and optical properties, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9085-9096
- (7) Jelinek, R. ; Kolusheva, S. Polymerized lipid vesicles as colorimetric biosensors for biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 109-118
- (8) Howarth, N.M.; Lindsell, W.E.; Murray, E.; Preston, P.N. Synthesis and polymerization of lipophilic peptide nucleic acids derived from stearic acid and pentacosanoic acid, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8089-8092
- (9) Source : [www.er.uqam.ca/nobel/m344764/images/micelle.jpg](http://www.er.uqam.ca/nobel/m344764/images/micelle.jpg)
- (10) Kricheldorf H.R.; Lomadze N.; Schwarz G. Poly(hydroxyisobutyrate) by ring-opening polymerizations of 5,5-dimethyl-1,3,2-dioxithiolan-4-one-2-oxide, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 6229-6237
- (11) Wilhelm, M.; Zhao, C.L; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M.A.; Mura, J.L; Riess, G.; Croucher, M.D. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study, *Macromolecules* **1991**, *24*, 1033-1040
- (12) Hu, X.; Chen, X.; Wei, J.; Liu, S.; Jing, X. Core crosslinking of biodegradable block copolymer micelles based on poly(ester carbonate), *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 456-463
- (13) Torchilin, V.P. Micellar nanocarriers : pharmaceutical perspectives, *Pharma. Res.* **2007**, *24*, 1, 1-16
- (14) Li, Y-Y.; Zhang, X-Z.; Cheng, H. ; Zhu, J-L.; Li, U-N.; Cheng, S-X.; Zhuo, R-X. Fluorescent, thermo-responsive biotin-P(NIPAAm-co-NDAPM)- b-PCL micelles for cell-tracking and drug delivery, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 1-8
- (15) Sezgin, Z.; Yüksel, N.; Baykara, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs, *Eur. J. Pharma. Biopharma.* **2006**, *64*, 261-268

- (16) Emerson, M.F.; Holzer, A. Hydrophobic bond in micellar systems. Effects of various additives on the stability of micelles of sodium dodecyl sulfate and of *n*-dodecyltrimethylammonium bromide, *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 3320-3330
- (17) Walton, J.G.A.; Patterson, S.; Liu, G.; Haraldsen, J.D.; Hollick, J.J.; Slawin, A.M.Z.; Ward, G.E.; Westwood, N.J. Synthesis and biological evaluation of functionalized tetrahydro- $\beta$ -carboline analogues as inhibitors of *Toxoplasma gondii* invasion, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3049-3060
- (18) Felix, A.M. Cleavage of protecting groups with boron tribromide, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1427-1429
- (19) Node, M.; Nishide, K.; Sai, M.; Fuji, K.; Fujita, E. Hard acid and soft nucleophile systems. Dealkylation of esters with aluminium halide-thiol and aluminium halide-sulfide systems, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1991-1993
- (20) Olah, G.A.; Narang, S.C.; Balaram Gupta, B.G.; Malhotra, R. Synthetic methods and reactions. Transformations with chlorotrimethylsilane/sodium iodide, a convenient in situ iodotrimethylsilane reagent, *J. Org. Chem.* **1978**, *44*, 1247-1251
- (21) Nagahori, N.; Abe, M.; Nishimura, S.I. Structural and functional glycosphingolipidomics by glycoblotting with an aminoxy-functionalized gold nanoparticle, *Biochemistry* **2009**, *48*, 583-594
- (22) Wang, Y.C.; Li, Y.; Sun, T.M.; Xiong, M.H.; Wu, J.; Yang, Y.Y.; Wang, J. Core-Shell-Corona micelles stabilized by reversible cross-linkage for intracellular drug delivery, *Macromol. Rapid Comm.* **2010**, *31*, 1201-1206
- (23) Sun, H.; Guo, B.; Li, X.; Cheng, R.; Meng, F.; Liu, H.; Zhong, Z. Shell-sheddable micelles based on dextran-ss-poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 848-854
- (24) Jiang, X.; Liu, S.; Narain, R. Degradable thermoresponsive core cross-linked micelles : fabrication, surface functionalization, and biorecognition, *Langmuir* **2009**, *25*, 13344-13350
- (25) Yadav, J.S.; Somaiah, R.; Ravindar, K.; Chandraiah, Stereoselective total synthesis of (+)-mueggelone a novel inhibitor of fish development, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2848-2850
- (26) Wang, J.; Shen, Y.; Kessel, S.; Fernandes, P.; Yoshida, K.; Yagai, S.; Kurth, D.G.; Möhwald, H.; Nakanishi, T. Self-assembly made durable : water-repellent materials formed by cross-linking fullerene derivatives, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2166-2170
- (27) Dess, D.B.; Martin, J.C. A useful 12-I-5 triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277-7287
- (28) Fang, X.; Gandarange, U.K.; Wang, T.; Schroeder, J.D.; Garvey, D.S. First examples of oxidizing secondary alcohols to etones in the presence of the disulfide functional group: synthesis of novel diketone disulfides, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4019-4021
- (29) Pachamuthu, K.; Zhu, X.; Schmidt, R.R. Reversed approach to S-farnesylation and S-palmitoylation: application to an efficient synthesis of the C-terminus of lipidated human N-ras hexapeptide, *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 3720-3723

- (30) Strijtveen, B.; Kellogg, R.M. Synthesis of (racemization prone) optically active thiols by SN2 substitution using cesium thiocarboxylates, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3664-3671
- (31) Sheepwash, E.E.; Rowntree, P.A.; Schwan, A.L. The preparation of three new partially deuterated hexadecanethiols for applications in surface chemistry, *J. Label Compd. Radiopharma.* **2008**, *51*, 391-398



# **CHAPITRE 3**

## **Fonctionnalisation de micelles polydiacétyléniques**

### **Etude de leur comportement sur cellules *et in vivo***



## Chapitre 3

### Fonctionnalisation de micelles polydiacétyléniques

### Etude de leur comportement sur cellules et *in vivo*

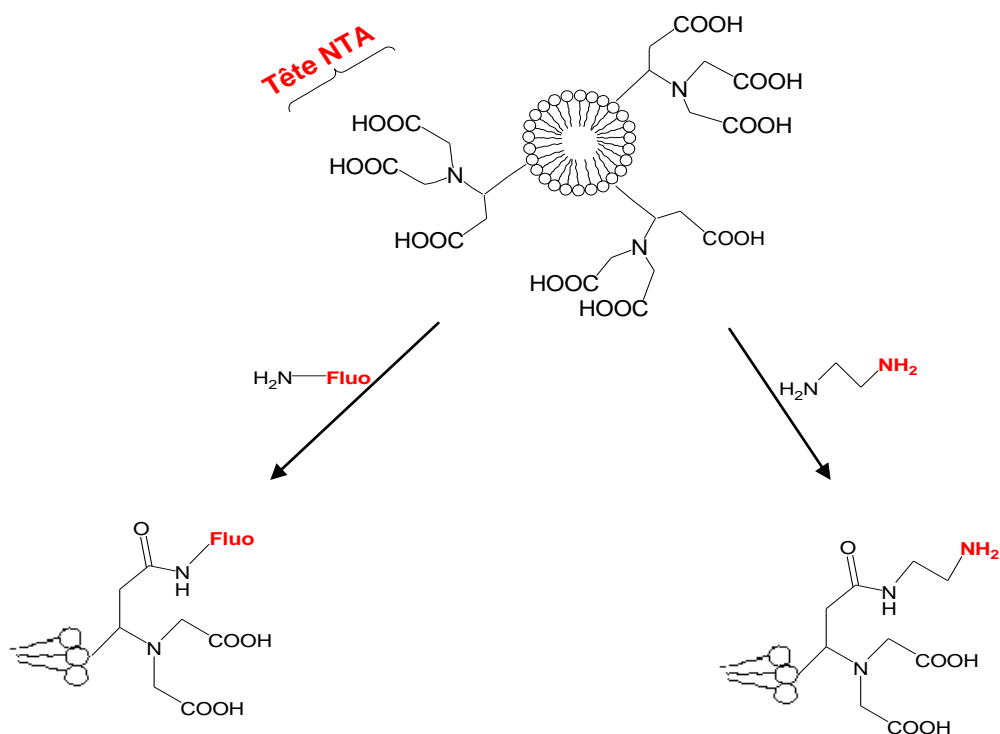
---

Suite à l'étude menée sur la stabilisation induite par la photopolymérisation dans les micelles portant une tête NTA ( $MP_{NTA}$ ), nous avons voulu mettre en place un protocole permettant d'évaluer leur potentiel en tant qu'agent de vectorisation ou agent d'imagerie. Les  $MP_{NTA}$  possèdent trois acides carboxyliques par amphiphile, c'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la fonctionnalisation de surface afin d'envisager l'utilisation des  $MP_{NTA}$  en tant que plateforme multivalente, pour y fixer soit des sondes fluorescentes, soit des agents de ciblage. La fonctionnalisation des têtes acides par couplage peptidique paraissait donc relativement simple à mettre en œuvre. Cependant, avant de fixer des sondes fluorescentes, nous avons voulu mettre des conditions au point en fixant des molécules plus simples, comme l'éthylènediamine.

#### I. Etude de la fonctionnalisation de surface des $MP_{NTA}$

##### I.1. Principe

Avant de réaliser le couplage avec des sondes fluorescentes, nous avons voulu mettre au point le couplage des têtes NTA avec des groupes amines qui pourront potentiellement être couplés à des groupements spécifiques, comme des anticorps. Les deux voies de couplages envisagées sont présentées dans la figure 1.3.



**Figure 1.3.** Représentation schématique de la fonctionnalisation de surface des micelles NTA

Le but de cette étude est de produire des  $MP_{NTA}$  possédant des amines et des sondes fluorescentes uniquement par marquage de surface. La fonctionnalisation de surface des  $MP_{NTA}$  se déroulera en trois étapes : le couplage entre les acides carboxyliques des  $MP_{NTA}$  et un dérivé contenant une amine primaire, la purification du mélange afin de séparer les  $MP_{NTA}$  couplées des réactifs restants, puis le dosage des groupes fixés pour déterminer le taux de fonctionnalisation. Un grand soin sera apporté à l'optimisation des conditions de couplage et de purification, afin de discriminer le marquage spécifique du marquage non spécifique.

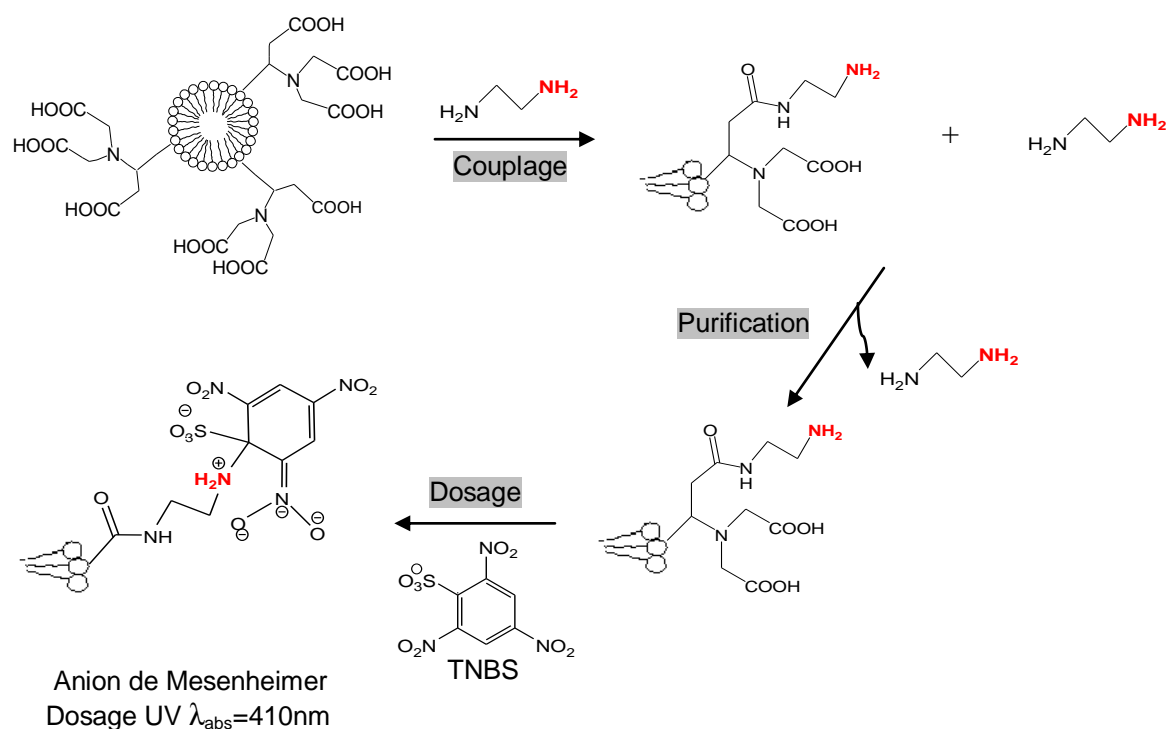
## I.2. Etude de la fonctionnalisation de surface par fixation d'éthylènediamine

### I.2.1. Principe

La fonctionnalisation des  $MP_{NTA}$  par des amines primaires aura lieu en trois temps : couplage avec l'éthylènediamine, purification pour séparer les micelles fonctionnalisées ( $MP_{NTA-NH_2}$ )



obtenues et l'éthylènediamine restante, puis dosage des amines fixées de manière covalente sur les MP<sub>NTA</sub>. (Figure 2.3)



**Figure 2.3.** Schéma général de synthèse des MP<sub>NTA</sub> fonctionnalisées par des amines primaires

Avant d'optimiser les conditions de couplage, nous allons exposer le mode de purification choisi, puis la méthode de dosage des amines fixées sur les MP<sub>NTA</sub>.

### I.2.2. Choix de la méthode de purification

La purification est une étape clé du processus car elle permet de séparer les micelles des molécules libres en solution. Selon la littérature, la purification de micelles fonctionnalisées se réalise avec trois principales techniques : la centrifugation,<sup>1-2</sup> la dialyse<sup>3-4</sup> et les gels d'exclusion stérique.<sup>5-6-7-8</sup> Dans notre cas, la centrifugation n'est pas envisageable car les micelles ne sont pas en suspension mais solubles dans l'eau. Nous avons donc le choix entre la dialyse et les gels d'exclusion stérique. La dialyse étant un processus qui dure plusieurs

heures, nous avons choisi d'utiliser des gels d'exclusion stérique. Les purifications seront donc beaucoup plus rapides à réaliser, ce qui sera un avantage pour l'optimisation des conditions de couplage. Ainsi, les colonnes pré-conditionnées PD-10 (GE Healthcare) contenant un gel Séphadex G-25 Medium ont été choisies car elles possèdent une limite de séparation 5000 g/moles et peuvent séparer entre 1 et 2,5 mL de mélange réactionnel. Les micelles seront donc présentes en début d'élution tandis que les molécules libres seront retenues par les billes et éluées plus lentement.

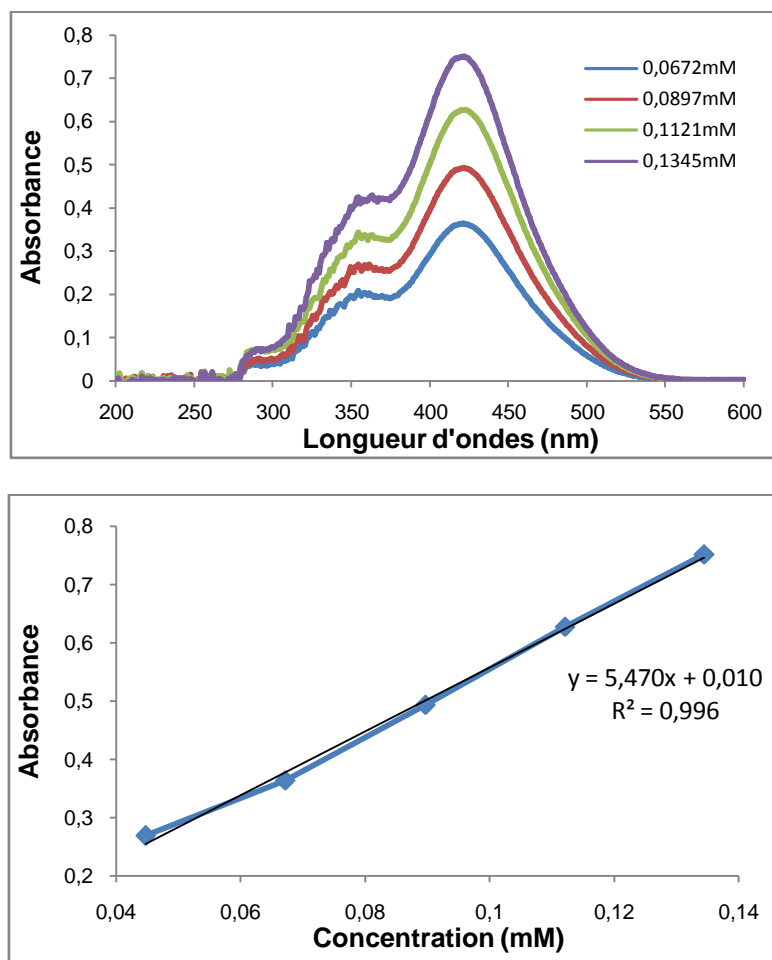
### I.2.3. Méthode de dosage

Le dosage des amines est souvent réalisé en présence de trinitrobenzènesulfonate (TNBS)<sup>9-10-11</sup> car la réaction entre les amines primaires et le TNBS permet de former un anion de Mesenheimer, absorbant fortement en UV-visible. Le dosage de cet anion permet alors de quantifier le nombre de moles d'amine en solution.

Comme nous nous attendons à ne pas effectuer une réaction totale entre les acides des MP<sub>NTA</sub> et l'éthylènediamine, une certaine quantité de cette dernière sera encore présente en solution en fin de réaction. C'est pourquoi nous avons réalisé deux courbes d'étalonnage : la première avec la propylamine et la deuxième avec l'éthylènediamine. L'étalonnage de la propylamine permettra de quantifier les amines sur les MP<sub>NTA</sub>, car celles-ci ne présentent que des amines primaires sur leur surface, et l'étalonnage de l'éthylènediamine permettra quant à elle de quantifier les molécules n'ayant pas réagi.

Les conditions de dosage des amines en solution sont les suivantes : 20 µL d'une solution de TNBS à une concentration de 15 mg/mL dans l'eau sont placés dans 200 µL de tampon bicarbonate pH 10,5 à 0,8 M. La solution contenant les amines est ajoutée ainsi qu'un certain volume d'eau, pour maintenir le volume total constant à 1 mL. Le mélange est incubé

2 heures à 37°C puis un dosage UV est effectué et la valeur à 410 nm est relevée. Les courbes UV obtenues pour les différentes concentrations de propylamine ainsi que la droite d'étalonnage de la propylamine sont représentées dans la figure 3.3.



**Figure 3.3.** Courbe d'étalonnage du dosage de la propylamine par le TNBS dans le tampon bicarbonate pH10.5

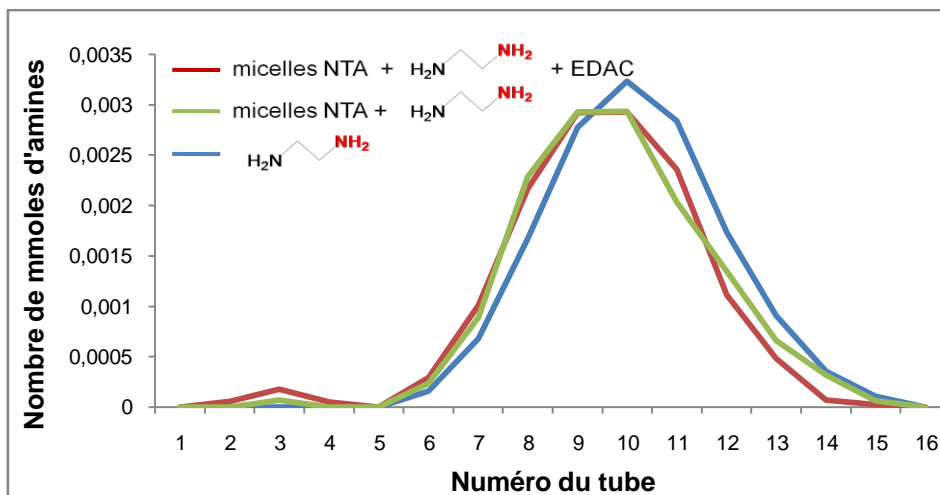
La courbe d'étalonnage de la propylamine obtenue fournit la droite de régression linéaire qui permet de déterminer la valeur du coefficient d'extinction de la propylamine dosée par le TNBS :  $\epsilon = 5470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La même droite d'étalonnage a été réalisée pour l'éthylènediamine et a donné un coefficient d'extinction :  $\epsilon = 11897 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La valeur que l'on trouve pour l'éthylènediamine est logiquement le double de celle de la propylamine, car pour la même concentration, les deux amines primaires de l'éthylènediamine réagissent avec le TNBS quand la seule amine de la propylamine réagit avec le TNBS.

### I.2.4. Mise au point des conditions de couplage

Les couplages peptidiques à la surface de nanoparticules ou de micelles se réalisent souvent en milieu aqueux en présence 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDAC) pour activer les acides carboxyliques, puis par couplage avec une amine primaire.<sup>12</sup> La réaction peut être effectuée dans différents tampons de pH 4,5 à pH 8. Nous avons donc envisagé de réaliser le couplage dans le tampon phosphate pH 7,5. Pour toutes les réactions, une réaction contrôle est réalisée : les MP<sub>NTA</sub> sont agitées en solution en présence des réactifs contenant les amines primaires mais en absence d'agent de couplage. Cette réaction contrôle permettra de vérifier que les amines détectées avec les micelles sont bien fixées de manière spécifique.

#### I.2.4.a. Couplage en milieu aqueux

Une solution de MP<sub>NTA</sub> (1 mg/mL, 1eq d'acides) dans le tampon phosphate pH 7,5 (0,1 M) est agitée 14 heures en présence d'EDAC (0,5 eq par rapport aux acides) et d'éthylènediamine (0,5 eq).<sup>12</sup> Le mélange est ensuite chromatographié sur Séphadex G-25 et fractionné en tubes de 0,5 mL. Chaque fraction est ensuite incubée avec du TNBS, puis dosée par UV afin de déterminer le taux de fonctionnalisation. Une réaction contrôle est effectuée pour chaque expérience : les micelles sont agitées en présence d'éthylènediamine mais sans agent de couplage (EDAC). D'autre part, les MP<sub>NTA</sub> qui ont été éluées seules sur Séphadex G-25 à une concentration de 1 mg/mL, ont été détectées par UV grâce à l'absorption des groupes diacétylènes et sortent du gel entre les tubes 1 et 4. Chaque tube est dosé par le TNBS, ce qui permet de déterminer le nombre de mmoles d'amines présentes ; les profils d'éluion obtenus sont tracés dans la figure 4.3.



**Figure 4.3.** Elution du couplage et des réactions contrôles des micelles NTA avec l'éthylènediamine

La courbe bleue représente l'élution de l'éthylènediamine seule où un pic est présent entre les tubes 6 et 14. La courbe rouge représente l'élution du mélange réactionnel où deux pics sont présents : un pic majoritaire entre les tubes 6 et 14 et pic minoritaire entre les tubes 2 et 4. Le pic majoritaire correspond exactement à celui observé dans le cas de l'éthylènediamine seule, ce qui signifie qu'une grande partie n'a pas été couplée aux acides durant la réaction. Le deuxième pic minoritaire (tubes 2 à 4) correspond, quant à lui, aux amines éluées en même temps que les  $MP_{NTA}$ . D'autre part, la courbe verte représente l'élution de la réaction sans agent de couplage pour laquelle les deux mêmes pics sont également détectés. Cela signifie que des amines ont été détectées en même temps que les  $MP_{NTA}$ , dans le pic correspondant aux micelles mais sans être liées de manière covalente aux  $MP_{NTA}$ . Nous en avons conclu qu'elles doivent être adsorbées sur les micelles et que la purification par Séphadex n'a pas permis la dissociation de cet ensemble.

Toutefois, il est possible de déterminer la quantité d'amines dosées par rapport aux acides de départ. Ainsi, pour le couplage en présence d'EDAC, le pourcentage d'amine ayant réagi sur les acides est de 1,9% alors que sans EDAC, il est de 0,5%, à la précision de la mesure près. Si l'on calcule le ratio de ces deux pourcentages, cela signifie que 25% du couplage serait non

spécifique. Il est à noter que le pourcentage de fixation sur les acides est très faible et d'autre part, le pourcentage de couplage non spécifique est très élevé.

Nous avons donc modifié les conditions réactionnelles pour essayer d'augmenter le pourcentage de fixation et d'éliminer la fixation non spécifique. L'ajout du N-hydroxydesuccimidine sulfonate comme deuxième agent de couplage a été envisagé ainsi que l'utilisation d'un tampon MES pH 4,7 (0,1M) comme solvant de la réaction.<sup>13</sup> Les résultats comparatifs de ces différents essais sont regroupés dans le tableau 1.3.

<b>Solvant</b>	Tampon phosphate	Tampon phosphate	MES pH4.7
<b>Agents de couplage (ADC) Nombre d'équivalent</b>	EDAC 0,5 eq	EDAC/NHS-Sulfo 0,5 eq/0,5 eq	EDAC/NHS-Sulfo 0,5 eq/0,5 eq
<b>Réaction avec ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	1,9%	5,3%	6,4%
<b>Réaction sans ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	0,5%	3,9%	1,8%

**Tableau 1.3.** Pourcentages de couplages sur les MP<sub>NTA</sub> avec 0,5 équivalents d'éthylènediamine par rapport aux acides en milieux aqueux

La présence d'un deuxième agent de couplage (NHS-Sulfo) ainsi que l'utilisation du tampon MES, ont permis d'augmenter le taux de fixation sur les MP<sub>NTA</sub> de 1,9% à 6,3%. Cependant, le signal attribué à de la fixation non spécifique n'a pour sa part pas été réduit. Nous en avons déduit que les conditions réactionnelles dans l'eau ne sont pas optimum, c'est pourquoi des réactions en solvants organiques ont été envisagées pour réduire ce pourcentage d'amine lié de manière non spécifique aux micelles.

## I.2.4.b. Couplage en milieu organique

### I.2.4.b.α. Purification en milieu aqueux

Trois solvants organiques ont été choisis : le tétrahydrofurane (THF), la diméthylformamide (DMF) et le méthanol (MeOH). Notre premier choix s'est tourné vers le THF car nous avons vu dans le chapitre précédent que les MP<sub>NTA</sub> conservaient leur structure quand elles étaient dissoutes dans le THF pur. D'autre part, la DMF et le méthanol ont été testés car ils sont fréquemment utilisés pour réaliser des couplages peptidiques. Les conditions réactionnelles testées sont celles utilisées dans ces solvants : EDC/HOBt (0,5 eq) pour activer les acides carboxyliques (1 eq) en présence de triéthylamine(0,5 eq) puis ajout d'éthylènediamine (1 eq). Après 14 heures d'agitation à température ambiante, les solutions sont concentrées puis le résidu est redissous dans du tampon phosphate pour être purifié sur Séphadex G-25. Deux concentrations différentes en micelles ont été également testées : 1 mg/mL et 3 mg/mL, afin d'évaluer si ce facteur peut influencer le taux de fixation spécifique et non spécifique. Les résultats obtenus avec ou sans agents de couplage (ADC) sont présentés dans le tableau 2.3.

Solvant	THF		DMF		MeOH	
	1 mg/mL	3 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL
<b>Concentration en micelles</b>	1 mg/mL	3 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL
<b>Réaction avec ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	14,5%	8%	4%	9,2%	9%	12%
<b>Réaction sans ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	5,5%	3,1%	2,1%	2,8%	3,1%	3,1%

**Tableau 2.3.** Pourcentage d'amines dosées avec les MP<sub>NTA</sub> dans des solvants organiques en présence de 0,5 équivalents d'éthylènediamine, 0,5 équivalents d'EDC et d'HOBt par rapport aux acides

Parmi les différentes conditions testées, les pourcentages avec et sans agents de couplage sont très proches. Cependant, la condition dans le méthanol à une concentration de 3 mg/mL en MP<sub>NTA</sub> semble légèrement meilleure car c'est celle pour laquelle le pourcentage d'amine non spécifique est le plus faible, tout en possédant un taux de marquage important. A partir de là, nous avons fait varier les quantités d'agent de couplage dans le méthanol à 3 mg/mL en MP<sub>NTA</sub>. Les nombres d'équivalents en EDAC ont été augmentés de 0,5 équivalents en acides à 1, 2 et 4 équivalents. D'autre part, les nombres d'équivalents en HOBt ont également été variés, à 1, 2 et 4 équivalents (Entrée 4, Tableau 3.3) mais la purification sur Séphadex G-25 n'a pas été possible à cause de la précipitation du milieu réactionnel lors de la redissolution dans le tampon phosphate. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.3.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Nombres d'équivalent d'EDAC</b>	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq ou 2 eq ou 4 eq
<b>Nombres d'équivalent d'HOBt</b>	0,5 eq	0,5 eq	0,5 eq	1 eq ou 2 eq ou 4 eq
<b>Réaction avec ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	13%	16%	11%	-
<b>Réaction sans ADC % NH<sub>2</sub> par rapport aux acides des MP<sub>NTA</sub></b>	4,0%	4,0%	3,9%	-

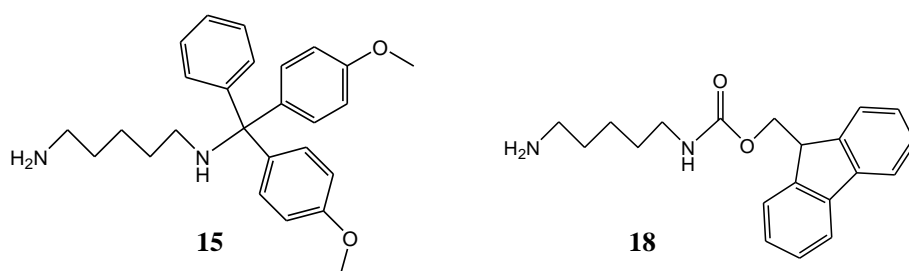
**Tableau 3.3.** Pourcentage d'amines dosées en fonction des quantités d'agents de couplage EDC et HOBt introduites dans le méthanol à 3 mg/mL en MP<sub>NTA</sub>



Les entrées 1, 2 et 3 du tableau montrent que les taux de fixation sont légèrement supérieurs à ceux obtenus précédemment, mais aucune évolution majeure n'est apparue. La condition choisie pour la suite de l'étude sera à 3 mg/mL en MP<sub>NTA</sub> dans le méthanol en présence de 0,5 équivalents d'EDAC/HOBt/NEt<sub>3</sub> et 1 équivalent d'amine. Il est à noter que dans ces conditions, le pourcentage total d'amine récupérée après la purification est de 70% par rapport à la quantité d'éthylènediamine introduite. Ce pourcentage est calculé grâce à la quantité d'amine qui n'a pas réagi, après chromatographie sur gel Sephadex et par dosage UV. Toute l'amine introduite n'a donc pas été récupérée. Or, chaque extrémité de la diamine pouvant réagir sur un acide des micelles, nous avons émis d'hypothèse qu'elles avaient pu réagir toutes les deux. Afin de remédier à ce problème, nous avons mis à réagir les micelles en présence d'une diamine monoprotégée puis nous les avons purifiées en solvant organique. La purification en solvant organique pourrait en effet permettre également de diminuer la quantité de liaisons non spécifiques.

#### I.2.4.b.β. Purification en milieu organique

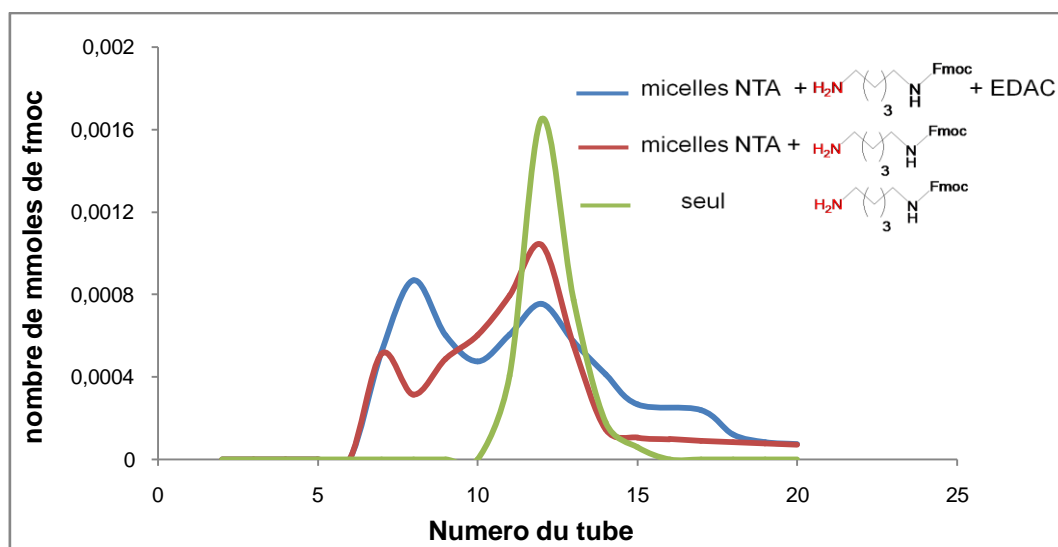
Afin de purifier les micelles en solvant organique, nous nous sommes tournés vers les gels Biobeads qui ont les mêmes propriétés d'exclusion stérique que les Séphadex milieu aqueux. Après réaction dans le méthanol, le milieu réactionnel est concentré puis redissous dans le THF, qui est un solvant plus adapté aux Biobeads. Le principe de purification reste identique : chaque tube est dosé en UV afin de calculer le nombre de groupements protecteurs sur les micelles. Le premier groupe protecteur envisagé est le diméthoxytrityle (DMT), qui est déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique. L'amine « mono-DMT » **15** a donc été synthétisée. (Figure 5.3)



**Figure 5.3.** Structures des diamines monoprotégées **15** et **18**

Les MP<sub>NTA</sub> ont ainsi été mise à réagir avec le composé **15** en présence d'agent de couplage mais la purification du milieu réactionnel sur gel Biobeads s'est révélée inefficace : tout le DMT de la réaction se trouvait dans les premiers tubes durant l'élution sur le gel. Cela signifie que tout le DMT était présent avec les micelles. Par la suite, l'élution de la diamine **15** permis de vérifier qu'elle était également éluée dans les premiers tubes.

Un autre groupement protecteur, le groupement (9-fluorénylméthyl)carbamate ou Fmoc a alors été envisagé car nous pouvons le déprotéger facilement en milieu basique pour libérer l'amine primaire.<sup>14</sup> L'éthylènediamine monoprotégée par un groupement Fmoc **18** (Figure 5.3) a donc été synthétisée puis mise à réagir avec les acides carboxyliques des MP<sub>NTA</sub>, en présence d'EDAC et d'HOBt mais sans triéthylamine car celle-ci est susceptible de déprotéger le Fmoc. Le mélange réactionnel est ensuite purifié et les profils d'élution sont établis par quantification du nombre d'amines fixées sur les micelles grâce un dosage UV du nombre de moles de groupements Fmoc. Le coefficient d'extinction du Fmoc a préalablement été calculé grâce à une courbe d'étalonnage:  $\varepsilon = 7965 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Les profils obtenus présentés dans la figure 6.3 sont comparables à ceux obtenus précédemment avec les Séphadex.



**Figure 6.3.** Profils d'éluion du couplage entre les micelles NTA et l'amine primaire mono-Fmoc

La courbe verte correspond à l'éluion de l'amine monoprotégée par le Fmoc pour laquelle un seul pic est présent entre les tubes 10 et 15. La courbe bleue correspondant à l'éluion du mélange réactionnel avec agent de couplage est composée de deux pics : le premier pic observé correspond à celui des  $MP_{NTA}$  contenant des amines tandis que le deuxième est celui de l'amine monoprotégée. Comme précédemment, la courbe rouge correspondant à la réaction contrôle sans agent de couplage présente les mêmes pics que la réaction avec agent de couplage. La quantification du nombre de Fmoc sur les  $MP_{NTA}$  indique que 10% des acides ont été couplés avec les amines. Cependant, 4,4% ont été détectés dans la réaction de contrôle. En conclusion, l'utilisation d'une diamine monoprotégée et la purification en milieu organique n'a pas permis d'améliorer la sélectivité du couplage.

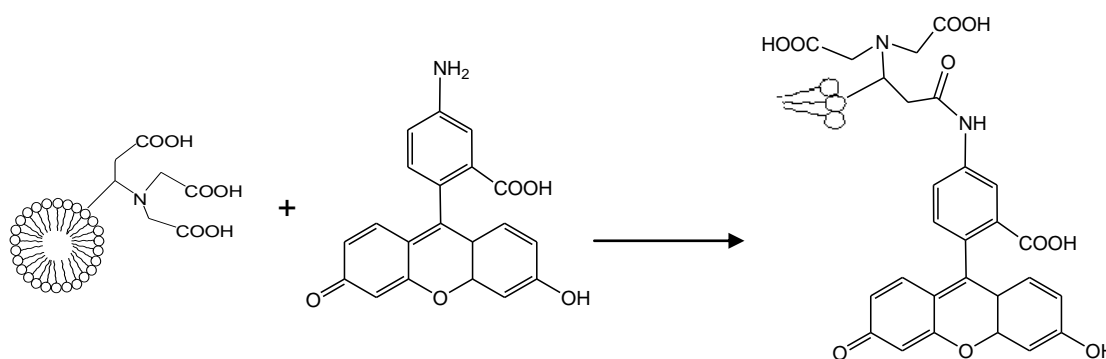
### I.2.5. Conclusion

De nombreuses conditions réactionnelles ont ainsi été testées pour fixer des amines sur les acides carboxyliques des  $MP_{NTA}$ . Cependant, les différents solvants testés ainsi que la variation des agents de couplage et de leur nombre d'équivalent n'ont pas permis d'obtenir un couplage spécifique.

## I.3. Etude de la fonctionnalisation par fixation de sonde fluorescente

### I.3.1. Principe

Le but de cette étude est de produire des  $MP_{NTA}$  fluorescentes, potentiellement utilisables en imagerie de fluorescence. La 5-aminofluorescéine a été choisie pour réaliser le couplage avec les acides carboxyliques des  $MP_{NTA}$  à cause de sa grande disponibilité commerciale. La fluorescéine que nous voulons coupler possède une structure très différente des petits composés couplés dans le cas de la fixation d'amines. Elle possède ainsi une solubilité différente, c'est pourquoi nous avons décidé d'essayer de la fixer de manière covalente sur les micelles et de tester les conditions réactionnelles en milieux aqueux et organiques. Le couplage est réalisé suivant le schéma présenté figure 7.3.



**Figure 7.3.** Schématisation de la fixation de la 5-aminofluorescéine sur les  $MP_{NTA}$

Le but de cette étude est de fixer un maximum de fluorescéine sur les micelles pour pouvoir étudier leur comportement sur cellules et *in vivo*. En effet, pour réaliser une expérience *in vivo*, il faut introduire sélectivement 3 nmoles de sonde fluorescente par injection.

### I.3.2. Etude des conditions de couplage

#### I.3.2.a. Couplage en milieu aqueux

Les  $MP_{NTA}$  ont été placées dans du tampon phosphate pH 7,4 (0,1 M) à une concentration de 1 mg/mL puis les agents de couplage ont été ajoutés, EDAC et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), avec le même nombre d'équivalent que la 5-aminofluorescéine. L'HOBt

précédemment utilisé a été remplacé par la DMAP, car la solubilité de cette dernière est plus grande en milieu aqueux. Après 14 heures d'agitation à température ambiante, la solution est purifiée sur Biospin 30. Le taux de fluorescéines fixées sur les MP<sub>NTA</sub> est ensuite calculé par dosage UV. Le calcul du coefficient d'extinction de la fluorescéine dans le tampon phosphate a ainsi été effectué :  $\epsilon = 72665 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Deux réactions témoins sont réalisées en parallèle pour attester le caractère spécifique de la réaction. Plusieurs quantités de fluorescéine ont été testées, avec des nombres équivalents en chaque agent de couplage et en fluorescéine égaux dans chaque expérience. Les milieux réactionnels sont purifiés sur des gels Biospin 30 qui sont des gels d'exclusion stériques spécifiques à la purification de particules marquées par des sondes fluorescentes. Le tableau 4.3 présente les taux de fixation obtenus pour les réactions avec ou sans Agent De Couplage (ADC) en fonction du nombre d'équivalents d'aminofluorescéine introduits.

<b>Nombre d'équivalent de fluorescéine et d'ADC</b>	1 eq	3 eq	4 eq	5 eq
<b>% fluorescéine avec ADC par rapport aux acides</b>	0,3%	2,6%	2,5%	5%
<b>% fluorescéine sans ADC par rapport aux acides</b>	0,1%	0,3%	0,3%	0,2%

**Tableau 4.3.** Pourcentages de fluorescéine dosés après réaction sur les MP<sub>NTA</sub> dans le tampon phosphate pH 7,5 en fonction du nombre d'équivalent de 5-aminofluorescéine introduits en présence d'EDAC et de DMPA

Les taux de fluorescéine dosée sont compris entre 0,3% et 5%. Ces pourcentages correspondent à des nombres de moles de fluorescéine compris entre 7,4 nmoles et 123 nmoles. Ainsi, ces micelles contiennent assez de sonde fluorescente pour être testées *in vivo*.

De plus, le pourcentage sans agent de couplage est beaucoup plus faible que lors de la fixation d'amines, pour laquelle il était de 3,9% (Paragraphe I.2.4.a). Toutefois, ce pourcentage est statistique, vu le peu de différence observé entre les réactions. Ces conditions de couplage nous ont donc permis de fixer une grande quantité de fluorescéine, mais nous avons souhaité réaliser le même couplage en milieu organique, dans le méthanol, afin de vérifier si le marquage non spécifique pouvait être totalement supprimé.

### I.3.2.b. Couplage en milieu organique

Les MP<sub>NTA</sub> ont été placées dans du méthanol à une concentration de 3 mg/mL puis les agents de couplage ont été ajoutés (EDAC/HOBt : 0,5 eq) et la 5-aminofluorescéine. Après 14 heures d'agitation à température ambiante, la solution est concentrée, redissoute dans du tampon phosphate pH 7,4 et purifiée sur Biospin 30. Le nombre de fluorescéines fixées sur les MP<sub>NTA</sub> est ensuite calculé par dosage UV. Deux réactions témoins sont toujours réalisées en parallèle pour attester le caractère spécifique des réactions. Différentes quantités d'aminofluorescéine ont été testées afin d'optimiser le marquage. (Tableau 5.3)

<b>Nombre d'équivalent de fluorescéine</b>	0,6 eq	0,8 eq	1 eq
<b>% fluorescéine avec ADC par rapport aux acides</b>	2%	3,8%	2,8%
<b>% fluorescéine sans ADC par rapport aux acides</b>	0,4%	0,4%	0,2%

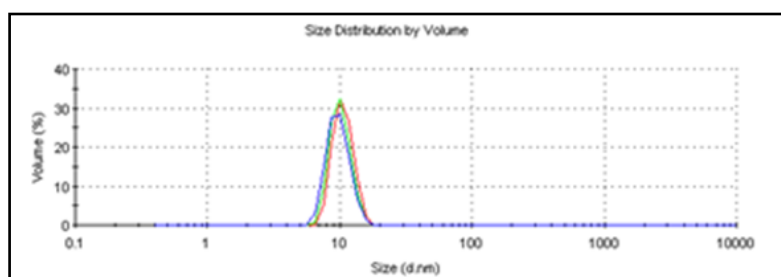
**Tableau 5.3.** Pourcentages de fluorescéine dosés après réaction dans le méthanol sur les MP<sub>NTA</sub> en fonction du nombre d'équivalents introduits en présence de 0,5 équivalents d'EDC et d'HOBt

La réaction en milieu organique permet de récupérer autant de fluorescence avec moins de 1 équivalent de fluorescéine qu'avec 3 équivalents en milieu aqueux. Cependant, la fluorescéine est toujours présente dans la réaction sans agent de couplage. Les micelles dosées avec 2% de

fluorescéine seront nommées  $MP_{NTA-Fluo}$ . Nous les avons ensuite été analysées en DLS et en spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) afin de déterminer si elles étaient suffisamment propres pour être testées sur des cellules. En effet, pour être testées, les micelles doivent se présenter comme une population unique, ce que nous allons vérifier par DLS et la FCS puisque ces méthodes permettent, par des moyens de détection différents, de déterminer la répartition en taille des micelles marquées.

### I.3.2.c. Analyse par DLS et par spectroscopie de corrélation de fluorescence des $MP_{NTA-Fluo}$

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la DLS est souvent utilisée pour déterminer le diamètre de micelles. Nous avons donc analysé les micelles marquées  $MP_{NTA-Fluo}$  par DLS à une concentration de 0,02 mg/mL. (Figure 8.3)



**Figure 8.3.** Analyse DLS des  $MP_{NTA-Fluo}$  avec 2% de fluorescéine 0,2 mg/mL

Les diamètres obtenus sont de  $9,8 \pm 0,8$  nm. Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles avant marquage ( $6,7 \pm 0,5$  nm), à cause d'une légère agrégation due à la présence des fluorescéines.

L'analyse de spectroscopie de corrélation de fluorescence ou FCS permet de mesurer l'intensité de fluorescence et d'analyser ses fluctuations. Dans cette analyse, le temps de corrélation mesuré dépend de la taille des particules en solution. Ainsi, cela permet de

déterminer si ce sont bien les micelles elles-mêmes qui sont marquées. Les micelles  $MP_{NTA-Fluo}$  marquées se sont révélées être composées de deux populations différentes : la première avec un temps de corrélation court (0,034 ms) et la seconde avec un temps de corrélation long (3,9 ms). Le temps court correspond à celui de la fluorescéine seule en solution (0,03 ms) mais il pourrait aussi correspondre à un lipide marqué qui n'a pas été polymérisé et qui est en équilibre dynamique avec les micelles polymérisées. Le temps long donne des rayons de 29 nm. Cette valeur est très élevée par rapport à celle calculées par DLS (9,8 nm). La différence entre la DLS et la FCS montre que les micelles ne sont pas bien dispersées en solution, peut-être à cause d'une agrégation provoquée par la fluorescéine. L'analyse de FCS aurait détecté la présence de plusieurs populations contrairement à la DLS, grâce à la plus grande précision de l'analyse.

Les  $MP_{NTA-Fluo}$  ne se présentent donc pas comme une population unique ce qui nous indique que le marquage de surface sur les  $MP_{NTA}$  ne pourra pas être utilisé pour étudier le comportement des micelles sur des cellules. En effet, si nous exposons des cellules aux  $MP_{NTA-Fluo}$ , nous ne saurions pas si nous regardons la fluorescence due aux micelles ou la fluorescence due aux lipides marqués en équilibre avec les micelles, ou encore à celle de la fluorescéine seule.

Nous avons envisagé que le problème pouvait venir de la nature des  $MP_{NTA}$  et de sa tête polaire, qui a besoin d'un pH légèrement basique pour être parfaitement soluble et sur laquelle le couplage peptidique a l'air problématique. En effet, les  $MP_{NTA}$  possèdent trois acides par amphiphile et sont peut-être trop encombrées vis-à-vis du couplage. Nous avons alors voulu synthétiser des amphiphiles présentant un seul acide sur leur tête polaire. Ainsi, nous nous sommes tournés vers un autre type de micelles constituées de têtes polaires polyéthylène-glycol. Cependant, si le lipide marqué non polymérisé perturbe effectivement l'analyse, nous aurions pu envisager de l'éliminer en augmentant le temps de polymérisation



des micelles ou en fonctionnalisant la surface de micelles polymérisables et réticulables, constituées d'amphiphiles semblables à ceux présentés dans le chapitre 2, paragraphe III.

## II. Etude de la fonctionnalisation externe des micelles possédant une tête polyéthylèneglycol

Suite à notre étude sur les  $MP_{NTA}$ , nous avons décidé de synthétiser des micelles munies d'une tête polyéthylène glycol dont la solubilité en milieu aqueux neutre sera plus grande que celles des  $MP_{NTA}$ . Les nouvelles micelles que nous voulons réaliser doivent également contenir des acides carboxyliques sur leurs têtes polaires, qui pourront être couplées à une sonde fluorescente. Pour cela, nous avons synthétisé les amphiphiles **23** et **25**. (Figure 9.3)

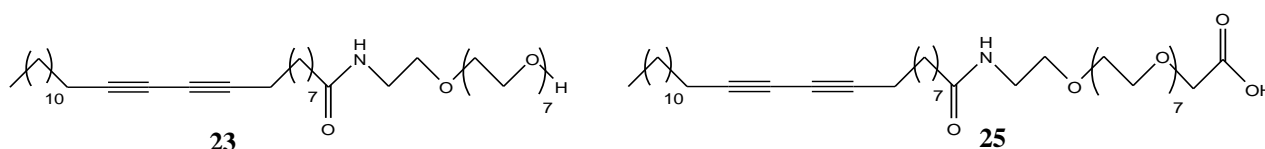


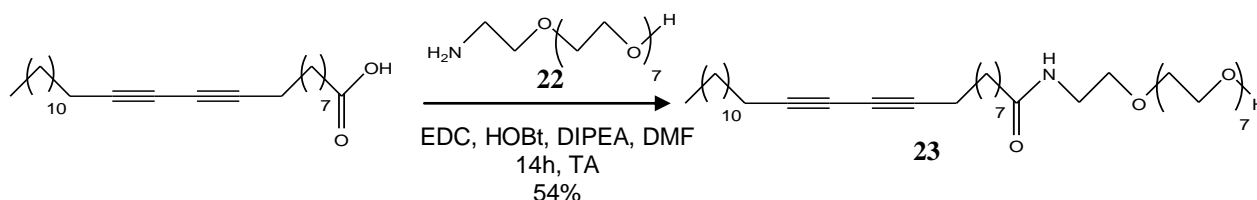
Figure 9.3. Structures des amphiphiles **23** et **25**

Nous allons tout d'abord étudier les micelles constituées uniquement de l'amphiphile **23** en DLS, MET et calculer la valeur de leur CMC. Avant polymérisation, ces micelles seront respectivement notées  $MNP_{PEG-OH}$  et  $MP_{PEG-OH}$  après polymérisation. Par la suite, les micelles de l'amphiphile **25** seront étudiées par les mêmes techniques. Avant polymérisation, elles seront notées  $MNP_{PEG-acide}$  et  $MP_{PEG-acide}$  après polymérisation. Dans un troisième paragraphe, nous étudierons les micelles formées d'un mélange 50/50 massique des amphiphiles **23** et **25**, qui seront notées  $MNP_{PEG-mixte}$  avant polymérisation et  $MP_{PEG-mixte}$  après polymérisation.

## II.1. Synthèse et caractérisation des micelles formées de l'amphiphile **23** avant et après polymérisation

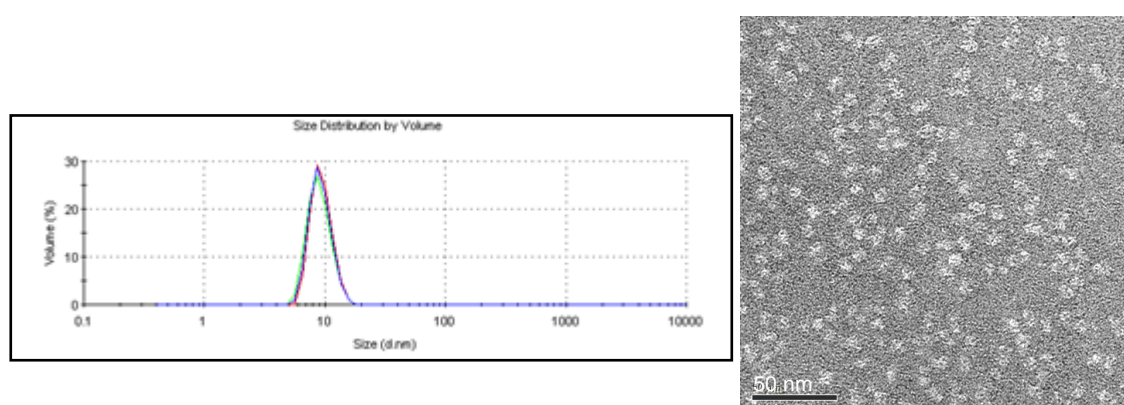
### II.1.1. Synthèse de l'amphiphile **23** et formation des $MNP_{PEG-OH}$

Pour la synthèse de l'amphiphile **23**, nous avons choisi une tête polaire contenant 8 unités polyéthylène glycol, de sorte à rendre les micelles suffisamment solubles en milieu aqueux neutre. L'amphiphile **23** a donc été synthétisé par couplage entre l'acide 10,12-pentacosadinoïque et l'octaéthylène glycol portant une amine primaire **22**, produit de la même façon que le dérivé d'hexaéthylène glycol décrit dans la figure 22.2 du chapitre précédent. (Figure 10.3)



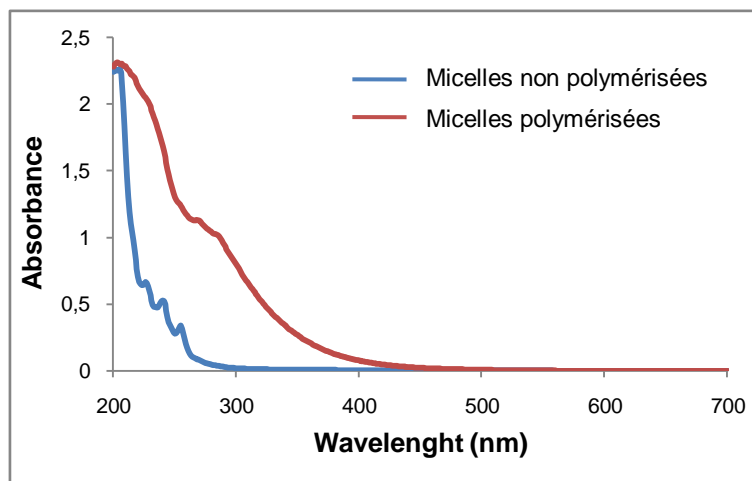
**Figure 10.3.** Schéma de synthèse de l'amphiphile **23**

L'amphiphile **23** est dissous dans de l'eau MilliQ à 5 mg/mL puis soniqué pendant 30 minutes au bain à ultra-sons pour former des micelles  $MNP_{PEG-OH}$  analysées en DLS et en MET, possédant un diamètre de  $9,3 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$  et une forme sphérique. (Figure 11.3)



**Figure 11.3.** Analyse en DLS (5 mg/mL dans l'eau) et en TEM (0,1 mg/mL dans l'eau) des  $MNP_{PEG-OH}$

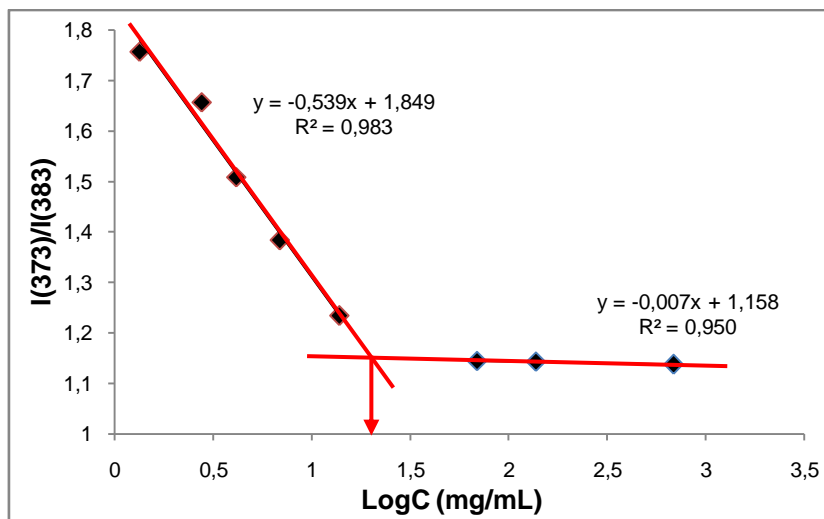
Les micelles sont ensuite photopolymérisées 10 heures dans le four UV afin de produire des  $MN_{PEG-OH}$ . Les spectres d'absorbance présentés dans la figure 12.3 montrent la formation des liaisons conjuguées ene-yne dans les micelles.



**Figure 12.3.** Spectres d'absorption des micelles avant et après photo-polymérisation à 1 mg/mL dans l'eau

### II.1.2. Détermination de la concentration micellaire critique des $MN_{PEG-OH}$

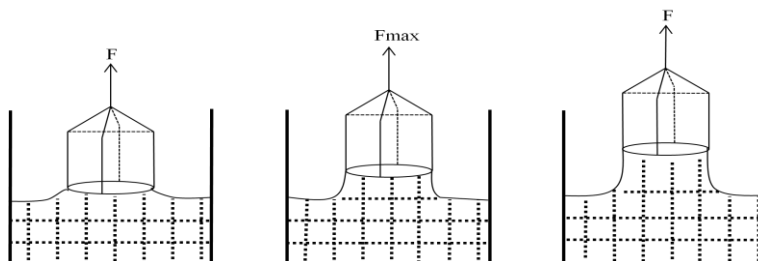
Les  $MN_{PEG-OH}$  ont ensuite été caractérisées par la détermination de leur CMC. Cette dernière a été calculée à partir de deux méthodes différentes : les spectres d'émission de fluorescence du pyrène et la méthode de l'anneau de Nouy. Les deux méthodes ont été réalisées afin de pouvoir valider les valeurs trouvées uniquement par la méthode du pyrène. Pour ces  $MN_{PEG-OH}$ , la CMC après polymérisation n'a pas été calculée, car nous savons qu'elle sera beaucoup plus faible que celles des micelles non polymérisées et que la valeur ne sera pas exacte. La figure 15.3 représente la courbe  $I_{373}/I_{383} = f(C)$  issue de l'émission du pyrène en présence de concentrations différentes en micelles.



**Figure 15.3.** Courbes représentant le ratio des intensités de fluorescence en présence de pyrène ( $I_{373}/I_{383}$ ) en fonction de la concentration en  $MNP_{PEG-OH}$

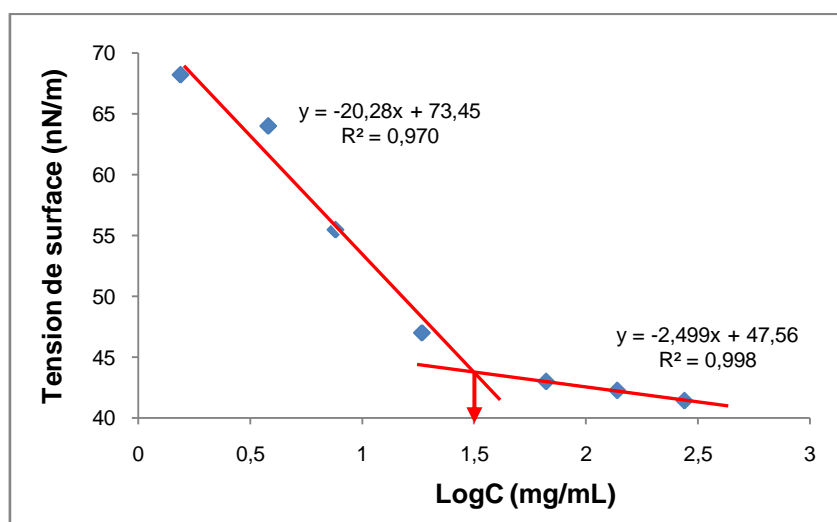
La CMC est calculée à l'intersection des deux tangentes et donne une valeur de 14,6 mg/L ou 20,1  $\mu$ M. Nous remarquons que cette valeur est très proche de celle trouvée pour les  $MNP_{NTA}$  (15 mg/L), malgré la grande différence entre les têtes polaires des amphiphiles.

La méthode de l'anneau de Nouy consiste quant à elle, à mesurer la tension superficielle de solutions de micelles à des concentrations différentes. Elle est basée sur la mesure de la force capillaire qu'exerce un liquide sur un anneau immergé. Un anneau en platine-iridium est ainsi immergé juste au-dessous de l'interface. Après équilibre en température, l'anneau est tiré de l'interface en abaissant le plateau du tensiomètre. (Figure 16.3). Durant ce déplacement, on mesure le poids (force) du film de liquide soulevé par l'anneau en fonction du temps. Cette force est enregistrée directement sous forme de "tension", en mN/m, grâce à un étalonnage préalable avec un objet dont le poids est connu avec précision.



**Figure 16.3.** Schématisation de l'anneau tirant un film de liquide pour en mesurer le poids

La force atteinte a une valeur maximum  $F_{max}$  qui sert à calculer la tension superficielle du liquide. Au-delà de cette valeur, le point de rupture est proche, mais ne doit pas être atteint, afin de conserver l'équilibre thermodynamique du film. Cette méthode a cependant des inconvénients, comme la présence de l'anneau, un corps étranger, à l'interface, la détermination d'un facteur de correction ou encore le volume important de l'échantillon de 20 mL minimum. La courbe obtenue est représentée dans la figure 17.3.



**Figure 17.3.** Représentation de la valeur de la tension superficielle des solutions de  $MNP_{PEG-OH}$  dans l'eau MilliQ à différentes concentrations

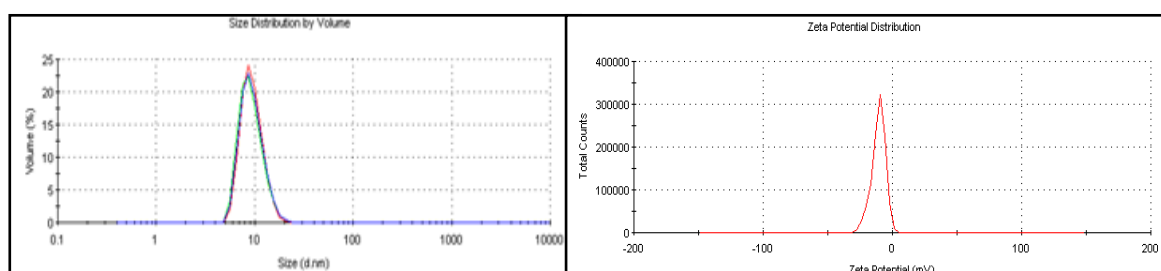
La partie gauche de la courbe voit la valeur de la tension superficielle diminuer avec l'augmentation de la concentration en micelles car les molécules se placent à l'interface eau/air avec une concentration toujours plus forte. Au point d'inflexion, les micelles commencent à se former puis la partie droite de la courbe correspond à une zone palier où la tension superficielle ne varie plus et où les micelles sont présentes en solution. Le point d'intersection entre les deux tangentes correspond à la CMC de l'amphiphile.

Grâce à cette technique, la CMC trouvée est de 21,09 mg/L ou 29,05  $\mu$ M. La valeur est proche de celle trouvée par l'émission de fluorescence du pyrène.

## II.1.3. Formation et analyses des micelles polymérisées $MP_{PEG-OH}$

### II.1.3.a. Analyse de DLS, MET et potentiel Zeta

Les analyses de diffusion de lumière et de microscopie des micelles polymérisées, réalisées dans les mêmes conditions que pour les micelles non polymérisées, révèlent qu'aucun changement majeur n'est apparu lors de la polymérisation. En effet, le diamètre des micelles polymérisées est de  $9.4 \text{ nm} \pm 1.2 \text{ nm}$  et les images de MET réalisées montrent toujours des structures sphériques. D'autre part, le potentiel Zeta des  $MNP_{PEG-OH}$  a été déterminé. Le potentiel Zeta est fréquemment utilisé pour déterminer le degré de charge de la surface des nanoparticules. Un potentiel Zeta négatif signifiera que la charge globale de la surface est négative. (Figure 13.3)



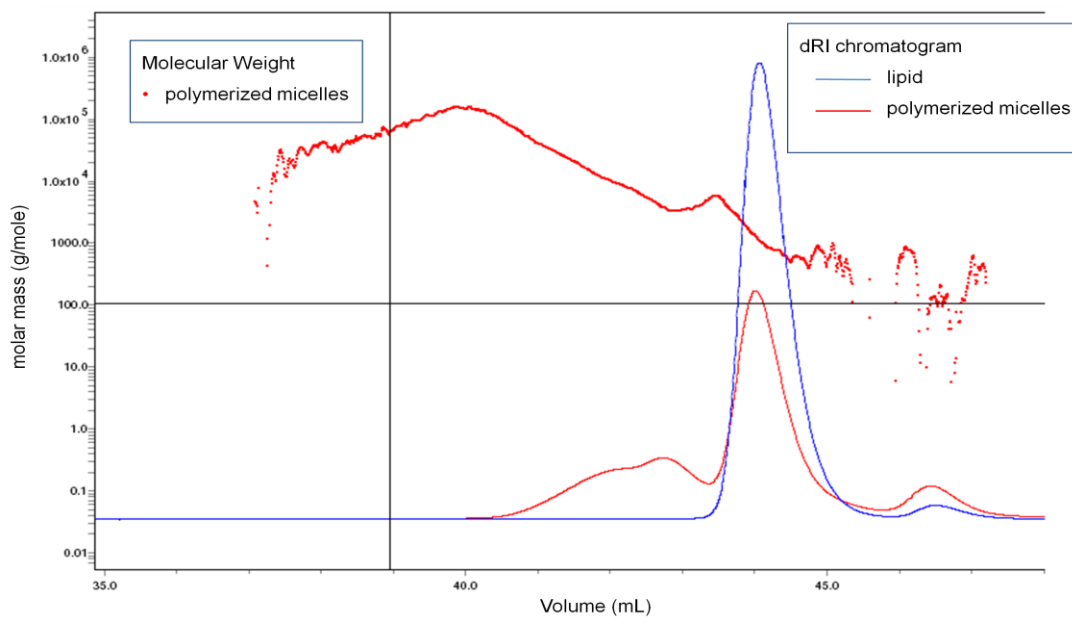
**Figure 13.3.** Analyse en DLS et potentiel Zeta des  $MP_{PEG-OH}$  (5mg/mL dans l'eau)

Le potentiel Zeta des  $MP_{PEG-OH}$  est légèrement négatif et constitué d'une seul pic à - 10 mV. Ce résultat est assez surprenant car comme la surface des micelles est constituée de polyéthylène glycol neutre, nous nous attendions à trouver un potentiel Zeta nul.

### II.1.3.b. Chromatographie d'exclusion stérique

Les  $MNP_{PEG-OH}$  et  $MP_{PEG-OH}$  ont ensuite été caractérisées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) afin de confirmer la formation de chaînes de polymères. La SEC a été réalisée en solution dans le THF dans les mêmes conditions décrites dans le chapitre précédent pour les  $MP_{NTA}$ . Pour les  $MNP_{PEG-OH}$ , la courbe issue de l'analyse réfractométrique (Figure 14.3,

courbe bleue) révèle une population principale (96% en masse), possédant une masse molaire absolue de 1600 g/mole par combinaison avec la diffusion de lumière. Cette valeur est supérieure à la masse molaire théorique de 726 g/mole, certainement à cause de la présence de quelques gros agrégats toujours présents en solution dans le THF.



**Figure 14.3.** Analyse SEC/MALS des  $MNP_{PEG-OH}$  et des  $MP_{PEG-OH}$

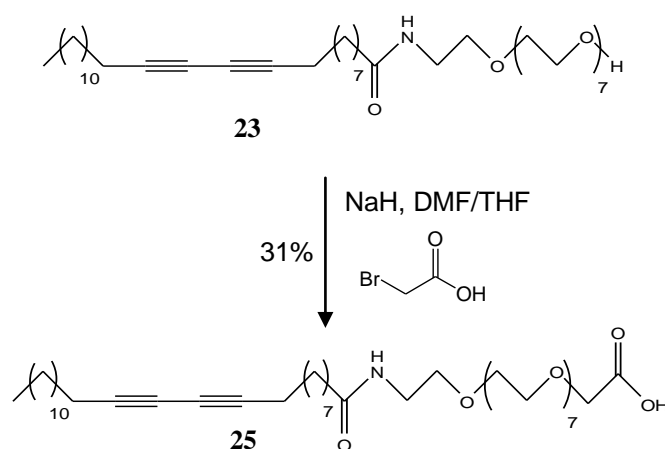
En ce qui concerne les  $MP_{PEG-OH}$ , l'analyse réfractométrique montre l'apparition d'un nouveau pic (65% en masse) entre les volumes d'élution 40 et 43 mL. Le pic de l'amphiphile de départ n'a cependant pas complètement disparu (35% en masse) ce qui montre une polymérisation incomplète, contrairement à l'analyse réalisée pour les  $MP_{NTA}$ . Cette différence peut être expliquée par la différence du mode de polymérisation. En effet, les micelles NTA avaient été polymérisées sous une lampe d'une puissance de 1000 Watt pendant 45 minutes, et l'analyse par diffusion de lumière avait révélé la présence de très grosses masses molaires, jusqu'à 2 000 000 g/mole. Pour les  $MP_{PEG-OH}$ , la polymérisation a eu lieu dans un four UV de 48 W pendant 10 heures : elle est plus simple à mettre en place, car elle ne nécessite pas un refroidissement en continu. Les deux méthodes de polymérisation

aboutissant aux mêmes spectres d'absorbance, nous en avons déduit que la polymérisation pendant 45 minutes sous lampe ou 10 heures dans le four induisaient à la même efficacité de polymérisation. Il semble cependant ici qu'il y ait une différence entre les analyses SEC des  $MP_{PEG-OH}$  polymérisées au four et des  $MP_{NTA}$  polymérisées sous la lampe. La courbe  $(M_w) = f(V_e)$  des micelles  $MP_{PEG-OH}$  est très linéaire, (Figure 14.3) en comparaison avec celle des  $MP_{NTA}$ , ce qui montre que très peu d'agrégats sont présents dans l'échantillon. Cette polymérisation au four UV ne conduit donc pas totalement à la polymérisation des amphiphiles dans les micelles, mais permet d'éviter la formation de très gros agrégats qui perturbent l'analyse et compliquent l'interprétation des résultats. Ainsi, on peut déterminer la masse molaire moyenne des  $MP_{PEG-OH}$  étant de 14 120 g/mole, ce qui signifie que les chaînes de polymères au sein des micelles sont constituées d'environ 9 unités de monomères.

## II.2. Synthèse et caractérisation des micelles formées de l'amphiphile **25** avant et après polymérisation

### II.2.1. Synthèse de l'amphiphile **25** et formation des $MNP_{PEG-acide}$

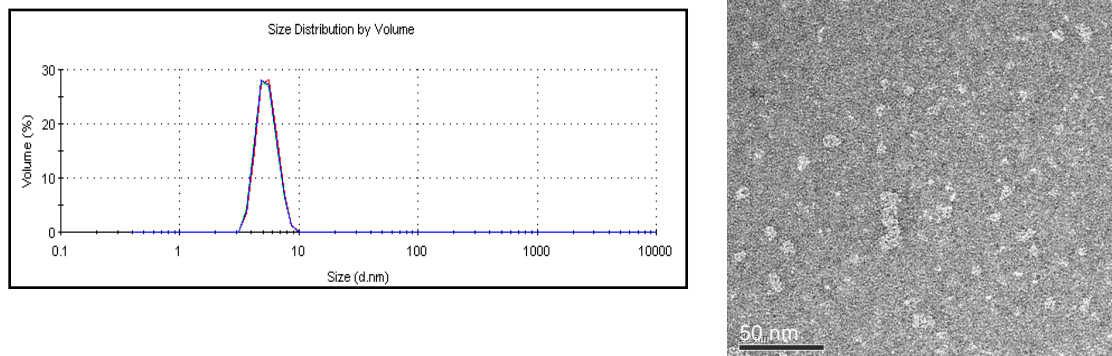
L'amphiphile **25** est synthétisé à partir de l'amphiphile **23** par réaction entre l'alcool terminal et l'acide bromoacétique. (Figure 18.3)



**Figure 18.3.** Synthèse de l'amphiphile PEG-acide **25** à partir de l'amphiphile **23**



L'amphiphile **25** est dissous à 5 mg/mL dans de l'eau MilliQ. et soniqué 30 minutes au bain à ultra-sons. Les micelles ainsi obtenues sont analysées en DLS et leur forme est étudiée en MET. (Figure 19.3)

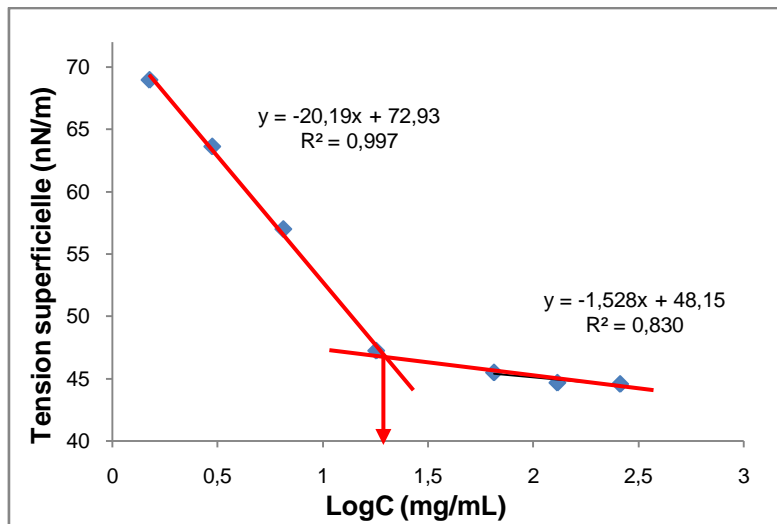


**Figure 19.3.** Analyses DLS (5 mg/mL dans l'eau) et MET des  $MNP_{PEG-acide}$  (0,1 mg/mL dans l'eau)

Les mesures de DLS révèlent que les  $MNP_{PEG-acide}$  ont un diamètre de  $5,4 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$  et une forme sphérique en MET. Nous pouvons remarquer que ces micelles ont une taille un peu plus petite que les  $MNP_{PEG-OH}$ .

### II.2.2. Détermination de la concentration micellaire critique des $MNP_{PEG-acide}$

La CMC des micelles  $MNP_{PEG-acide}$  a été déterminée par la méthode de l'anneau de Nouy. La courbe obtenue est présentée dans la figure 21.3.



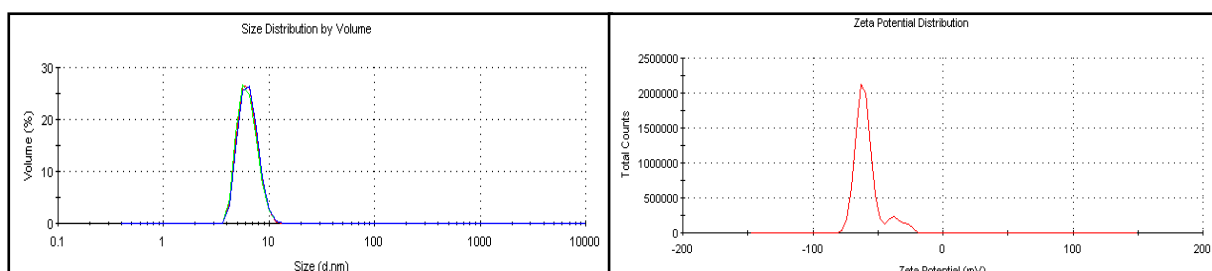
**Figure 21.3.** Représentation de la valeur de la tension superficielle des solutions de  $MNP_{PEG-acide}$  dans l'eau

La valeur trouvée à l'intersection des deux tangentes donne une valeur de la CMC de 16,70 mg/L. Cette valeur est très proche de celle des  $MNP_{PEG-OH}$ , ce à quoi nous nous attendions à cause de leurs structures très proches.

### II.2.3. Formation et analyse des micelles polymérisées $MP_{PEG-acide}$

Les micelles  $MNP_{PEG-acide}$  sont ensuite photopolymérisées 10 heures dans le four UV pour obtenir les  $MP_{PEG-acide}$ . Elles sont caractérisées par DLS et leur potentiel Zeta est déterminé.

(Figure 20.3)



**Figure 20.3.** Analyses DLS et potentiel Zeta des  $MP_{PEG-acide}$  à 5mg/mL dans l'eau

Le diamètre des  $MP_{PEG-acide}$  est de  $6,5 \pm 0,6$  nm tandis que leur potentiel Zeta est composé de deux pics, avec un pic majoritaire à - 61 mV (89%) et un minoritaire à - 35 mV (11%). Le

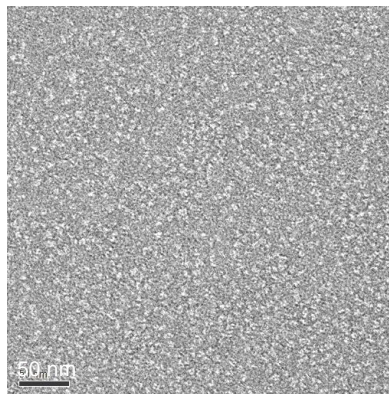
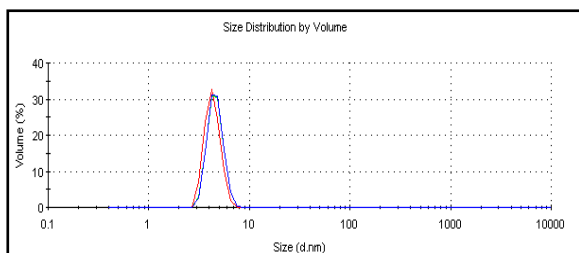
potentiel Zeta est négatif à cause des acides carboxyliques déprotonés à la surface des micelles. ( $pK_a \approx 3,5$ )

Les amphiphiles **23** et **25** ont donc été auto-arrangés individuellement en solution aqueuse neutre sous forme de micelles sphériques pour former les  $MNP_{PEG-OH}$  et les  $MNP_{PEG-acide}$ . Avant polymérisation, les  $MNP_{PEG-OH}$  ont des diamètres de 9,4 nm et les  $MNP_{PEG-acide}$  des diamètres plus petits de 5,4 nm. Après polymérisation, leurs diamètres ne varient presque pas, ils sont respectivement de 9,4 nm et 6,4 nm. D'autre part, leurs potentiels Zeta ont été mesurés et se sont révélés légèrement négatif pour les  $MNP_{PEG-OH}$  (- 10 mV) et composé d'un pic négatif majoritaire à - 61 mV pour les  $MNP_{PEG-acide}$ . A présent, nous allons former des micelles mixtes des amphiphiles **23** et **25** et réaliser les mêmes analyses que pour les micelles simples.

### II.3. Synthèse et caractérisation des micelles mixtes formées des amphiphiles **23** et **25** avant et après polymérisation

#### II.3.1. Formation et analyses des micelles mixtes $MNP_{PEG-mixtes}$

Les amphiphiles **23** et **25** sont dissous à une concentration totale de 5 mg/mL dans du tampon phosphate pH 7,4 avec un ratio 50% en masse. La similarité de structure entre les deux amphiphiles nous a permis d'émettre l'hypothèse que les micelles formées sont mixtes, c'est-à-dire avec une répartition statistique des amphiphiles dans les micelles. Les diamètres des  $MNP_{PEG-mixtes}$  obtenus en DLS sont de  $4,6 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$ , comparables à ceux des  $MNP_{PEG-acide}$  ( $4,9 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ ). Les micelles mixtes possèdent donc un diamètre plus proche de celui des  $MNP_{PEG-acide}$  que de celui des  $MNP_{PEG-OH}$ . (Figure 22.3)

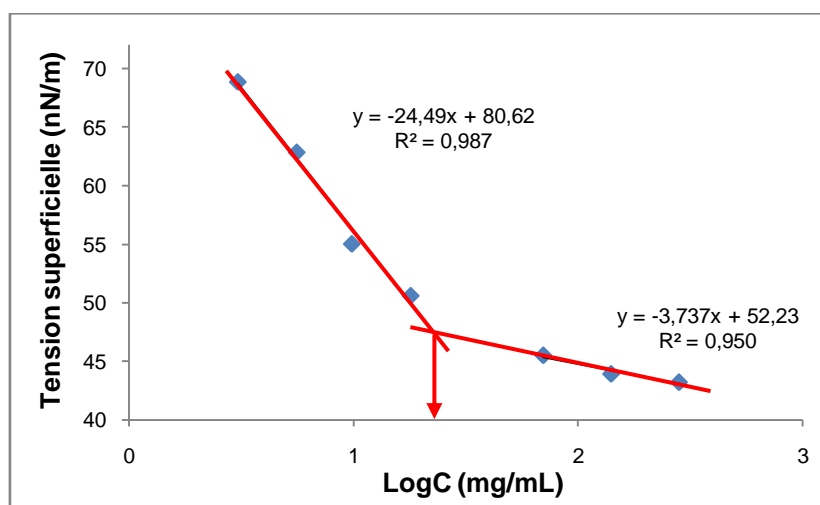


**Figure 22.3.** Analyses DLS (5 mg/mL dans l'eau) et MET (0,5 mg/mL dans l'eau) des  $MNP_{PEG-mixte}$

D'autre part, les images de MET montrent la présence de micelles sphériques.

### II.3.2. Détermination de la concentration micellaire critique des micelles mixtes $MNP_{PEG-acide}$

Les CMC de l'amphiphile  $PEG_{acide}$  et des amphiphiles mixtes ont été déterminées par la méthode de l'anneau de Nouy. Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 24.3.



**Figure 24.3.** Représentation de la valeur de la tension superficielle des solutions de  $MNP_{PEG-mixte}$  dans l'eau à différentes concentrations

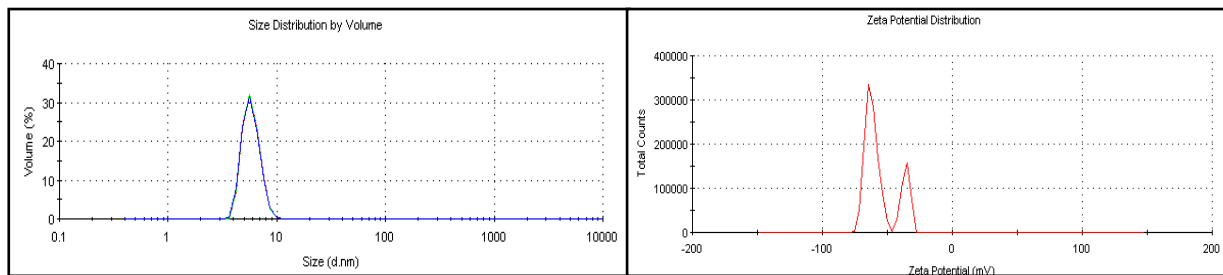
L'intersection des tangentes donne la valeur de la CMC : 17,60 mg/L. Avec cette méthode, on voit que la valeur de la CMC des  $MNP_{PEG-mixtes}$  est comprise entre la CMC des  $MNP_{PEG-OH}$  (21,09 mg/L) et la CMC des  $MNP_{PEG-acide}$  (16,70 mg/L).

### II.3.3. Formation et analyses des micelles mixtes polymérisées

#### MP<sub>PEG-mixtes</sub>

Les micelles MNP<sub>PEG-mixtes</sub> sont ensuite photopolymérisées 10 heures dans le four UV pour fournir des MP<sub>PEG-mixtes</sub>. Comme pour les autres types de micelles, la photopolymérisation de 10 heures au four UV n'induit pas de changement de taille des micelles mixtes par DLS :

5,8 nm ± 0,5 nm. (Figure 23.3)



**Figure 23.3.** Analyses DLS et potentiels Zeta des MP<sub>PEG-mixtes</sub> (23/25 : 50/50 en masse) à 5 mg/mL dans l'eau

En ce qui concerne le potentiel Zeta, il ne montre pas une population unique. En effet, deux populations sont présentes : une majoritaire à - 62,2 mV (60%) et une minoritaire à - 36,1 mV (40%). Nous pouvons observer que le pic correspondant aux MP<sub>PEG-OH</sub> n'apparaît pas à - 10 mV, ce qui signifie que les amphiphiles se sont mélangés dans le pic à - 36,1 mV, même si la présence du pic à - 62,2 mV indique que les MNP<sub>PEG-acide</sub> existent également en solution. La répartition des amphiphiles n'est donc pas parfaitement homogène à cause des équilibres dynamiques toujours présents dans ces systèmes.

## II.4. Etude de la fonctionnalisation de surface des micelles mixtes polymérisées MP<sub>PEG-mixte</sub>

### II.4.1. Etude des conditions de couplage

Les MP<sub>PEG-mixtes</sub> formées comportent au total 50% d'acides carboxyliques et 50% d'alcools, avec une distribution non aléatoire, à une concentration totale de 5 mg/mL. La présence des acides permet d'envisager des couplages avec des amines primaires, et notamment la

5-aminofluorescéine. Nous avons donc testé la fonctionnalisation de surface des  $MP_{PEG-mixte}$ , en premier lieu en tampon phosphate pH 8, afin d'étudier la réactivité en solution aqueuse et d'assurer une bonne déprotonation des acides. Nous avons choisi les conditions réactionnelles en milieu aqueux afin de pouvoir comparer les taux de fixations avec ceux obtenus dans le cas des  $MP_{NTA}$  dans le paragraphe I.3.2.a. Une solution de  $MP_{PEG-mixte}$  à 5 mg/mL dans le tampon phosphate a été mise à réagir en présence de différentes quantités d'agents de couplage (EDAC/DMAP) et de 5-aminofluorescéine. Le mélange est ensuite purifié sur un gel Biospin30. Des réactions contrôles sans agents de couplage (ADC) sont effectuées pour chaque condition réactionnelle. Les pourcentages de fluorescéines dosées sont regroupés dans le tableau 6.3 où les nombres d'équivalents sont calculés en fonction du nombre d'acides sur les micelles.

<b>Nombre d'équivalent de fluorescéine</b>	2 eq	2,5 eq	3 eq	6 eq
<b>Nombre d'équivalent d'agents de couplage (EDC/DMAP)</b>	1 eq	1,5 eq	1,5 eq	3 eq
<b>% fluorescéine avec ADC par rapport aux acides</b>	1%	1,7%	3,5%	14%
<b>% fluorescéine sans ADC par rapport aux acides</b>	0,3%	0,3%	0,4%	0,7%

**Tableau 6.3.** Pourcentages de fluorescéine dosés après réaction sur les  $MP_{PEG-mixte}$

Nous observons ainsi que l'on peut fixer de 1% à 14% de fluorescéine sur les  $MP_{PEG-mixte}$ , avec cependant des réactions contrôles qui montrent toujours la présence de fluorescéine dont la présence est statistique et ne dépend pas des réactions. D'autre part, si l'on compare les taux de fluorescéine récupérée par réaction sur les  $MP_{PEG-mixte}$  et sur les  $MP_{NTA}$  pour le même

nombre d'équivalent de fluorescéine introduite, ceux-ci sont peu différents. Le tableau 7.3. indique les taux de fixation obtenus pour les deux types de micelles et pour le même nombre d'équivalent de fluorescéine introduite.

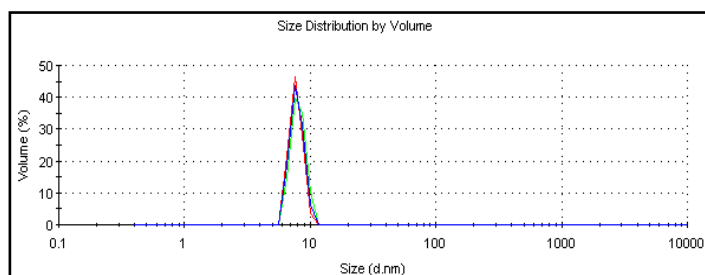
Type de micelles	MP <sub>PEG-mixte</sub>	MP <sub>NTA</sub>
Nombre d'équivalent de fluorescéine	3 eq	3 eq
% fluorescéine avec ADC par rapport aux acides	3,5%	2,6%
% fluorescéine sans ADC par rapport aux acides	0,4%	0,3%

**Tableau 8.3.** Pourcentage de fluorescéine dosée par réaction sur les MP<sub>PEG-mixte</sub> et les MP<sub>NTA</sub>

Ainsi, le taux de fixation de la fluorescéine sur les MP<sub>PEG-mixtes</sub> n'est pas beaucoup plus grand que obtenu sur les MP<sub>NTA</sub>. D'autre part, comme les MP<sub>NTA</sub> possèdent 3 acides carboxyliques sur chaque amphiphile, nous avons même fixé plus de fluorescéine sur la surface des MP<sub>NTA</sub> que sur la surface des MP<sub>PEG-mixtes</sub>.

#### II.4.2. Analyse par DLS et par spectroscopie de corrélation de fluorescence

La solution de MP<sub>PEG-mixte</sub> à 1,7% de fluorescéine, appelée MP<sub>PEG-fluo</sub> a été choisie pour réaliser les mesures de DLS et de FCS, car c'est dans celle-ci que l'on devrait trouver en moyenne un fluorophore par micelles et pour laquelle la qualité des mesures devrait être optimum. L'analyse des MP<sub>PEG-fluo</sub> en DLS montre une population d'un diamètre de 7,9 nm ± 0,5 nm. (Figure 25.3)



**Figure 25.3.** Analyse DLS des  $MP_{PEG-fluo}$  avec 1,7% de fluorescéine à 0,1 mg/mL dans tampon phosphate pH 8

Le diamètre des micelles obtenues est donc légèrement supérieur à celui des  $MP_{PEG-fluo}$  avant fonctionnalisation ( $5,8 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ ). On peut cependant dire que la structure des micelles a été conservée et que la présence des fluorescéines n'a induit qu'une légère agrégation des  $MP_{PEG-mixte}$ . Les analyses par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ont révélé deux temps de corrélation différents : un temps court à 0,034 ms et un temps long à 0,47 ms. Le temps court est le même que pour celui détecté avec les  $MP_{NTA-fluo}$ . Par contre, le temps long correspond à des particules de 2,9 nm de rayon, ce qui est plus faible que la valeur trouvée en DLS, mais pourrait correspondre à des micelles marquées de façon spécifique. Cependant, la population au temps de corrélation court (0,034 ms) représente 50% des espèces détectées en solution. Cette deuxième population a été attribuée soit à de la fluorescéine libre, soit à des lipides marqués libres en solution qui seraient en équilibre avec les  $MP_{PEG-fluo}$ . Dans les deux cas, ces espèces n'auraient pas été éliminées pendant la purification sur le gel Biospin. Nous n'avons pas poussé plus loin cette analyse en synthétisant, par exemple, un amphiphile **25** couplé à l'aminofluorescéine, puis en l'analysant en FCS. Cependant, d'autres gels de purification ont été testés : le gel Séphadex G50, une résine « fluorescent dye removal » de chez Thermofisher et l'élution sur Séphadex 25 en présence de 20% d'éthanol. Aucune de ces purifications n'a permis d'éliminer les entités présentes dans le mélange avec les  $MP_{PEG-fluo}$ .

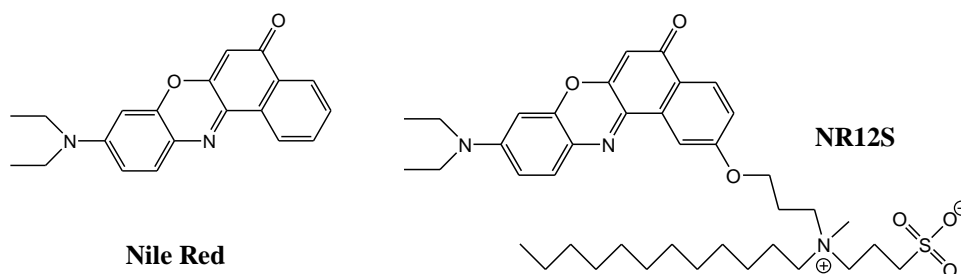


Nous n'avons ainsi pas voulu tester ces  $MP_{\text{PEG-fluo}}$  marquées sur des cellules car elles ne se présentaient pas comme une population unique. Nous nous sommes alors tournés vers un autre type de marquage des micelles : l'encapsulation de sonde fluorescente.

### III. Encapsulation d'une sonde fluorescente dans les micelles $MP_{\text{PEG-OH}}$

Pour cette étude, nous avons utilisé des micelles polymérisées constituées uniquement de l'amphiphile **23** ( $MP_{\text{PEG-OH}}$ ), dont la synthèse est décrite dans le paragraphe II.1.1, c'est-à-dire des micelles possédant une surface entièrement constituée de groupes hydroxyles. En effet, les acides carboxyliques ne sont plus nécessaires car aucun couplage n'interviendra en surface.

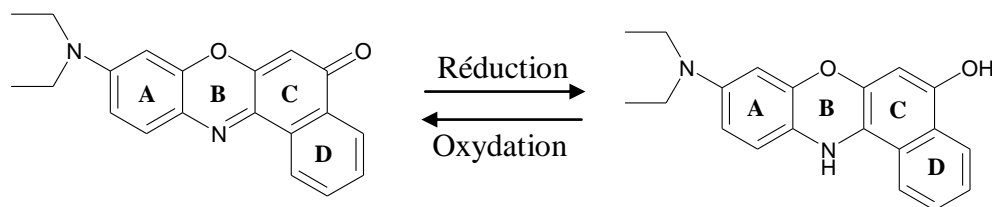
En collaboration avec Andrey Klymchenko du laboratoire de biophotonique et pharmacologie dirigé par Yves Mély, nous avons envisagé d'encapsuler la sonde NR12S, dérivée du Nile Red, dans les  $MP_{\text{PEG-OH}}$ .<sup>15</sup> Le Nile Red est une sonde connue pour caractériser les domaines hydrophobes de protéines, de dendrimères ou de micelles.<sup>16</sup> Elle ne peut cependant pas être utilisée comme marqueur membranaire car elle est internalisée rapidement. La sonde NR12S utilisée dans cette étude est formée à partir du Nile Red attaché à un groupe zwitterionique et à une chaîne hydrophobe. (Figure 26.3)



**Figure 26.3.** Structure des sondes fluorescentes Nile Red et NR12S

Contrairement au Nile Red, la sonde NR12S a la propriété de s'insérer dans les membranes des cellules, grâce à sa chaîne grasse et d'être internalisée très lentement. De plus, en

conditions réductrices, la fluorescence de la sonde est éteinte. Cette propriété permet de vérifier si la sonde est internalisée car immédiatement après contact avec le réducteur, seule la fluorescence membranaire est éteinte et non la sonde internalisée. Le phénomène étant réversible, en conditions oxydantes, la fluorescence réapparaît, par exemple sous oxygène. La réduction réversible de la partie Nile Red de la sonde est présentée dans la figure 27.3, pendant laquelle la cétone est réduite en alcool. Cette réduction a pour effet de rendre les cycles **C** et **D** conjugués, et en même temps de supprimer la conjugaison entre les cycles **A**, **B** et **C**. Ainsi, après réduction, les électrons  $\pi$  ne sont plus délocalisés que sur deux cycles. Cette suppression de conjugaison induit une extinction de la fluorescence de la sonde.



**Figure 27.3.** Schéma de la réduction réversible de la sonde Nile Red

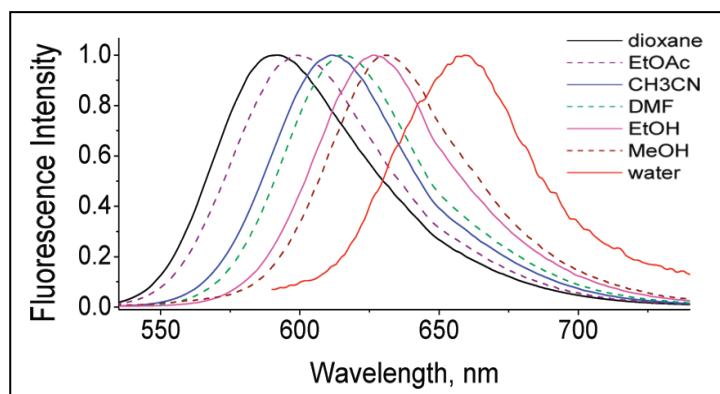
L'étude suivante va être divisée en plusieurs parties. Tout d'abord, l'étude de l'encapsulation du NR12S dans les  $MP_{PEG-OH}$  sera examinée, puis les micelles contenant le NR12S seront analysées par FCS. La cytotoxicité des  $MP_{PEG-OH}$  sera ensuite évaluée pour vérifier si des tests sur cellules sont réalisables.

### III.1. Encapsulation du NR12S dans les micelles $MP_{PEG-OH}$

#### III.1.1. Analyse des spectres de fluorescence du NR12S en présence de micelles $MP_{PEG-OH}$

Afin de prouver que le NR12S est encapsulé à l'intérieur des  $MP_{PEG-OH}$ , nous allons les mettre en solution puis réaliser le spectre d'émission de fluorescence de la sonde. En effet, la longueur d'onde d'émission de NR12S dépend de son environnement. La figure 28.3 présente les spectres de fluorescence de la sonde NR12S en fonction du solvant dans lequel elle se

trouve. Ainsi, plus la sonde se trouve dans un milieu hydrophobe, plus sa longueur d'onde d'émission est faible.

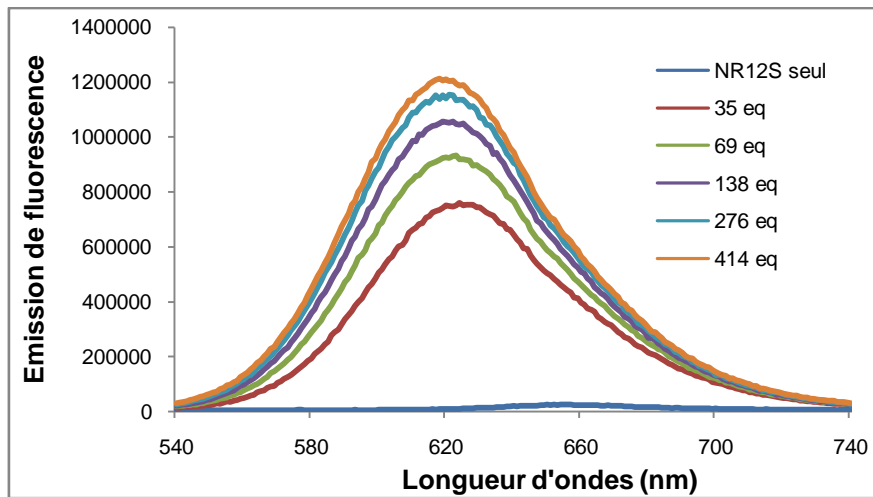


**Figure 28.3.** Spectres de fluorescence normalisés du NR12S en fonction du solvant

Dans notre cas, si le NR12S est bien encapsulé dans le cœur hydrophobe des  $MP_{PEG-OH}$ , nous devons voir un décalage entre la longueur d'onde d'émission du NR12S dans l'eau (environ 660 nm) et sa longueur d'onde d'émission en présence de micelles.

Ainsi, les  $MP_{PEG-OH}$  sont formées dans le tampon phosphate pH 7,4 à une concentration de 5 mg/mL puis photopolymérisées 10 heures dans le four UV. Une solution de NR12S dans le tampon phosphate pH 7,4 est également préparée à une concentration de 0,2  $\mu$ M.

Nous avons tout d'abord vérifié si le NR12S pouvait être encapsulé dans les micelles puis nous avons déterminé le nombre d'équivalent de sonde à partir duquel elle était entièrement encapsulée. Pour cela, nous avons fait varier le nombre d'équivalents de micelles par rapport à une quantité fixe de sonde. Les nombres d'équivalents de micelles introduits par rapport à la sonde sont compris entre 35 à 414 équivalents et sont calculés à partir de la masse d'amphiphile introduit pour leur formation. En ajoutant un grand excès de micelles par rapport à la sonde, nous nous attendions à voir une saturation du spectre d'émission du NR12S. Les spectres d'émission de fluorescence enregistrés sont représentés dans la figure 29.3.



**Figure 29.3.** Emission de fluorescence de la sonde NR12S encapsulée dans différentes quantités de  $MP_{PEG-OH}$

Lorsque le NR12S est seul en milieu aqueux, son émission est très faible et son maximum d'émission est de 657 nm (Figure 29.3, courbe bleue). Quand des  $MP_{PEG-OH}$  sont ajoutées au milieu, l'intensité de l'émission du NR12S est beaucoup plus importante et le maximum d'émission se déplace à 620 nm. Ce déplacement indique que la sonde ne se trouve plus dans le même environnement et qu'elle s'est déplacée du milieu aqueux vers le cœur hydrophobe des micelles. De plus, une forte augmentation de l'émission est observée jusqu'à 276 équivalents de micelles. Au-delà, l'augmentation est très faible ce qui montre que tout le NR12S présent a été encapsulé. Lors de nos expériences sur les cellules, nous devons donc nous placer à plus de 276 équivalents de micelles par rapport à la sonde.

### III.1.2. Analyses par spectroscopie de corrélation de fluorescence des micelles PEG-OH contenant du NR12S

Suite aux expériences précédentes, nous avons décidé d'introduire 345 équivalents de sondes dans une solution de  $MP_{PEG-OH}$  puis d'analyser la distribution en taille de ces micelles marquées par analyses de FCS. Ces analyses ont révélé une population unique possédant un temps de corrélation de 0,55 ms et un rayon de 3,9 nm. Cette valeur est en accord avec celle trouvée par DLS des  $MP_{PEG-OH}$  avant encapsulation du NR12S (4,7 nm) et permet de

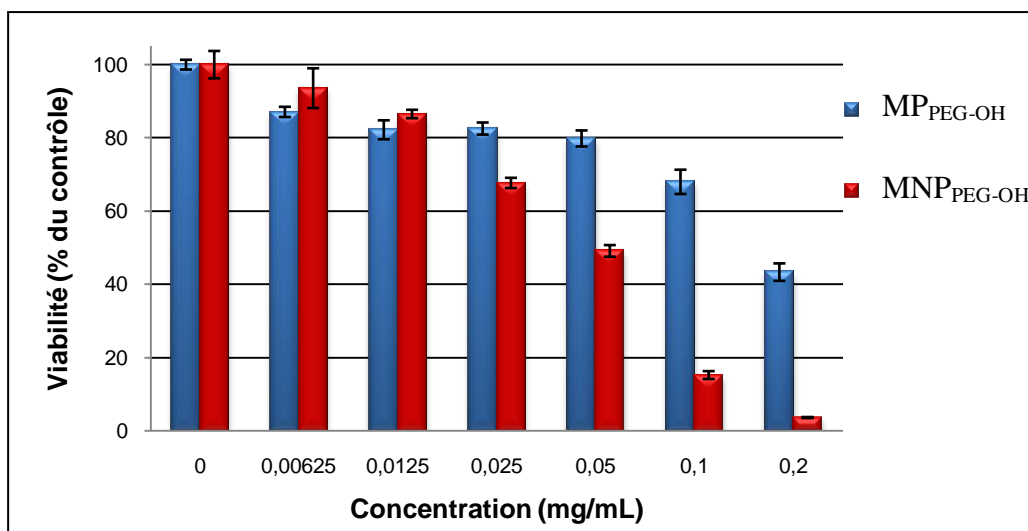
confirmer que les micelles ainsi marquées par l'encapsulation d'une sonde fluorescente peuvent être utilisées pour des applications sur cellules. Ces micelles seront dans la suite du manuscrit notée  $MP_{PEG-OH-NR12S}$ .

### III.2. Etude sur cellules des $MP_{PEG-OH}$ marquées par encapsulation de NR12S

Avant d'étudier le comportement des micelles  $MP_{PEG-OH-NR12S}$  sur les cellules, il nous a d'abord fallu vérifier que les micelles n'étaient pas cytotoxiques. Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser des cellules HeLa, qui sont couramment utilisées en biologie et qui sont facilement observables au microscope. Ainsi, un test de cytotoxicité sur des cellules HeLa a été réalisé grâce à un test colorimétrique au sel de tétrazolium.<sup>17,18</sup>

#### III.2.1. Etude la cytotoxicité des $MP_{PEG-OH}$

La cytotoxicité des  $MP_{PEG-OH}$  a été évaluée par un test MTT sur cellules quiescentes. Les cellules HeLa sont d'abordensemencées à 50 000 cellules par puits. Les micelles à différentes concentrations ( $0,00625 \text{ mg/mL} < C < 0,02 \text{ mg/mL}$ ) sont ensuite ajoutées dans les puits contenant les cellules, avant d'être incubées 4 heures à 37°C. Le réactif MTT est ensuite ajouté puis les cellules sont incubées 2 heures à 37°C. La lecture de la fluorescence est réalisée à 495 nm et le taux de viabilité des cellules HeLa est calculé en fonction de la concentration en micelles introduites. Les taux de viabilité sont présentés dans la figure 30.3. D'autre part, nous avons voulu comparer la cytotoxicité des micelles non polymérisées  $MNP_{PEG-OH}$ , avec celle des  $MP_{PEG-OH}$ , c'est pourquoi nous avons inclus leurs taux de viabilité dans la même figure 30.3.



**Figure 30.3.** Viabilité des cellules HeLa en fonction de la concentration en MNP<sub>PEG-OH</sub> et MP<sub>PEG-OH</sub>

Nous pouvons remarquer qu'au-dessus d'une certaine concentration, les taux de viabilité obtenus sont différents si les micelles sont polymérisées ou non. En effet, pour des concentrations comprises entre 0 et 0,0125 mg/mL, les MNP<sub>PEG-OH</sub> et les MP<sub>PEG-OH</sub> sont très peu toxiques car les taux de viabilité sont supérieurs à 80%. Par contre, à partir de 0,025 mg/mL, le taux de viabilité des MP<sub>PEG-OH</sub> ne varie pas tandis que celui des MNP<sub>PEG-OH</sub> descend à 68%. Cette tendance se confirme pour des concentrations plus élevées. Par exemple à 0,1 mg/mL, le taux de viabilité des MP<sub>PEG-OH</sub> est de 68%, quand celui des MNP<sub>PEG-OH</sub> a chuté à 15%. Ce test de cytotoxicité confirme que les MP<sub>PEG-OH</sub> sont plus adaptées pour des études cellulaires que les MNP<sub>PEG-OH</sub>.

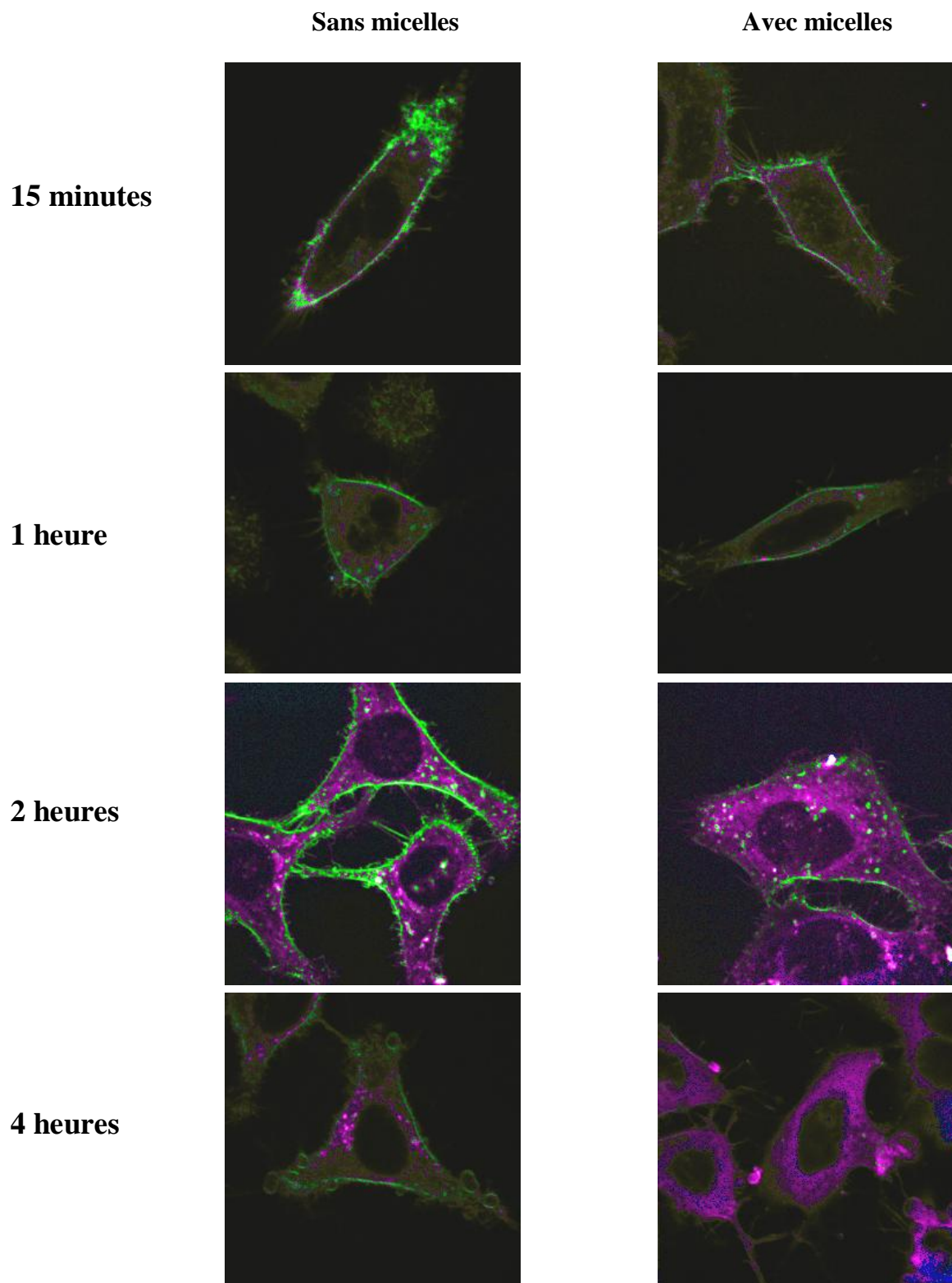
Au vu des taux de viabilité obtenus pour les MP<sub>PEG-OH</sub>, peu de différences sont observées entre les concentrations de 0,0125 mg/mL et 0,05 mg/mL. Par contre, quand les concentrations dépassent 0,1 mg/mL, les taux de viabilité sont inférieurs à 70%. Comme nous voulions concilier une faible cytotoxicité et une concentration en MP<sub>PEG-OH</sub> assez élevée, nous avons choisi de les utiliser à la concentration de 0,05 mg/mL. En effet, à cette concentration, le taux de viabilité des cellules est de 81%, ce qui est convenable. Pour conclure, ces résultats

montrent que pour être utilisées en tests cellulaires, les micelles doivent être photopolymérisées, et utilisées avec une concentration inférieure ou égale à 0,05 mg/mL.

### III.2.2. Comportement des $MP_{PEG-OH}$ au contact de cellules HeLa

Afin de mettre en évidence le rôle joué par les micelles, deux expériences sont menées en parallèle. Dans la première, les  $MP_{PEG-OH}$  contenant la sonde NR12S sont incubées en présence de cellules. Dans la deuxième, seule la sonde NR12S est incubée. Chaque expérience est incubée pendant 15 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures. Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont observées au microscope à fluorescence.

En tenant compte des tests de cytotoxicité, les micelles sont introduites sur les cellules à une concentration de 0,05 mg/mL (69  $\mu$ M) avec un excès de 345 équivalents par rapport à la sonde. Pour ce faire, 20  $\mu$ L d'une solution de  $MP_{PEG-OH}$  à 5 mg/mL dans le tampon phosphate pH 7,4 sont mélangés avec 2  $\mu$ L d'une solution de NR12S à 0,2 mM puis dilués à 1mL avec du tampon Optimem. Par la suite, 400  $\mu$ L de cette solution sont déposés sur les cellules HeLa, sur lesquelles 400  $\mu$ L d'optimem sont à nouveau ajoutés. Une expérience contrôle est réalisée en parallèle avec uniquement du NR12S à une concentration de 0,2  $\mu$ M, soit la même concentration que pour l'essai en présence de micelles. Les cellules HeLa sont ensuite incubées à 37°C pendant 15 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures. Après incubation, le surnageant est éliminé et remplacé par de l'Optimem. Les cellules sont ensuite observées avec un microscope à fluorescence afin de voir la répartition de la sonde dans les cellules. Les images enregistrées aux différents temps d'incubation sont présentées dans la figure 31.3.

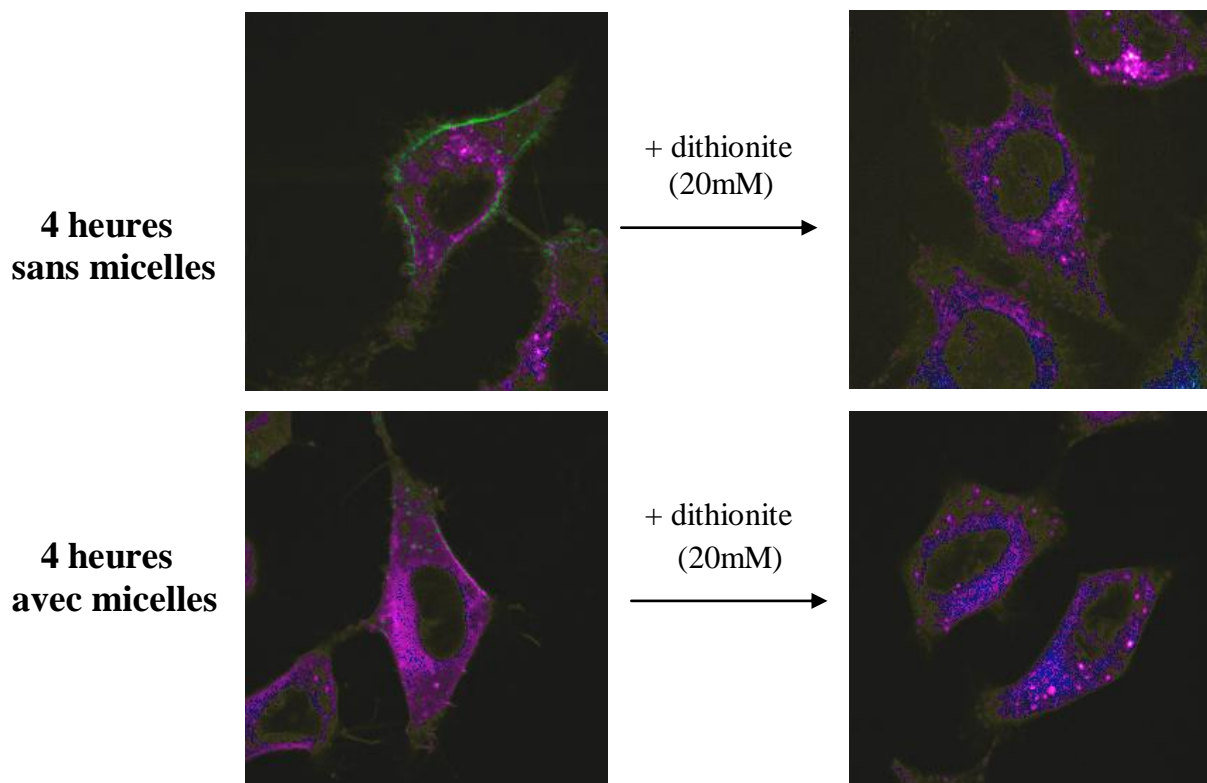


**Figure 31.3.** Images de microscopie des  $MP_{PEG-OH-NR12S}$  (0,05 mg/mL) et de NR12S seul (0,2 $\mu$ M) après incubation à 37°C avec les cellules HeLa (15 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures)

Pour les temps d'incubation de 15 minutes et 1 heure, les images avec et sans micelles sont semblables : une grande quantité de sonde est fixée sur la membrane cellulaire (en vert) tandis



qu'une petite partie est déjà internalisée par les cellules (en violet). Après 2 heures d'incubation, les cellules avec micelles semblent conserver moins de fluorescence membranaire que les cellules sans micelles. La différence est très claire après 4 heures d'incubation : les cellules avec micelles ne présentent plus aucune fluorescence membranaire, tandis que les cellules sans micelles en conservent toujours. Afin de vérifier que la fluorescence détectée provient bien de l'intérieur de la cellule, nous nous sommes placés en conditions réductrices en ajoutant 20  $\mu$ L d'une solution de dithionite à 1 M sur les cellules. Nous savons que des conditions réductrices vont permettre d'éteindre la fluorescence membranaire et de conserver la fluorescence présente dans le cytoplasme. Les images enregistrées avec et sans micelles, pour un temps d'incubation de 4 heures avant et après ajout de dithionite sont présentées dans la figure 32.3.



**Figure 32.3.** Images de microscopie des  $MP_{PEG-OH-NR12S}$  (0,05 mg/mL) et NR12S seul (0,1  $\mu$ M) sur les cellules HeLa à 4 heures d'incubation à 37°C avec ou sans dithionite (20mM)

L'ajout de dithionite sur les cellules incubées en présence de sonde seule, montre la suppression de la fluorescence membranaire, tandis que la fluorescence du cytoplasme demeure intacte. Pour les cellules incubées avec les  $MP_{PEG-OH-NR12S}$ , les images restent semblables, puisqu'aucune fluorescence membranaire n'était détectée avant l'ajout de dithionite.

Ces expériences permettent de conclure que l'ajout de micelles contenant la sonde NR12S augmente la vitesse d'internalisation de la sonde dans les cellules. Après 4 heures d'incubation, plus aucune fluorescence n'est en effet détectée sur les membranes des cellules, toute la sonde ayant été internalisée par les cellules.

Afin d'obtenir des informations permettant de discuter le mécanisme d'internalisation des micelles, il serait nécessaire de réaliser des manipulations complémentaires, comme une incubation à 4°C ou l'ajout d'un agent bloquant l'endocytose, comme la chlorpromazine. Nous pouvons cependant supposer que l'internalisation a lieu par endocytose, comme c'est le cas pour nombres de particules le taille est comprise entre 10 nm et à plus de 1  $\mu\text{m}$ .<sup>19-20-21-22</sup> Pour l'heure, nous n'avons pas réalisé ce type d'expérience car notre but était de montrer que les micelles  $MP_{PEG-OH}$  permettaient de jouer le rôle de vecteur cellulaire.

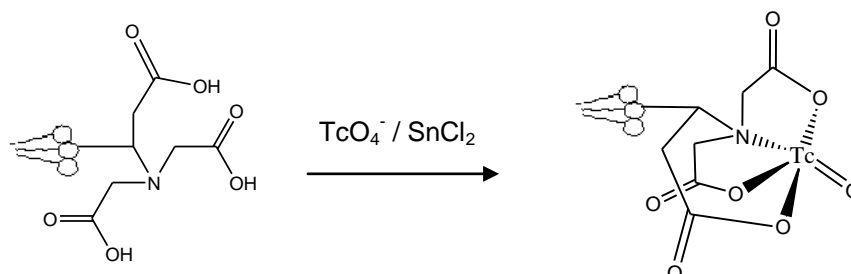
## IV. Etude de la distribution *in vivo* des micelles polydiacétyléniques par tomographie à émission monophotonique

Afin de compléter notre étude sur les applications potentielles des micelles polydiacétyléniques en tant qu'agent de délivrance ou de diagnostique, nous avons voulu étudier leur comportement *in vivo*. Pour cela, nous sommes revenus aux micelles portant une tête polaire NTA afin d'exploiter la présence des acides carboxyliques pour chélater un agent d'imagerie radioactif comme le technétium 99. Ainsi, nous pourrions étudier la biodistribution des  $MP_{NTA}$  par tomographie à émission monophotonique (SPECT). La biodistribution des  $MP_{NTA}$  va être étudiée mais également celle de micelles mixtes formées d'amphiphiles possédant une tête polaire NTA et des têtes polaires neutres ou des micelles formées d'amphiphiles cationiques. De cette façon, nous pourrions déterminer si les têtes polaires des micelles jouent un rôle dans leur biodistribution.

### IV.1. Etude de la fixation du technétium sur les $MP_{NTA}$

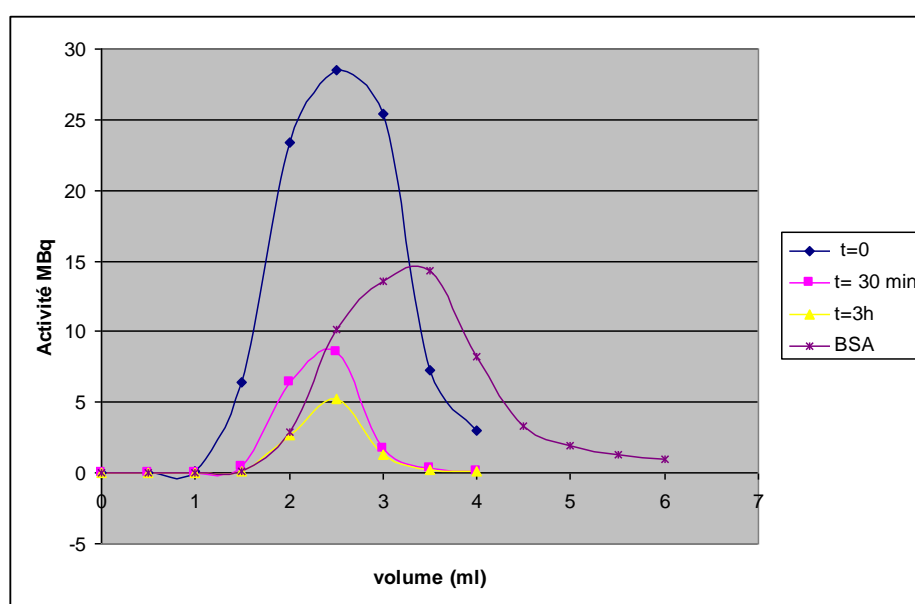
Grâce aux triacides présents sur les têtes NTA, des atomes métalliques comme le technétium ( $^{99m}\text{Tc}$ ) peuvent être chélatés.<sup>26-27</sup> Les manipulations présentées dans ce paragraphe ont été effectuées par Ali Ouadi, du département de recherches subatomiques de l'Institut Herbert Curien, dirigé par le Dr. David Brasse. Le technétium utilisé est le  $^{99m}\text{Tc}$ , un isotope qui possède un temps de demi-vie de 6,03 heures. La première étape a été de mettre en solution, 30  $\mu\text{L}$  d'une solution de micelles NTA (10 mg/mL dans du tampon Tris pH 8) en présence de 30  $\mu\text{L}$  de dichlorure d'étain (0,25 mg dans 1 mL 0,1 N HCl), 30  $\mu\text{L}$  d'acide ascorbique (5 mg/mL dans le PBS). 1,4 mL d'une solution de technétium sous forme pertechnenate  $\text{TcO}_4^-$  dans NaCl 0,9% est ensuite ajoutée puis le mélange est agité 30 minutes. La présence du dichlorure d'étain ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) permet de réduire le technétium de la forme  $\text{TcO}_4^-$ , d'état d'oxydation VII à la forme  $\text{TcO}^{3+}$ , d'état d'oxydation V. Cependant, d'autres formes réduites

du technétium sont également présentes, notamment les formes d'oxydation III et IV, ainsi que des produits d'hydrolyse. Il n'est donc pas possible de savoir exactement sous quelle forme est présent le techninium, mais on peut représenter une structure probable de sa chélation en présence d'un groupe chélatant comme le NTA. (Figure 33.3)



**Figure 33.3.** Représentation supposée de la chélation du  $^{99m}\text{Tc}$  sur les têtes NTA

La solution brute est ensuite éluée sur une colonne Sephadex G-25 afin de vérifier la fixation du technétium sur les micelles. Les courbes présentées dans la figure 34.3 (courbe bleue, rose et jaune) montrent l'élué des micelles NTA marquées par le technétium en présence de BSA, une protéine présente dans le sang. D'autre part, la BSA seule en présence de technétium a également été éluée en parallèle. (Figure 36.3, courbe violette) Le fait de mélanger les micelles et la BSA permet de mimer les conditions d'une injection, et de vérifier si les micelles conservent le  $^{99m}\text{Tc}$ . Chaque fraction a été analysée à l'aide d'un activimètre.

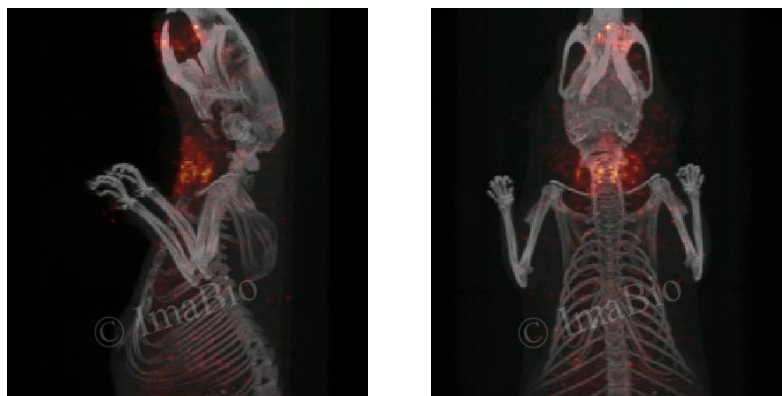


**Figure 34.3.** Elution des solutions de micelles NTA en présence de  $^{99m}\text{Tc}$  et de BSA jusqu'à 3 heures

Les éluions ont été effectuées à 0 minute, 30 minutes et 3 heures et montrent que du  $^{99m}\text{Tc}$  est fixé sur les micelles même 3 heures après fixation. Ainsi, le complexe formé est stable. D'autre part, la courbe d'éluion des micelles avec la BSA n'étant pas la même que celle de la BSA seule, aucune compétition n'a lieu et les micelles marquées peuvent bien être testées *in vivo*.

#### IV.2. Etude de la biodistribution de différents types de micelles diacétyléniques après chélation du technétium

Par le même procédé de marquage que pour les  $\text{MP}_{\text{NTA}}$ , plusieurs micelles ont été marquées par le  $^{99m}\text{Tc}$  et testés *in vivo* : les micelles NTA seules, les micelles mixtes NTA/PEG<sub>8</sub> : 80/50 en masse, NTA/PEG<sub>8</sub> : 50/50 en masse et des micelles diamines. Ces dernières ont été synthétisées par Emmanuelle Morin au laboratoire. Les micelles marquées ont été injectées par voie intraveineuse à des souris et l'imagerie a été réalisée entre 0 et 3 heures après injection. Comme point de comparaison, la figure 35.3 présente l'injection à une souris du  $^{99m}\text{Tc}$  seul. Cette image montre que le technétium se situe au niveau de la thyroïde et les glandes salivaires.



**Figure 35.3.** Images de souris après injection de  $^{99m}\text{Tc}$

Par la suite, les différents types de micelles marquées ont été injectés aux souris.



Pour les micelles NTA (1<sup>ère</sup> ligne), la radioactivité est détectée dans la vessie jusqu'à 1 heure après l'injection, ce qui signifie que les micelles circulent dans le corps de l'animal puis sont évacuées dans l'urine. Les micelles mixtes NTA/PEG<sub>8</sub> (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> lignes) ont un comportement assez similaire. Elles restent plus longtemps en circulation dans le corps que les MP<sub>NTA</sub>, puisqu'elles sont encore détectées 3 heures après l'injection. Cette augmentation est probablement due à la présence du PEG, qui est connu pour augmenter le temps de circulation des particules dans le corps. Quant aux micelles munies d'une tête polaire diamine (4<sup>ème</sup> ligne), elles sont bloquées au niveau du foie et ne circulent pas du tout dans le sang.

Ainsi, ces données nous permettent d'envisager l'utilisation de micelles mixtes NTA/PEG<sub>8</sub> pour l'imagerie nucléaire, car elles sont circulantes dans le sang et d'une bonne intensité de radioactivité. La prochaine étape sera de fixer des agents de marquage, comme des anticorps à la surface des micelles afin cibler un élément précis dans la souris.

## V. Conclusion

Dans cette étude, nous avons d'abord voulu fonctionnaliser la surface de  $MP_{NTA}$  et de  $MP_{PEG-OH}$  par liaisons spécifiques entre les acides carboxyliques des micelles et un réactif possédant une amine primaire. Malgré de nombreux essais, la fonctionnalisation n'a jamais pu être totalement sélective et n'a pas permis d'obtenir des micelles constituées d'une seule population utilisable pour des tests sur cellules et des tests *in vivo*. Cependant, plusieurs voies restent envisageables, comme une amélioration du degré de polymérisation des micelles ou l'étude de la fonctionnalisation de micelles polymérisables et réticulables.

Nous nous sommes alors tournés vers l'encapsulation d'une sonde fluorescente dans des micelles pégyliées et les études sur cellules ont révélé que la présence des micelles permettait une internalisation plus rapide dans les cellules HeLa. D'autre part, les micelles pouvant encapsuler une molécule hydrophobe, leur potentiel en tant que vecteur de principe actif dans les cellules pourra être développé. Pour finir, nous avons obtenu des images *in vivo*, montrant une longue circulation dans la souris, grâce à la chélation de technétium à la surface de micelles mixtes polymérisées NTA/PEG<sub>8</sub>. Cette étude est actuellement poursuivie par Emmanuelle Morin afin d'injecter ces micelles marquées à des souris porteuses d'une tumeur pour évaluer leur diffusion passive.



## Références

- (1) Kreuter, J.; Hekmatara, T.; Dreis, S.; Vogel, T.; Gelperina, S.; Langer, K. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain, *J. Controlled Release* **2007**, *188*, 54-58
- (2) Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allémann, E. Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 483-490
- (3) O'Reilly, R.K.; Joralemon, M.J.; Hawker, C.J.; Wooley, K.L., Facile syntheses of surface-functionalized micelles and shell cross-linked nanoparticles, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5203-5217
- (4) Espuelas, S.; Roth, A.; Thumann, C.; Frisch, B.; Schuber, F. Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells, *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 721-729
- (5) Ishida, O.; Maruyama, K.; Tanahashi, H.; Iwatsuru, M.; Sasaki, K.; Eriguchi, M.; Yanagie, H. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1042-1048
- (6) Torchilin, V.P.; Levchenko, T.S.; Lukyanov, A.N.; Khaw, B.A.; Klibanov, A.L.; Rammohan, R.; Samokhin, G.P. ; Whiteman, K.R. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 397-411
- (7) Maruyama, A.; Ishihara, T.; Kim, J.S.; Kim, S.W.; Akaike, T. Nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D,L-lactic acid), *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 735-742
- (8) Dufresne, M.H.; Gauthier, M.A.; Leroux, J.C. Thiol-functionalized polymeric micelles: from molecular recognition to improved mucoadhesion, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1027-1033
- (9) Means, G.E. ; Congdon, W.I. ; Bender, M.L. Reactions of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate ion with amines and hydroxide ion, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3564-3571
- (10) Kumar, N. ; Azzam, T. ; Domb, A.J. Molecular mass distribution of polycations and dextrans by high-performance size exclusion chromatography, *Polym. Adv. Technol.* **2002**, *13*, 1071-1077
- (11) Cayot, P.; Tainturier, G. The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination, *Ana. Biochem.* **1997**, *249*, 184-200
- (12) Hermanson, G.T. Bioconjugated techniques, Second Edition
- (13) Staros, J.V.; Wright, R.W.; Swingle, D.M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions, *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 220-222
- (14) Shannon, S.K.; Barany, G. 4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)phenylhydrazine (FmPH): a new chromophoric reagent for quantitative monitoring of solid-phase aldehydes *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4586-4594

- (15) Zugates, G.T.; Anderson, D.G.; Little, S.R.; Lawhorn, I.E.B.; Langer, R. Synthesis of poly(beta-amino ester)s with thiol-reactive side chains for DNA delivery, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12726-12734
- (16) Getz, E.B.; Xiao, M.; Chakrabarty, T.; Cooke, R.; Selvin, P.R. A comparison between the sulfhydryl reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry, *Ana. Biochem.* **1999**, *273*, 73-80
- (17) Kucherak, O.A. ; Oncul, S. ; Darwich, Z. ; Yushchenko, D.A. ; Arntz, Y. ; Didier, P. ; Mély, Y. ; Klymchenko, A.S. Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4907-4916
- (18) Lampe, J.N.; Fernandez, C.; Nath, A.; Atkins, W.M. Nile Red is a fluorescent allosteric substrate of cytochrome P 450 3A4, *Biochemistry* **2008**, *47*, 509-516
- (19) Arimura, H. ; Ohya, Y. ; Ouchi, T. Formation of core-shell type biodegradable polymeric micelles from amphiphilic poly(aspartic acid)-block-poly(lactide), *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 720-725
- (20) Du, J.Z. ; Tang, L.Y. ; Song, W.J. ; Shi, Y. ; Wang, J. Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(ε-caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) side chains as drug carriers, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2169-2174
- (21) You, J.; Hu, F.Q.; Du, Y.Z.; Yuan, H. Polymeric micelles with glycol-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2450-2456
- (22) Sahay, G. ; Kim, J.O. ; Kabanov, A.V. ; Bronich, T.K. The exploitation of differential endocytic pathway in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents, *Biomaterials* **2010**, *31*, 923-933
- (23) Mahmud, A.; Lavasanifar, A. The effect of block copolymer structure on the internalization of polymeric micelles by human breast cancer cells, *Coll. Surf.* **2005**, *45*, 82-89
- (24) Gratton, S.E.A.; Ropp, P.A.; Pohlhaus, P.D.; Luft, J.C.; Madden, V.J.; Napier, M.E.; DeSimone, J.M. The effect of particle design on cellular internalization pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 11613-11618
- (25) Manarin, F.; Roehrs, J.A.; Gay, R.M. ; Brandao, R. ; Menezes, P.H. ; Nogueira, C.W. ; Zeni, G. Electrophilic cyclization of 2-chalcogenealkynylanisoles : versatile access to 2-chalcogen-benzo[*b*]furans, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2153-2162
- (26) Shah, A.H.; Khan, Z.A.; Choudhary, N.; Lohölter, C.; Schäfer, S.; Marie, G.P.L.; Farooq, U.; Witulski, B.; Wirth, T. Iodoxolone-based hypervalent iodine reagents, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3578-3581
- (27) Hénaff, N.; Whiting, A. Stereoselective formation of 1,2-diiodoalkenes and their application in the stereoselective synthesis of highly functionalized alkenes *via* Suzuki and Stille coupling reactions, *J. Chem. Soc.* **2000**, 395-400
- (28) Park, Y.J.; Lee, J.Y.; Chang, Y.S.; Jeong, J.M.; Chung, J.K.; Lee, M.C.; Park, K.B.; Lee, S.J. Radioisotope carrying poly(ethylene oxide) poly(ε-caprolactone) copolymer micelles for targetable bone imaging, *Biomaterials* **2002**, *23*, 873-879
- (29) Visentin, R.; Pasut, G.; Veronese, F.M.; Mazzi, U. Highly efficient technetium-99m labeling procedure based on, the conjugation of N-[N-(3-

diphenylphosphinopropionylglycyl]cysteine ligand with poly(ethylene glycol),  
*Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1046-1054



## **CHAPITRE 4**

# **Dispersion des nanotubes de carbone en solution aqueuse et obtention des constructions lipidiques polymérisées**



# Chapitre 4

## Dispersion de nanotubes de carbone en solution aqueuse et obtention des constructions lipidiques polymérisées

---

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la dispersion des NanoTubes de Carbone (NTC) en milieu aqueux est un enjeu important et on peut à cette fin, mettre en place des méthodes covalentes ou non covalentes. Une précédente étude réalisée au laboratoire a permis de montrer que la suspension de différents NTC (simple parois, double parois, et multi parois) était possible dans le Tris pH 8 grâce à l'amphiphile diacétylénique possédant une tête NTA.<sup>1</sup> Dans cette étude, il a été montré que la présence de l'amphiphile permettait de suspendre un grand nombre de NTC différents, mais que les taux d'absorption dépendaient énormément du type de nanotube de carbone utilisé.

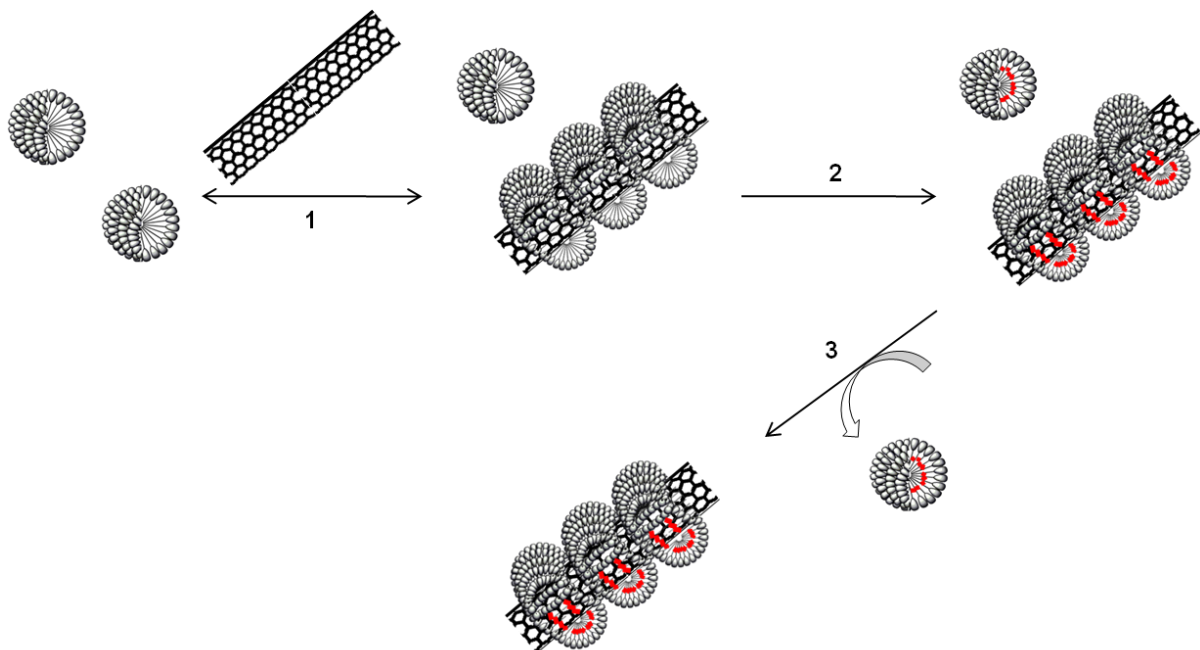
Les travaux décrits dans ce chapitre s'inscrivent dans la suite de cette étude. Cette fois, nous allons utiliser des amphiphiles synthétiques, possédant des têtes polaires différentes, afin de disperser en milieu aqueux un seul type de NTC : les NTC nTec. Les nTec ont été choisis car ce sont des NTC multi-parois, dont les suspensions ont montré une bonne stabilité après

1 mois de décantation. Le but de cette étude est d'évaluer la stabilité des suspensions de NTC nTec habillés par nos amphiphiles synthétiques, dans des milieux aqueux possédant des pH différents. Nous essaierons ainsi de mettre en évidence si les suspensions de NTC peuvent être modulées en fonction de l'amphiphile utilisé et du pH de la solution. Par la suite, la cytotoxicité de ces nanotubes habillés par les différents amphiphiles sera évaluée sur des

cellules épithéliales bronchiques humaines. Nous pourrions ainsi déterminer si les suspensions de NTC sont plus ou moins cytotoxiques que les NTC non habillés et si une cytotoxicité est induite par une modification de la surface des NTC, grâce à l'utilisation d'amphiphiles possédant des têtes polaires différentes.

## I. Dispersion de nanotubes de carbone en solution aqueuse

Le but de notre étude est de déterminer si la stabilité des suspensions de NTC nTec habillés par des amphiphiles diacétyléniques dépend de l'amphiphile utilisé. Nous pouvons en effet supposer que si l'amphiphile forme des micelles dans un milieu aqueux possédant un certain pH, les NTC couverts par cet amphiphile produiront une suspension stable à ce même pH. Cette supposition a été faite en étudiant le procédé de suspension des NTC, pendant lequel la première étape consiste en la formation de micelles puis en leur adsorption sur la surface hydrophobe des NTC. (Figure 1.4, étape 1) Par la suite, les auto-arrangements sont photopolymérisés par irradiation UV (Figure 1.4, étape 2), puis les NTC couverts sont isolés des micelles en excès par centrifugation. (Figure 1.4, étape 3)



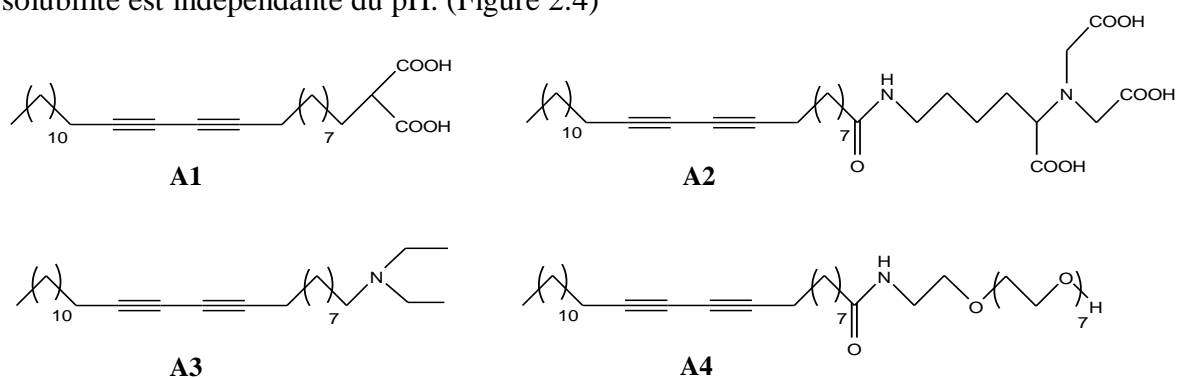
**Figure 1.4.** Représentation du procédé d'obtention des NTC couverts. **1** : auto-arrangement des micelles autour des NTC ; **2** : photopolymérisation des structures autour des NTC et de l'excès de micelles ; **3** : centrifugation pour isoler les NTC couverts de l'excès de micelles



Ainsi, un amphiphile ne pouvant pas former de micelles, ne pourrait pas s'auto-arranger à la surface du NTC. Nous avons alors imaginé quatre amphiphiles synthétisables possédant des têtes polaires différentes et capables de former des micelles à des pH particuliers. Pour chacun des amphiphiles et à un certain pH, nous devrions alors obtenir des suspensions stables de NTC. Nous pourrions ensuite évaluer si la modification du pH de ces suspensions a une influence sur leur stabilité.

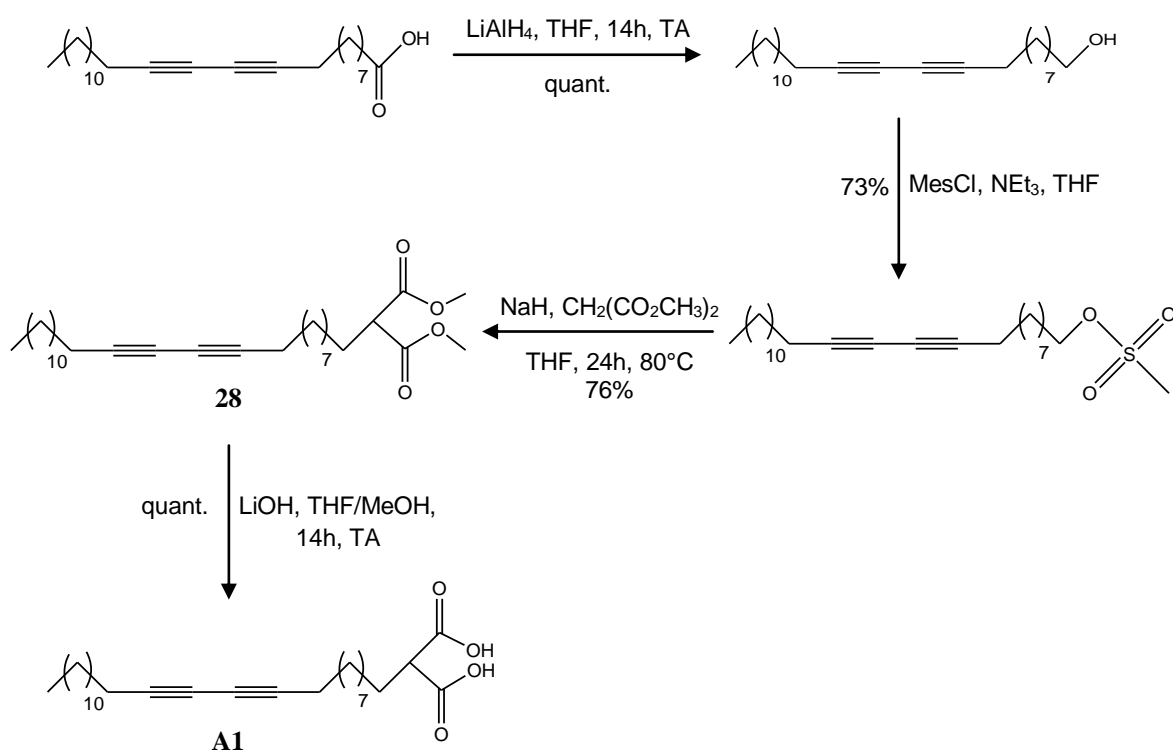
### I.1. Synthèse des amphiphiles

Pour cette étude, différents amphiphiles munis de têtes polaires spécifiques ont été synthétisés. Les têtes polaires ont été choisies en fonction de leurs solubilités à différents pH, afin de couvrir une large gamme allant de pH 11 à pH 4,7. Ainsi, des amphiphiles possédant des têtes polaires munies d'acides carboxyliques ont été imaginés, pour être solubles dans des solutions aqueuses aux pH basiques, après déprotonation. Pour ce faire, l'amphiphile **A1** (Figure 2.4) a été muni d'une tête polaire acide malonique, dont la solubilité est obtenue à partir de pH11 et l'amphiphile **A2** muni d'une tête polaire NTA, soluble au-dessus de pH8. Un amphiphile **A3** a été synthétisé pour être soluble dans des solutions aqueuses aux pH acides, grâce à la présence d'une amine tertiaire protonnable sur la tête polaire. De plus, nous avons synthétisé un amphiphile **A4** muni d'une tête polaire neutre, polyéthylène glycol, dont la solubilité est indépendante du pH. (Figure 2.4)



**Figure 2.4.** Structures des amphiphiles synthétisés avec des têtes polaires variables

Les synthèses des amphiphiles **A2** et **A3** ne seront pas décrites ici. En effet, l'amphiphile **A2** est commercial et l'amphiphile **A3** a été synthétisé par Emmanuelle Morin au laboratoire. La synthèse de l'amphiphile **A4** a été décrite dans le chapitre 3. La synthèse de l'amphiphile **A1** a quant à elle été réalisée suivant le schéma de synthèse décrit dans la figure 3.4. L'acide 10,12-pentacosadinoïque a été réduit en alcool **1** en présence d'hydrure d'aluminium, puis activé par du chlorure de mésyle afin d'obtenir le composé **2**. Ce dernier est ensuite mis à réagir avec du diméthylmalonate sous reflux, pour fournir le composé **28**, qui après saponification en présence d'hydroxyle de lithium, conduit à l'amphiphile **A1** désiré.



**Figure 3.4.** Schéma de synthèse de l'amphiphile **A1**

## I.2. Dispersion des nanotubes de carbone nTec par auto-arrangement d'amphiphiles diacétyléniques

### I.2.1. Etude de la formation des micelles dans différents tampons

Nous pouvons donc supposer que si les amphiphiles s'auto-arrangent sous forme de micelles dans certaines conditions de pH, ils seront capables de suspendre les nanotubes de carbone dans les mêmes conditions. Les quatre amphiphiles **A1**, **A2**, **A3** et **A4** ont donc été dissous à une concentration de 3 mg/mL dans des solutions de tampons à quatre pH différents :

Tris pH 11, Tris pH 8, HEPES pH 7,4, Acétate pH 4,7. Les solutions sont ensuite soniquées 30 minutes au bain à ultra-sons puis analysées par DLS. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.4.

<b>Amphiphiles</b>	Acétate pH 4,7	HEPES pH 7,4	Tris pH 8	Tris pH 11
<b>A1</b>	non	non	non	oui
<b>A2</b>	non	oui	oui	oui
<b>A3</b>	oui	non	non	non
<b>A4</b>	oui	oui	oui	oui

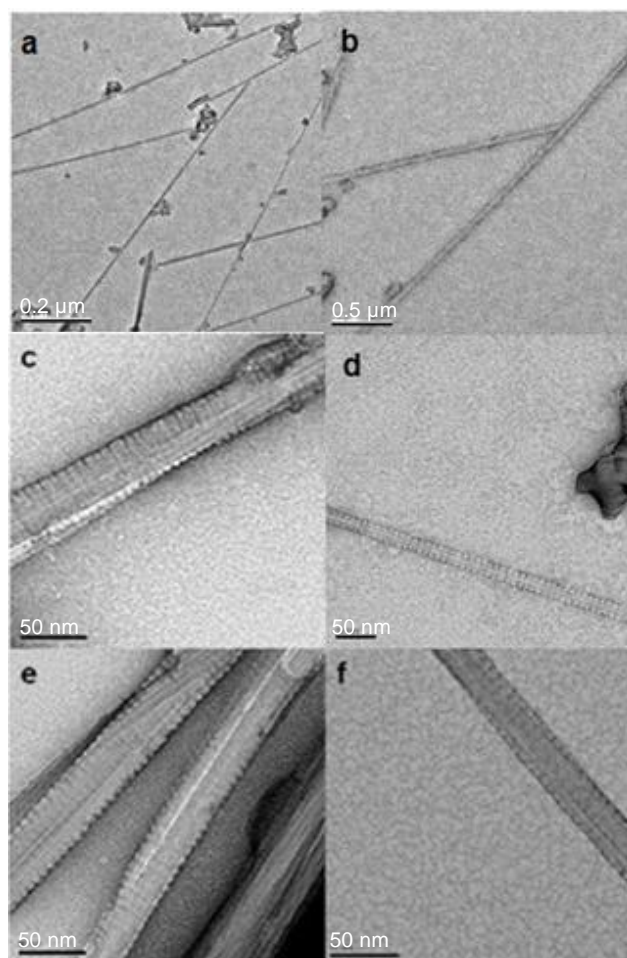
**Tableau 1.4.** Capacité des amphiphiles à former des micelles dans les différents milieux aqueux

La présence de micelles en solution est déduite par la taille des particules détectées en DLS. En effet, si les valeurs trouvées sont comprises entre 8 et 10 nm, cela signifie que des micelles sont présentes en solution. Si les valeurs trouvées sont supérieures à 10 nm, cela signifie que seuls des agrégats sont présents en solution et donc que des micelles ne se sont pas formées. Comme nous le pensions, les amphiphiles forment des micelles lorsque leurs têtes polaires sont sous forme ioniques, c'est-à-dire au-dessus de pH 11 pour **A1**, pH 7,4 pour **A2** et au-

dessous de pH 4,7 pour **A3**. Pour l'amphiphile **A4**, des micelles sont observées quelque soit le pH du milieu.

### I.2.2. Observations des auto-arrangements des amphiphiles synthétisés sur les nanotubes de carbone nTec en MET

Les amphiphiles sont placés dans le tampon le plus favorable pour la formation de micelles à une concentration de 6 mg/mL: **A1** dans une solution de Tris 0,1 M à pH 11, **A2** dans le tampon Tris 0,1 M à pH 8, **A4** dans le tampon acétate 0,1 M à pH 4,7 et **A3** dans le tampon HEPES 0,1 M à pH 7,4. Des NTC nTec (36 mg) sont ensuite ajoutés à 2 mL de chaque solution de micelles et les milieux obtenus sont soniqués 30 minutes dans un bain à ultra-sons. Les suspensions de NTC obtenues sont ensuite irradiées 10 heures dans un four UV de 48W à 254 nm puis centrifugées afin d'éliminer les micelles en excès. Les NTC couverts purifiés sont ensuite redispersés dans le tampon initial puis observés en MET. Quelques exemples d'auto-arrangements observés sont présentés dans la figure 4.4.



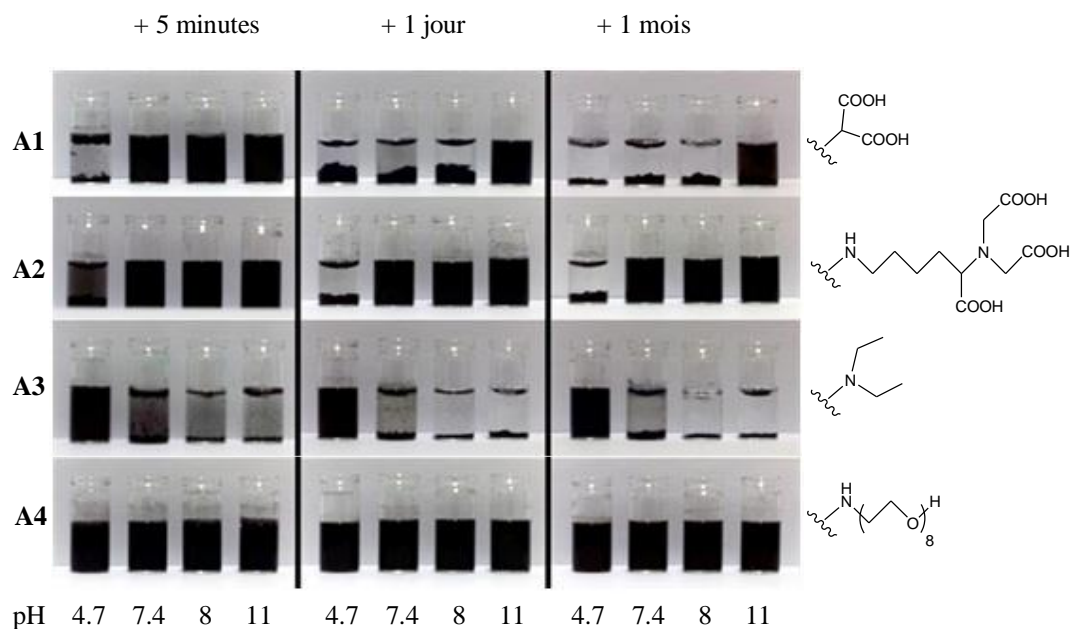
**Figure 4.4.** Images MET des NTC nTec couverts de l'amphiphile **a et b** : **A2** dans Tris pH 8 (échelles : 0,2  $\mu\text{m}$  et 0,5  $\mu\text{m}$ ) et **c** : **A1** dans Tris pH11 ; **b** (échelle : 0,5 $\mu\text{m}$ ) et **d** : **A2** dans Tris pH 8 ; **e** : **A4** dans HEPES pH 7,4 ; **f** : **A3** dans acétate pH 4,7. Echelles : 50 nm. Concentration en NTC : 4,5 mg/mL.

Les images **a** et **b** montrent que les NTC sont isolés en solution, tandis que les zooms plus forts montrent qu'ils sont couverts de stries, correspondant aux auto-arrangements des amphiphiles. Une expérience contrôle ne contenant que des NTC a montré qu'ils précipitent immédiatement après l'étape de sonication.

### I.2.3. Etude des suspensions de nanotubes de carbone nTec en fonction de l'amphiphile choisi et du pH de la solution

Par la suite, nous avons voulu établir une relation entre le comportement des amphiphiles en solution dans différents pH et celui des NTC couverts. Pour cela, chacun des échantillons de NTC couverts par les quatre amphiphiles a été divisé en quatre. Chaque aliquot a ensuite été

centrifugé afin d'éliminer les micelles en excès puis le culot a été redispersé dans chacun des quatre tampons. Un des aliquots sert de référence, puisque les NTC sont redispersés dans le même milieu que le milieu initial. Les décantations des NTC couverts ont été observées à partir de 5 minutes à 1 mois et sont présentés dans la figure 5.4.



**Figure 5.4.** Dispersions de NTC couverts par les différents amphiphiles **A1**, **A2**, **A3** et **A4** dans les tampons : tampon acétate pH 4,7 ; tampon HEPES pH 7,4 ; tampon Tris pH 8 ; solution de Tris pH 11 après 5 minutes, 1 jour et 1 mois de décantation. Concentration en NTC nTec : 4,5 mg/mL.

Après 5 minutes de décantation, des dispersions noires sont observées pour **A1** et **A2** en milieu neutre et basique, en milieu acide pour **A3** et dans tous les milieux pour **A4**. Les nuances de couleurs sont peu visibles sur les photos, mais les suspensions sont observées sont grises pour **A2** à pH acide et pour **A3** en pH neutre à basique. Après 1 jour et un mois de décantation, les dispersions sont similaires à celles observées après 5 minutes. La seule exception est **A1** dont toutes les suspensions ont décanté après 1 mois et où seule la suspension à pH 11 est stable. Lorsque les solutions observées sont grises ou transparentes, cela signifie que les NTC précipitent sous forme d'agrégats. Avec les mesures réalisées en DLS dans le paragraphe précédent, nous pouvons ainsi corréler l'obtention de dispersions noires stables avec la capacité des amphiphiles à former des micelles. A titre d'exemple,

l'amphiphile **A3** ne forme des micelles qu'à pH acide et les suspensions stables de NTC obtenues le sont uniquement à pH acide. Il en va de même pour l'amphiphile **A4** qui s'auto-arrange sous forme de micelles à tous les pH testés, et qui fournit des suspensions stables de NTC à ces mêmes pH.

Afin d'évaluer la réversibilité des suspensions de NTC couverts, nous avons voulu modifier le pH de la solution aqueuse d'une suspension stable de NTC puis le faire revenir à sa valeur de pH initiale. Pour cela, nous avons choisi de remplacer la solution de Tris pH 11 de la suspension de NTC couverts par l'amphiphile **A1**, par le même volume de tampon acétate pH 4,7. Le tampon acétate a été choisi car le comportement des NTC en présence de **A1** (figure 4.5), montre une décantation immédiate des NTC. Le tampon acétate sera à son tour éliminé pour être remplacé par la solution de Tris pH 11, afin de vérifier qu'une suspension noire est à nouveau obtenue.

Ainsi, la suspension de NTC en présence de **A1** a été centrifugée (20 minutes à 14000\*g) afin d'éliminer le Tris pH 11, puis dispersée dans un tampon non favorable (acétate pH 4,7) avant d'être centrifugée 3 minutes à 14000\*g pour l'éliminer. Finalement, les NTC sont resuspendus dans le tampon Tris pH11. Nous avons alors observé une suspension noire, indiquant que les NTC couverts se sont bien redispersés dans le tampon Tris. La nouvelle suspension ainsi obtenue a été observée après 1 jour de décantation, ce qui montre que le fait de changer le pH de solutions de NTC couverts n'altère pas la stabilité de la suspension une fois replacée dans un tampon adéquate.

### I.3. Conclusion

L'étude réalisée nous a permis de montrer que les suspensions de NTC habillés par des amphiphiles synthétiques possédant des têtes polaires différentes avaient le même

comportement en solution aqueuse que les amphiphiles utilisés. Les stabilités des suspensions de NTC peuvent donc être anticipées en fonction de l'amphiphile synthétisé. On peut alors imaginer apporter d'autres propriétés particulières aux suspensions de NTC couverts et modulables à souhait à partir d'un amphiphile synthétique. Afin de poursuivre notre étude sur la mise en suspension de NTC grâce aux amphiphiles diacétyléniques, nous avons évalué leur cytotoxicité, pour évaluer si en milieu professionnel, des NTC nTec couverts seraient moins cytotoxiques que des NTC nTec seuls et si la cytotoxicité dépendait de l'amphiphile auto-arrangé autour des NTC.

## **II. Evaluation de la cytotoxicité des nanotubes de carbones nTec habillés par des amphiphiles diacétyléniques**

Depuis leur découverte,<sup>2</sup> les NTC sont l'objet de nombreuses études, notamment dans le domaine biomédical. Ainsi, le potentiel de NTC en tant qu'agent de délivrance d'acides nucléiques<sup>3-4-5-6</sup> ou de molécules thérapeutiques<sup>7-8-9</sup> a été mis en évidence, notamment grâce à leur propriété de pénétrer dans les cellules. En effet, les nanotubes de carbones simples parois sont en général non cytotoxiques<sup>10-11</sup> et la modification de la surface de ces nanotubes par des acides carboxyliques n'induit pas de cytotoxicité, ce qui permet leur utilisation dans le domaine medical.<sup>12</sup> En ce qui concerne les nanotubes de carbone multi parois (MWCNT), des cytotoxicités différentes ont été observées en fonction du type de nanotube utilisé. Ainsi, des MWCNT de 60 nm à 80 nm de diamètre se sont montrés plus cytotoxiques que des MWCNT de 90 à 150 nm sur des cellules du rein (HEK293).<sup>13</sup> D'autres études ont également montré que les MWCNT étaient cytotoxiques sur plusieurs lignées cellulaires et que plus les nanotubes étaient courts, plus la cytotoxicité augmentait.<sup>14-15</sup>

La cytotoxicité des nanotubes dispersés par adsorption de polymère ou de lipide par liaisons non covalentes dépend quant à elle énormément de la nature du polymère ou du lipide + utilisé.<sup>16-17</sup> De plus, bien que la dispersion des nanotubes de carbone par adsorption augmente



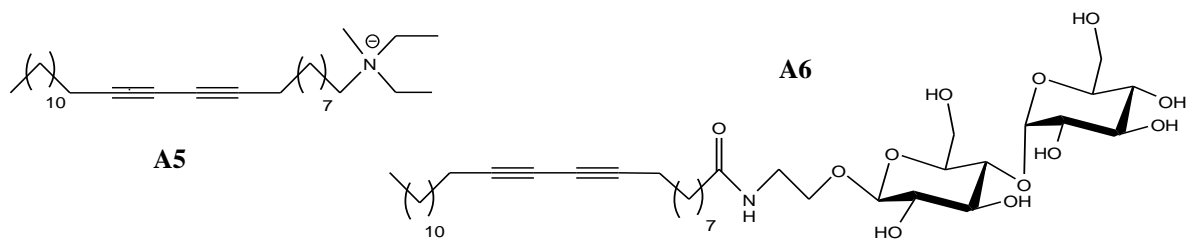
la biocompatibilité des nanotubes de carbone, cela ne signifie pas qu'ils seront moins cytotoxiques : c'est pourquoi il est difficile de prévoir la cytotoxicité des NTC.<sup>18</sup>

En ce qui concerne la toxicité *in vivo*, les études réalisées ont montré que des MWCNT, mis en suspension dans du Tween 80, se logent dans les tissus du poumon après contact par voie inhalatoire.<sup>19-20</sup> De même, les SWCNT fonctionnalisés par des acides carboxyliques<sup>21</sup> démontrent aussi une forte toxicité au niveau pulmonaire.

Le but de l'étude présentée dans ce paragraphe est d'évaluer la toxicité des nanotubes de carbone multi parois nTec, habillés par nos amphiphiles lorsqu'ils sont en contact avec des cellules humaines. Nous pourrions ainsi prévoir leur dangerosité lors de leur utilisation industrielle, en particulier dans des situations conduisant à une exposition par inhalation, qui est la principale forme d'exposition en milieu professionnel.

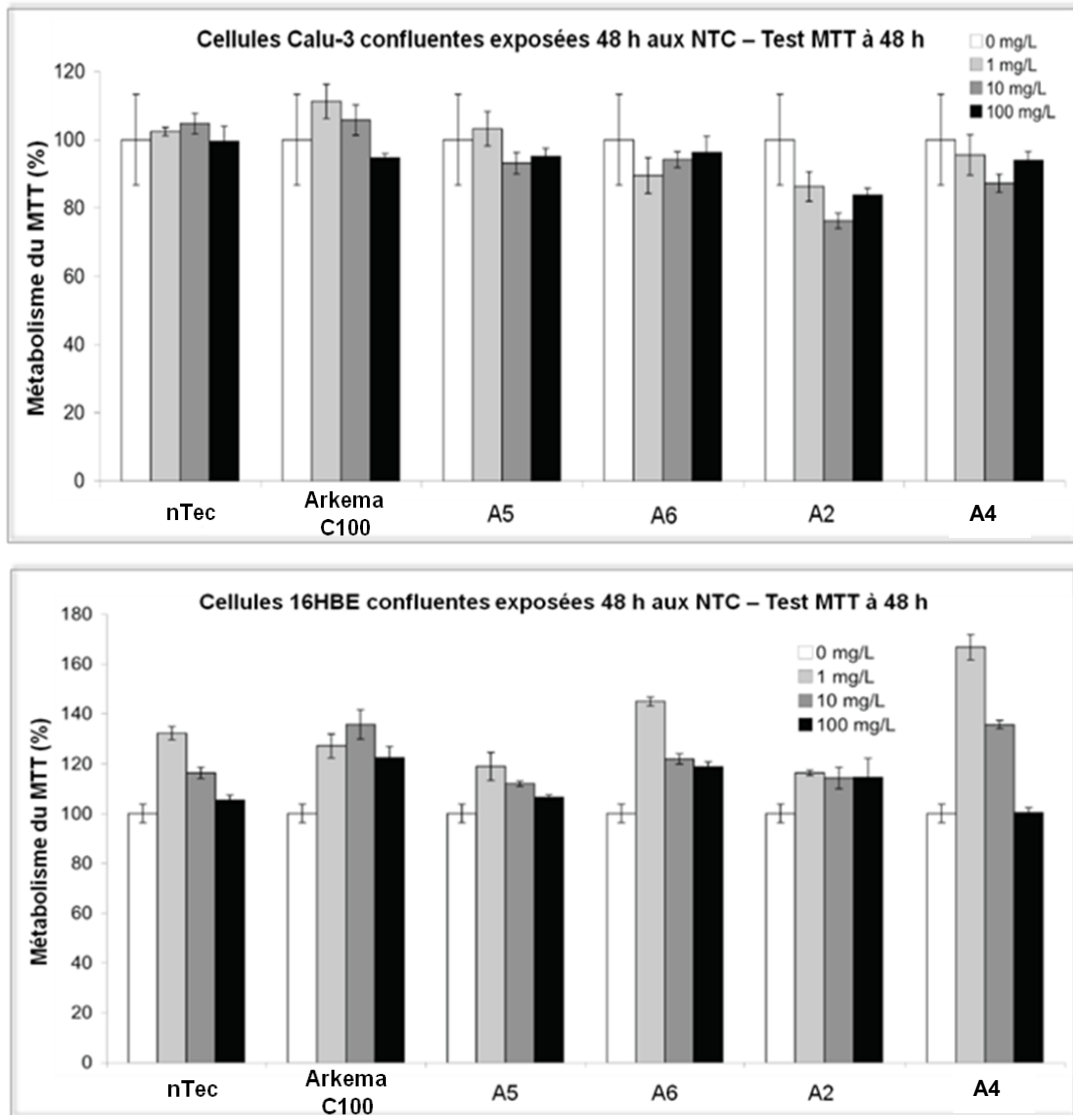
## II.1. Evaluation de la cytotoxicité des NTC couverts des différents amphiphiles sur les cellules Calu-3 et 16HBE

La cytotoxicité des nanotubes de carbone couverts par des amphiphiles synthétiques a été évaluée sur deux types de cellules : Calu-3 et 16HBE, par lecture de la viabilité cellulaire par la méthode aux sels de tétrazolium. Les cellules Calu-3 et 16HBE sont des lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines. Elles ont été choisies car dans le poumon, l'épithélium bronchique est l'une des principales cibles de l'action toxique des particules inhalées. Les manipulations ont été réalisées par l'équipe du Dr. Françoise Pons, au laboratoire de conception et application de molécules bioactives, de la faculté de pharmacie d'Illkirch. Des NTC couverts des amphiphiles à tête NTA (**A2**), PEG<sub>8</sub> (**A4**), ainsi que deux autres lipides à tête ammonium (**A5**) et maltose (**A6**) synthétisés par Laure Dehuyser, ont été testés. (Figure 6.4)



**Figure 6.4.** Structure des amphiphiles **A5** et **A6**

Deux expériences contrôles avec des NTC nTec seuls et des NTC Arkema multi parois C100 ont également été effectuées afin de comparer plusieurs types de NTC. Les échantillons de nanotubes couverts sont préparés selon le même procédé que celui décrit précédemment avec 1 mg d'amphiphile et 6 mg de NTC dans du tampon phosphate pH 7,4. Les suspensions brutes sont ensuite centrifugées 3 fois 30 minutes à 14000\*g afin d'éliminer tout l'amphiphile en excès. Avant les tests de viabilité sur cellules, le milieu aqueux est remplacé par de l'HEPES pH 7,4 afin de donner une solution mère à 6 mg de NTC. Cette solution mère est ensuite diluée dans du milieu de culture. Deux tests cellulaires ont été réalisés : un premier test sur cellules confluentes présentant un tapis cellulaire intact et mimant un épithélium normal, puis un second test sur des cellules avec 80% de confluence mimant un épithélium respiratoire « lésé ». Les résultats du premier test sont présentés dans la figure 7.4, pour des concentrations en NTC allant de 0 mg/L à 100 mg/L. Chaque essai a été réalisé trois fois.

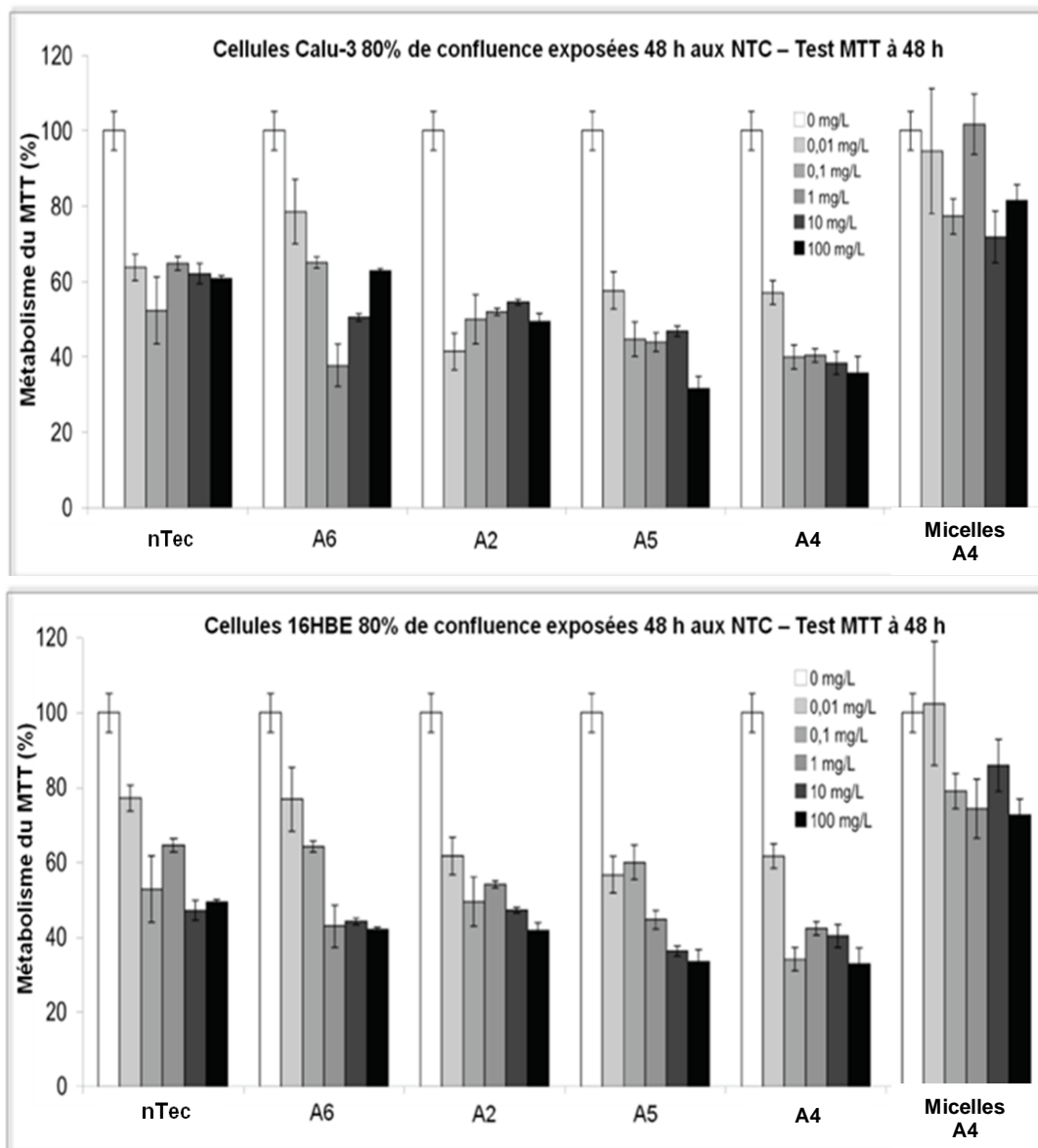


**Figure 7.4.** Tests de viabilité des NTC couverts par différents amphiphiles sur cellules Calu-3 et 16HBE

Sur les cellules Calu-3, les taux de viabilités obtenus sont proches de 100% pour les NTC seuls et couverts par les différents amphiphiles, suggérant une absence de cytotoxicité des NTC. Par contre, sur les cellules 16HBE, les taux de viabilités des cellules sont supérieurs à 100%, surtout pour l'amphiphile **A4**, possédant une tête PEG, suggérant une augmentation d'activité ou de viabilité des cellules.

La deuxième série d'expérience a été réalisée sur des cellules avec 80% de confluence, en présence de concentrations en NTC plus faibles, à cause des 160% obtenus précédemment.

D'autre part, des micelles polymérisées de l'amphiphile **A4** ont été mises en présence des mêmes cellules aux mêmes concentrations. Afin d'évaluer la quantité d'amphiphile adsorbée à la surface des NTC, nous avons voulu utiliser le même procédé que celui publié pour l'amphiphile NTA, c'est-à-dire par mesure de l'absorbance de l'amphiphile en excès après photo-polymérisation. L'échantillon brut de NTC couverts a donc été centrifugé 30 minutes à 14000\*g, mais une très petite quantité de NTC couverts restée en suspension a perturbé la mesure du spectre d'absorbance. La suspension brute a alors été diluée dix fois puis centrifugée 30 minutes, mais le spectre d'absorbance a encore révélé une infime quantité de NTC couverts qui n'a pas permis de mesurer uniquement l'absorbance des amphiphiles en excès, malgré une filtration sur filtre de 0,45 µm. Afin d'évaluer la quantité d'amphiphile adsorbée, les spectres d'absorption de la solution brute de NTC couverts et de la solution après purification ont été simplement mesurés et comparés. Le taux d'adsorption a ainsi été évalué à 74%. Ce taux est proche de celui trouvé pour l'amphiphile NTA. Ainsi, pour chaque concentration de NTC couverts d'amphiphile **A4**, nous avons évalué les concentrations en micelles correspondante et nous les avons testés sur les cellules. (Figure 8.4)



**Figure 8.4.** Tests de viabilité des NTC couverts par différents amphiphiles et des micelles d’amphiphile **A4** sur cellules Calu-3 et 16HBE

Dans cette série d’expériences, les taux de viabilité obtenus se situent entre 40 et 60% pour tous les types de NTC, seuls ou couverts par les différents amphiphiles. Cette baisse de la viabilité n’est pas surprenante car les cellules utilisées n’étaient pas confluentes à 100%, et présentait donc une plus grande sensibilité vis-à-vis des NTC. D’autre part, les micelles de **A4** ne sont montrées que peu toxiques. Cependant, en comparant les résultats des NTC couverts entre eux, la conclusion est la même que la première série d’échantillons : la modification de la surface des NTC ne se traduit pas par une cytotoxicité supérieure aux NTC.

## II.2. Conclusion

Les expériences menées pour étudier la cytotoxicité de nanotubes de carbone nTec habillés par des amphiphiles diacétyléniques munis de différentes têtes polaires ont conduit à montrer qu'aucune différence de cytotoxicité ne pouvait être mise en évidence, sur deux types de cellules épithéliales bronchiques humaines. Cependant, la toxicité des NTC est connue pour être chronique et la mise en place d'un modèle *in vivo* serait plus prédictif de la toxicité des NTC couverts par nos amphiphiles. Il serait ainsi intéressant de travailler sur l'animal par expositions répétées aux NTC et d'étudier leurs effets à long terme. Ainsi, nous pourrions observer soit des phénomènes d'accumulation, soit une meilleure élimination que pour des NTC seuls, ce qui pourrait montrer une réduction des risques à long terme.

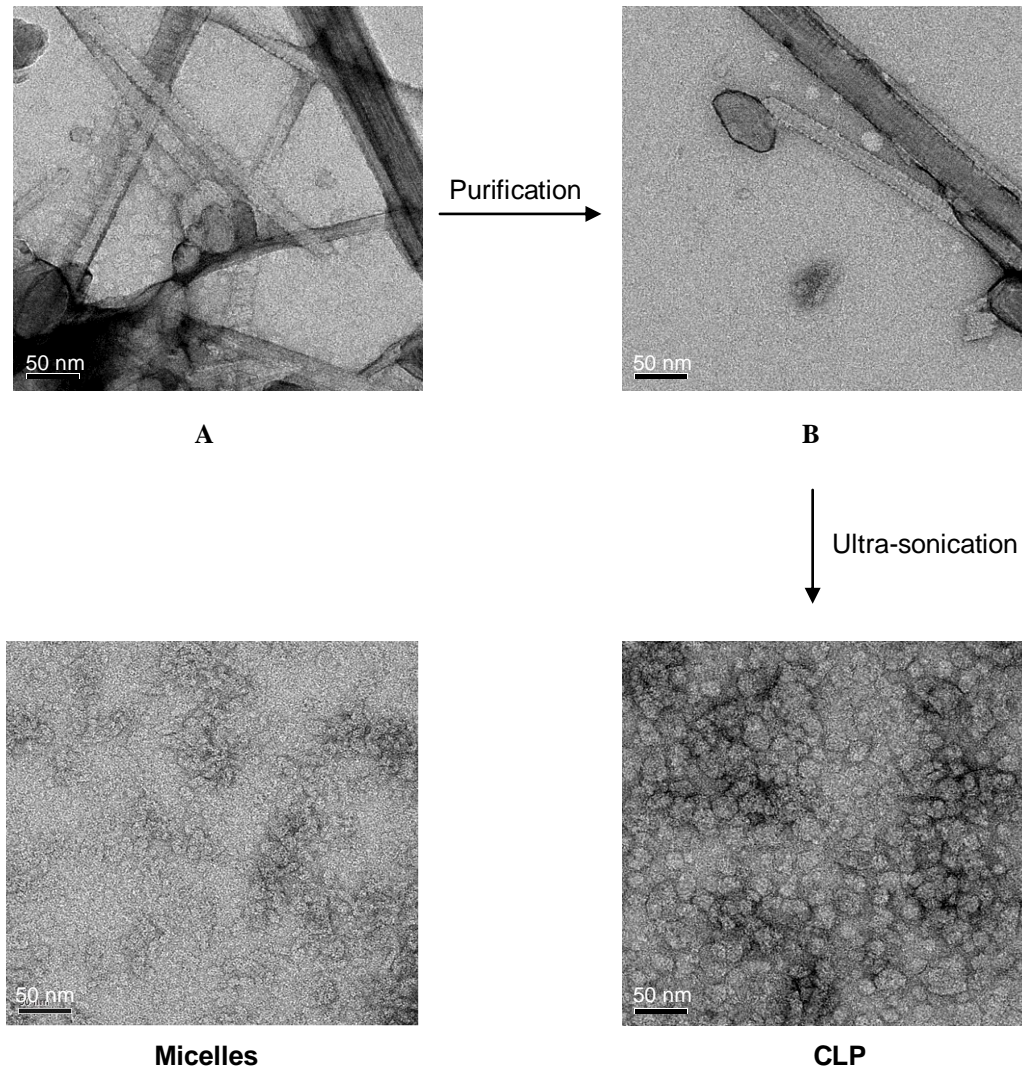
## III. Formation et fonctionnalisation des constructions lipidiques polymérisées

### III.1. Constructions lipidiques polymérisées de l'amphiphile **A1**

La formation des constructions lipidiques polymérisées (CLP) composées d'amphiphiles portant une tête polaire NTA ont été synthétisés a été détaillée dans le chapitre 1. Après adsorption, photo-polymérisation et purification, les CLP sont extraits en milieu biphasique par ultra-sonication.

Nous allons présenter ici la formation de CLP à partir de l'amphiphile **A1**. Pour cela, **A1** est dissous dans une solution de Tris pH 10 à 1 mg/mL, plus quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium 1 N. 1 mL de NTC nTec (10 mg/mL) sont ensuite ajoutés à 1 mL de solution de **A1** et le mélange est soniqué 30 minutes au bain à ultra-sons. La solution est ensuite photopolymérisée et purifiée par centrifugation afin d'éliminer les micelles en excès. Les nanotubes de carbone, resuspendus dans une solution de Tris pH 11, sont alors observés en MET et les photos montrent qu'ils sont couverts de striations, correspondant aux

amphiphiles auto-arrangés. (Figure 9.4, **B**) Par la suite, les CLP sont extraits par ultra-sonication et la mesure en DLS montre qu'ils ont un diamètre de 60 nm. Les images de microscopie montrent quant à elles, des objets de 30-40 nm. (Figure 9.4, **CLP**)



**Figure 9.4.** Images MET des différents étapes de la synthèse des CLP. Après photo-polymérisation (1<sup>ère</sup> ligne à gauche) et après purification (1<sup>ère</sup> ligne à droite). Comparaison avec les micelles formées à partir d'amphiphile **A1**. Concentration : 0,1 mg/mL dans le Tris pH 11. Barre d'échelle : 50 nm

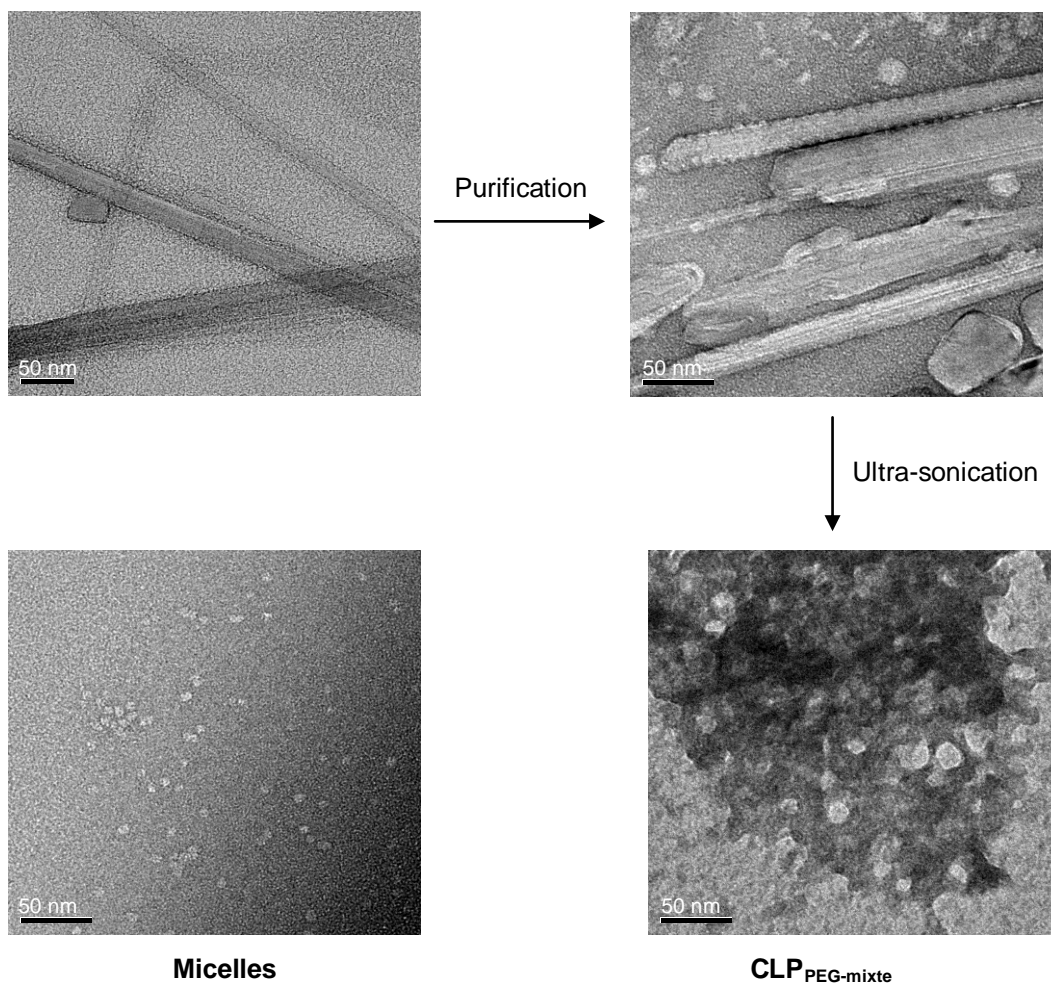
La comparaison entre les micelles et les CLP d'amphiphiles **A1** en MET montrent que les structures possèdent des formes sphériques mais avec des tailles différentes. Le processus permet donc de synthétiser des CLP possédant un diamètre plus grand que les micelles. La prochaine étape est de fonctionnaliser ces CLP afin d'étudier leur comportement *in vivo*. Cette étude a été menée en partenariat avec les équipes de Bernard Tavitian, au CEA d'Orsay et

d'Eric Doris, au CEA de Saclay. Les micelles et les CLP devaient être injectées à des souris afin d'étudier leur biodistribution. En ce qui concerne les CLP de l'amphiphile **A1**, la fonctionnalisation de surface avec le fluorophore Fluoprobes 730 réalisée au CEA n'a pas abouti. Nous nous sommes alors logiquement tournés vers la synthèse de CLP issus de l'amphiphile possédant une tête polyéthylène glycol, c'est-à-dire **A4**, en mélange avec l'amphiphile **25**, muni d'un acide carboxylique terminal. La présence des groupes polyéthylène glycol devrait augmenter le temps de circulation dans le corps et la fonctionnalisation devrait être plus aisée.

### III.2. Constructions lipidiques polymérisées de l'amphiphile **A4**

La synthèse de l'amphiphile **A4** ou **23**, a été décrite dans le chapitre 3, de même que la synthèse de l'amphiphile **25**. Un mélange 50/50 en masse est dissous dans de l'eau à une concentration de 1 mg/mL. 1 mL de NTC nTec (10 mg/mL) sont ensuite ajoutés à 1 mL de solution d'amphiphiles et le mélange est soniqué 30 minutes au bain à ultra-sons. La solution est ensuite soniquée, centrifugée puis le culot est ultra-soniqué pour récupérer les CLP<sub>PEG-mixte</sub>. Les images MET prises aux différentes étapes du processus sont présentées dans la figure 10.4. Les solutions ont été réalisées dans de l'eau, seules les CLP<sub>PEG-mixte</sub> ont été directement placées dans le tampon phosphate pour une utilisation *in vivo*. L'utilisation d'une solution dans le tampon phosphate fournit cependant des images de mauvaise qualité, car ce tampon cristallise sur la grille de MET.





**Figure 10.4.** Images MET des différents étapes de la synthèse des CLP. Après photo-polymérisation (1<sup>ère</sup> ligne à gauche) et après purification (1<sup>ère</sup> ligne à droite). Comparaison avec les micelles formées à partir du mélange des amphiphiles **23** et **25** (MP<sub>PEG-mixte</sub>) Concentration : 0,1 mg/mL. Barre d'échelle : 50 nm

Les CLP<sub>PEG-mixte</sub> ainsi obtenues possèdent un diamètre de 41 nm en DLS. Par la suite, nous avons voulu marquer ces CLP<sub>PEG-mixte</sub> par fonctionnalisation des têtes acide présentes à la surface des CLP afin de comparer leur biodistribution avec celles des MP<sub>PEG-mixte</sub>. Ainsi, la solution de CLP<sub>PEG-mixte</sub> dans le tampon phosphate pH 8 a été mise à réagir avec de l'EDAC (1 eq), NHS-Sulfo (1 eq) et le Fluoroprobes 730 (2 eq), comme cela avait été fait avec les micelles MP<sub>PEG-mixte</sub> dans le chapitre 3. La solution est ensuite agitée 14 heures puis purifiée par gel Biospin 30. Le pourcentage de fluorophore récupéré correspond à 1,35% d'acides carboxyliques, soit 9 nmoles au total dans trois échantillons différents, ce qui était suffisant

pour faire trois injections à des souris. Comme nous avons très peu de CLP, nous n'avons pas réalisé de réaction de contrôle sans agent de couplage. Pour les manipulations *in vivo*, 3 nmol de fluorophore devaient être disposés dans 500  $\mu\text{L}$  de solution. Chacun de nos échantillons contenant 1 mL de solution après purification, nous avons dû les concentrer sous pression réduite. Cependant, après séchage de l'échantillon, la redissolution s'est révélée problématique. En effet, lorsque les échantillons ont été analysés, la fluorescence était localisée et non dispersée dans le milieu. Cette mauvaise redissolution montre que le fluorophore après filtration n'était pas fixé de façon covalente sur les acides carboxyliques des CLP<sub>PEG-mixte</sub>, mais devait être encapsulé dans leur cœur hydrophobe. La comparaison de la biodistribution des micelles et des CLP n'a malheureusement pas pu être menée à terme. Nous pouvons également nous demander si la synthèse de CLP formées de deux amphiphiles a été possible et si les structures obtenues ont été extraites correctement des nanotubes de carbone.

#### **IV. Conclusion**

L'utilisation d'amphiphiles polymérisables qui ont la capacité de former des micelles à différents pH a permis de mettre au point une méthode de suspension des nanotubes de carbone en solution aqueuse. Le principal avantage de cette technique est que l'on peut prévoir la stabilité des suspensions de NTC en fonction de la tête polaire fixée sur l'amphiphile. Ainsi, un amphiphile s'auto-arrangeant sous forme de micelles à un certain pH, pourra suspendre des NTC à ce même pH. D'autre part, si le pH de la suspension est modifié de telle sorte que l'amphiphile ne forme plus de micelles, les NTC s'agrègeront et décanteront rapidement. Nous avons également montré que ces conditions pH-dépendantes étaient réversibles. Ainsi, des NTC couverts par nos amphiphiles pourraient être utilisés dans différents domaines, notamment dans le domaine médical, puisque nous avons vu qu'aucune cytotoxicité ne pouvait être mise en évidence sur deux types de cellules épithéliales

bronchiques humaines non lésées. D'autre part, nous avons voulu extraire les constructions lipidiques polymérisées pégylées issues des NTC et les fonctionnaliser pour comparer leur biodistribution à celles des micelles polymérisées formées avec le même amphiphile. Nous n'avons cependant pas réussi à produire des CLP fonctionnalisés et la comparaison n'a pas pu être achevée.

## Références

- (1) Contal, E.; Morère, A., Thauvin, C.; Perino, A.; Meunier, S.; Mioskowski, C.; Wagner, A. Photopolymerized lipids self-assembly for the solubilization of carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5718-5722
- (2) Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* **1991**, *354*, 56-58
- (3) Ménard-Moyon, C.; Kostarelos, K. ; Prato, M. ; Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes for probing and modulating molecular functions, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 107-115
- (4) Lacerda, L.; Bianco, A.; Prato, M. ; Kostarelos, K. Carbon nanotube cell translocation and delivery of nucleic acid *in vitro* and *in vivo*, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 17-22
- (5) Kam, N.W.S.; Liu, Z.; Dai, H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12492-12493
- (6) Liu, Z.; Winters, M.; Holodniy, M.; Dai, H. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotubes transporters, *Angew.Chem.*, **2007**, *46*, 2023-2027
- (7) Ilbasimis-Tamer, S.; Yilmaz, S.; Banoglu, E.; Degim, I.T. Carbon nanotubes to deliver drug molecules, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 20-27
- (8) Yu, X.; Zhang, Y.; Chen, C.; Yao, Q.; Li, M. Targeted drug delivery in pancreatic cancer, *Biochim. Biophys. acta* **2010**, *1805*, 97-104
- (9) Singh, I.; Rehni, A.K.; Kumar, P.; Kumar, M.; Aboul-Enein, H.Y. Carbon nanotubes : synthesis, properties and pharmaceutical applications, *Fullerenes, Nanotubes and carbon nanostruct.* **2009**, *17*, 361-377
- (10) Cherukuri, P.; Bachilo, S.M.; Litovsky, S.H.; Weisman, R.B. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15638-15639
- (11) Hu, X.; Cook, S.; Wang, P.; Hwang, H.M.; Liu, X.; Williams, Q.L. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines, *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 1812-1817
- (12) Dumortier, H.; Lacotte, S.; Pastorin, G.; Marega, R.; Wu, W.; Bonifazi, D.; Briand, J.P.; Prato, M.; Muller, S.; Bianco, A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells, *Nano Lett.* **2006**, *7*, 1522-1528
- (13) Reddy, A.R.N.; Reddy, Y.N.; Krishna, D.R.; Himabindu, V. Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells, *Toxicology*, **2010**, *272*, 11-16
- (14) Anreddy, R.N.R.; Yellu, N.R.; Devarakonda, R.K.; Vurimindi, H. *In vitro* toxicity of multi wall carbon nanoparticles on Hep G32 liver cell lines, *J.Pharmacol.Toxicol.*, **2010**, *5*, 146-151
- (15) Lin, C.; Fugetsu, B.; Su, Y.; Watari, F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* T87, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *170*, 578-583

- (16) Alpatova, A.L.; Shan, W.; Babica, P.; Upham, B.L.; Rogensues, A.R.; Masten, S.J.; Drown, E.; Mohanty, A.K.; Alocilja, E.C.; Tarabara, V.V. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization : effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions, *Water Res.* **2010**, *44*, 505-520
- (17) Dong, L.; Joseph, K.L.; Witkowski, C.M.; Craig, M.M. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants, *Nanotechnology*, **2008**, *19*, 1-5
- (18) Lee, Y.; Geckeler, K.E. Carbon nanotubes in the biological interphase : the relevance of noncovalence, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4076-4083
- (19) Simeonova, P.P. Update on carbon nanotube toxicity, *Nanomedicine*, **2009**, *4*, 373-375
- (20) Liu, A. ; Sun, K. ; Yang, J. ; Zhao, D. Toxicological effects of multi-wall carbon nanotubes in rats, *J. Nanoparts Res.* **2008**, *10*, 1303-1307
- (21) Tong, H.; McGee, J.K.; Saxena, R.K.; Kodavanti, U.P.; Devlin, R.B.; Gilmour, M.I. Influence of acid functionalization on the cardiopulmonary toxicity of carbon nanotubes and carbon black particles in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *239*, 224-232



# **CHAPITRE 5**

## **Etude structurale de nanotubules formés à partir d'amphiphiles polydiacétyléniques**



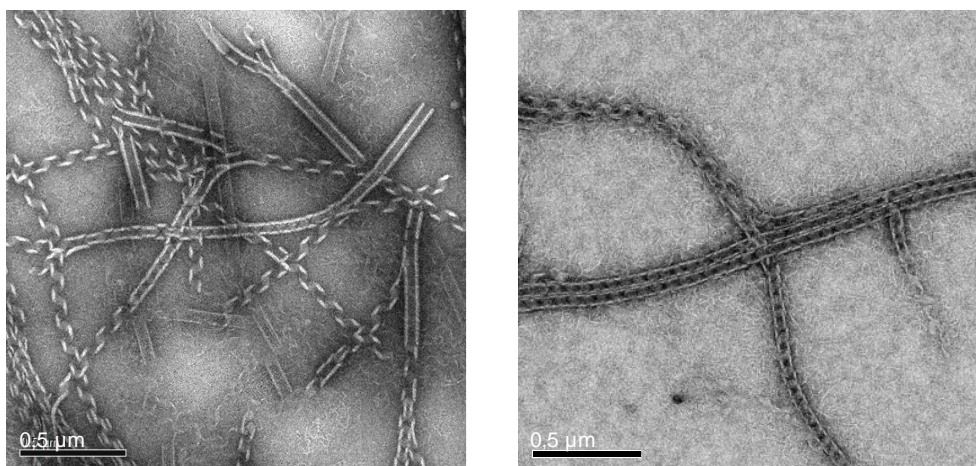


## Chapitre 5

# Etude structurale de nanotubules formés à partir d'amphiphiles polydiacétyléniques

---

Parmi les différents amphiphiles synthétisés, un seul a révélé des auto-arrangements différents des autres. Alors que les amphiphiles décrits précédemment s'auto-arrangeaient en micelles sphériques, celui-ci formait des nanotubules et des hélices. (Figure 1.5) Nous avons alors décidé d'étudier en détail ses auto-arrangements en collaboration avec Dr. Philippe Mesini, du laboratoire des systèmes complexes moléculaires et macromoléculaires Organisés, situé à l'Institut Charles Sadron.



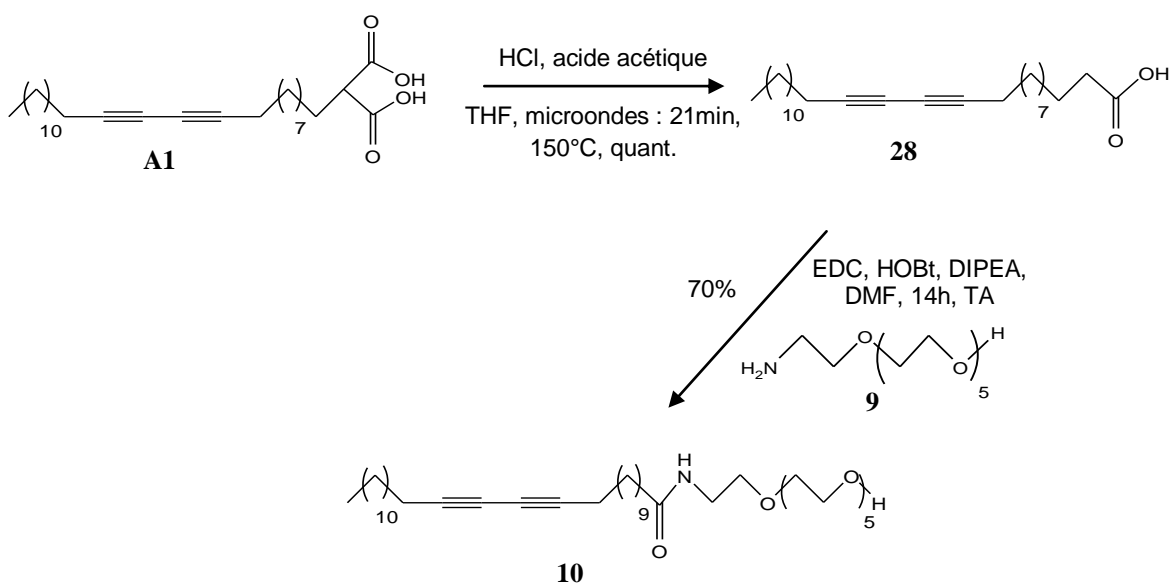
**Figure 1.5.** Photos de MET des auto-arrangements obtenus sous forme de nanotubules et hélices.  
Concentration : 1 mg/mL, échelle : 0,5μm

D'après nos recherches bibliographiques, les amphiphiles diacétyléniques simples chaînes formant des auto-arrangements tubulaires ont tous été synthétisés à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque et d'une tête polaire variable. Ces amphiphiles possédaient une tête polaire chirale, comme un acide aminé<sup>1</sup> et un glycolpyranose<sup>2</sup>, ou deux têtes polaires, afin

d'obtenir un bolaamphiphile.<sup>3</sup> La présence d'un centre chiral sur les molécules a longtemps paru indispensable pour former des nanotubules. Ces dernières années, quelques études ont cependant montré que l'utilisation de molécules achirales permettait également leur formation, dont des amphiphiles composés d'une mono-chaîne diacétylénique et d'une tête polaire.<sup>4-5</sup> A notre connaissance, le seul amphiphile diacétylénique mono-chaîne formant des nanotubules a été décrit par Lee *et coll.*<sup>6</sup>. Cet amphiphile a une structure proche de celle de l'amphiphile que nous avons synthétisé par sa chaîne hydrophobe, mais également différente par sa tête polaire. En effet, notre amphiphile possède une tête polaire neutre, contrairement à celle de Lee *et coll.*, qui est ionique. L'étude présentée dans cette partie, porte donc sur la description des auto-arrangements d'un des rares amphiphiles mono-chaîne diacétylénique muni d'une tête polaire neutre formant des nanotubules.

## I. Synthèse de l'amphiphile 10

L'amphiphile formant ces auto-arrangements particuliers était un sous-produit d'une synthèse présentée dans le chapitre 2. Une voie de synthèse plus directe a donc été mise au point afin d'introduire un carbone supplémentaire entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile constituée d'une tête pégylée à six chaînons. L'acide 10,12-pentacosadinoïque a ainsi été réduit puis modifié en diméthylmalonate et saponifié pour obtenir l'amphiphile **A1**. Le diacide **A1** a ensuite été décarboxylé pour obtenir le composé **28**. L'acide ainsi obtenu a été engagé dans un couplage avec l'amine primaire du composé **9**, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 2, afin de fournir l'amphiphile **10** désiré. (Figure 2.5)



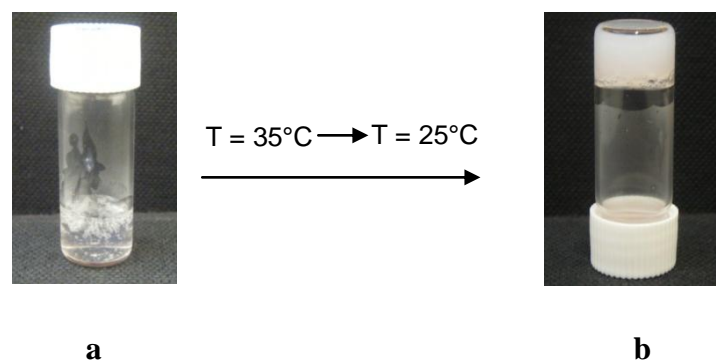
**Figure 2.5.** Schéma de synthèse de l'amphiphile **10** à partir de l'amphiphile **A1**

## II. Etude des auto-arrangements de l'amphiphile **10**

### II.1. Propriétés de solubilité

A une concentration de 1 mg/mL dans l'eau, l'amphiphile **10** n'est pas soluble à 25°C. D'autre part, une sonication de 30 minutes au bain à ultrasons ne provoque pas de dissolution. Quand le mélange amphiphile **10**/H<sub>2</sub>O est chauffé à 35°C, l'amphiphile se dissout et la solution devient limpide. Après refroidissement à température ambiante, la solution reste limpide et se trouble après quelques heures. Les solutions obtenues seront observées en MET au cours de l'étude, afin d'analyser les auto-arrangements obtenus.

Pour des mélanges **10**/H<sub>2</sub>O dont la concentration dépassait 10 mg/mL, le produit se dissout à 35°C, mais lorsque la solution est refroidie à 25°C, elle forme un gel. (Figure 3.5, **a**) Cette propriété de former des hydrogels à forte concentration est connue pour les molécules qui s'auto-arrangent sous forme de tubules, comme les bola-amphiphiles.



**Figure 3.5.** Observations préliminaires des auto-arrangements de l'amphiphile **10**. **a** : 10 mg/mL dans H<sub>2</sub>O après chauffage à 35°C, **b** : 10 mg/mL dans H<sub>2</sub>O après chauffage à 35°C puis refroidissement à 25°C

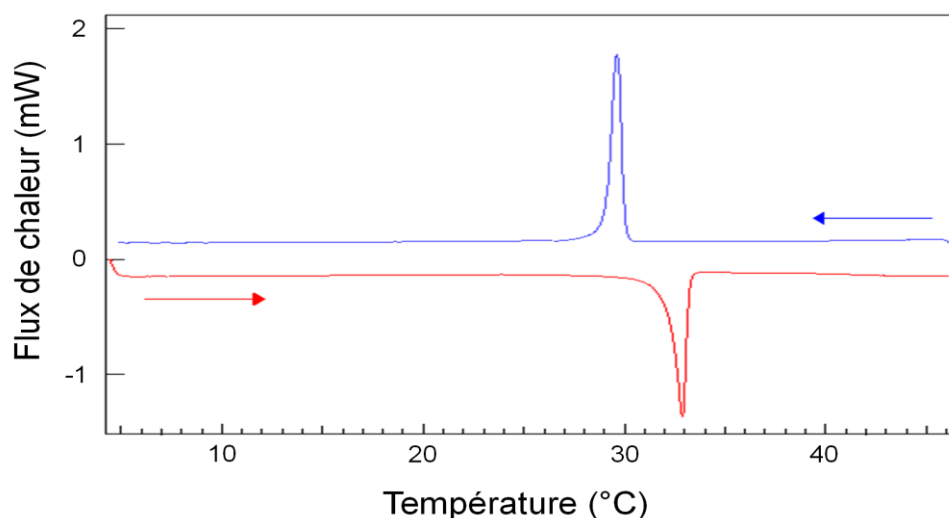
Les premières observations nous ont permis de mettre en place un plan d'étude de ces auto-arrangements, en commençant par l'étude du gel. Pour chaque concentration, le protocole de synthèse est le même : les solutions sont chauffées sous agitation à 35°C puis laissées refroidir à température ambiante.

## II.2. Etude du gel

Nous avons observé qu'après formation du gel, un nouveau chauffage permettait de les retransformer en solution, ce qui montre le caractère thermoréversible de ce gel. Cette thermoréversibilité indique que la structure du gel est assurée par des liaisons non covalentes. Pour identifier et quantifier les interactions mises en jeu, nous avons étudié le gel en calorimétrie différentielle à balayage ou DSC (differential scanning calorimetry ou calorimétrie différentielle à balayage) et en infrarouge (FTIR : Fourier transform infrared spectrophotometry ou spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier).

## II.2.1. Mesure de l'enthalpie de dissociation du gel par calorimétrie différentielle à balayage

La transition sol-gel de l'amphiphile **10** a été étudiée grâce à un gel d'une concentration de 10 mg/mL. Le thermogramme montre un pic endothermique étroit à 33°C, débutant à 32.2°C, indiquant une transition du premier ordre. (Figure 4.5, courbe rouge) L'enthalpie associée à cette transition a une valeur de 42 kJ.mole<sup>-1</sup>.



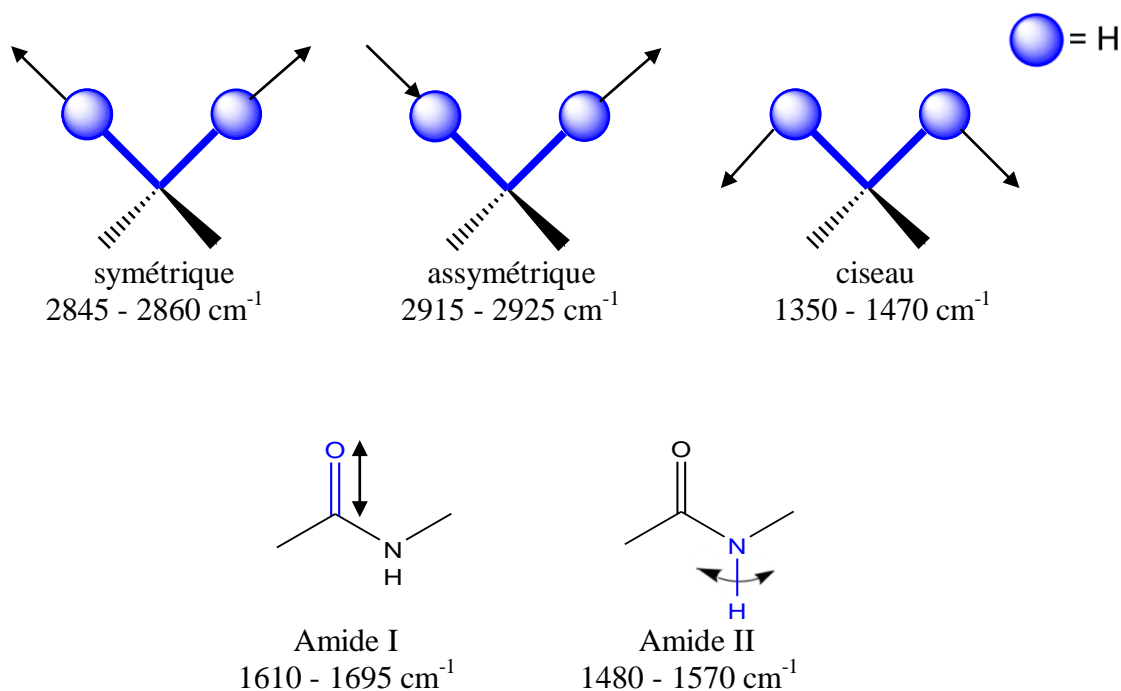
**Figure 4.5.** Thermogramme du gel de l'amphiphile **10** à une concentration de 10 mg/mL. Chauffage : courbe rouge, refroidissement : courbe bleue

Le refroidissement du même gel précédemment chauffé fournit un pic exothermique à 29°C, débutant à 29.5°C, avec une légère hystérèse. (Figure 4.5, courbe bleue) Par contre, la valeur absolue de l'enthalpie calculée (- 48 kJ.mol<sup>-1</sup>) est identique à celle observée pendant le chauffage, aux erreurs expérimentales près. Ces études montrent que l'on a une transition de premier ordre, compatible avec une transition ordre-désordre. La transition correspond donc au passage du gel, qui est constitué des arrangements, à la solution contenant la dissociation des agrégats. L'enthalpie trouvée reflète la somme des énergies d'interaction non-covalentes mises en jeu pendant la transition. Elle comprend les forces de Van der Waals et les liaisons H entre les amides. Il est à noter que les températures de transition et les enthalpies trouvées sont proches de celles obtenues dans le cas de phospholipides polymérisables<sup>7</sup> ou de

bolaamphiphiles.<sup>8</sup> A titre d'exemple, le phospholipide DC<sub>8,9</sub>PC possède un pic exothermique à 42,5°C avec une enthalpie de - 17,8 kcal.mol<sup>-1</sup> et un pic endothermique à 31,5°C avec une enthalpie de 18,9 kcal.mol<sup>-1</sup>.

## II.2.2. Etude des interactions dans le gel par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

Avant d'exposer les résultats obtenus par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier ou FTIR, les principales bandes caractéristiques obtenues en infrarouge ont été regroupées dans la figure 5.5, afin de comprendre l'analyse présentée dans la suite de ce paragraphe. Les vibrations des liaisons mesurées en infrarouge dépendent de la nature de la liaison, mais également de la façon dont elle vibre. Les hydrogènes des groupes CH<sub>2</sub> peuvent ainsi vibrer selon 6 modes. Parmi ces modes de vibration, ceux qui peuvent être exploités dans nos spectres sont les vibrations d'élongation (stretching), qui peuvent être symétriques ( $\nu_s$ ) ou asymétriques ( $\nu_{as}$ ) et les vibrations de cisaillement (scissoring). (Figure 5.5, ligne 1) Pour des chaînes alkyle, le nombre d'onde des bandes  $\nu_s$  et  $\nu_{as}$  se trouve dans les intervalles 2848-2952 cm<sup>-1</sup> et 1918-1925 cm<sup>-1</sup>. Au sein de ces intervalles, le nombre d'onde dépend de la façon dont sont organisées les chaînes alkyle : plus les chaînes sont désordonnées, plus les nombres d'onde sont élevés.<sup>9-10-11</sup> D'autre part, les principales bandes de vibrations des liaisons amide I et II sont également observées dans de tels auto-arrangements et sont présentées dans cette même figure. (Figure 5.5, ligne 2)

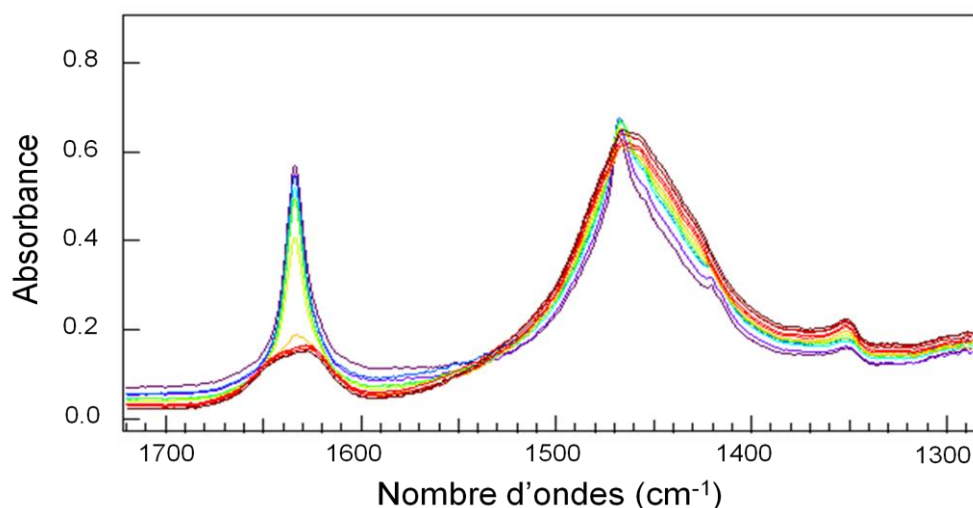


**Figure 5.5.** Bandes caractéristiques en infrarouge de différents groupements chimiques

Les bandes de vibrations des amides I et II peuvent fortement varier selon qu'elles sont liées par liaisons hydrogène ou pas.<sup>12-13-14</sup> En ce qui concerne les amides I, le nombre d'onde diminue lors de la formation de liaisons hydrogène. Le phénomène inverse se produit pour les amides II, pour lesquelles le nombre d'onde augmente avec la présence de liaisons hydrogène. Ainsi, l'analyse des bandes des amides I et II permettent de caractériser la présence de liaisons hydrogène dans les auto-arrangements.

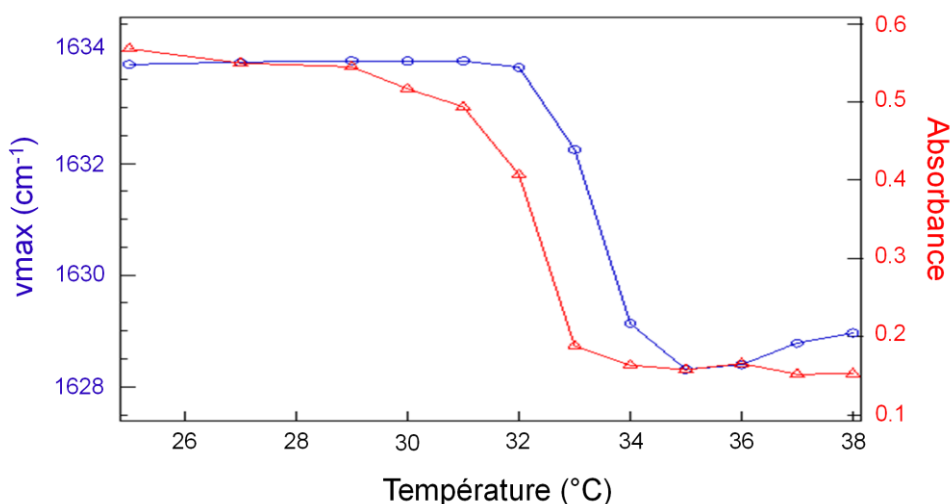
Le gel de l'amphiphile **10** a ainsi été préparé à une concentration de 1% massique dans l'eau deutérée, afin d'éviter un recouvrement du signal par les larges bandes de l'eau. La première partie du spectre à 25°C montre une bande à 1634  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la bande amide I. La fréquence de cette bande est caractéristique des groupements amides reliés entre eux par des liaisons hydrogène. Lorsque la température augmente, l'intensité de cette bande diminue énormément, indiquant la perte de ces liaisons hydrogène. (Figure 6.5, courbes orangée et

rouge) Le spectre montre également une bande entre 1400 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Cette large bande comprend la bande amide II mais elle est couverte par la forte intensité de la bande à 1467  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de cisaillement des groupes  $\text{CH}_2$ .



**Figure 6.5.** Spectre FTIR entre 1290 et 1720  $\text{cm}^{-1}$  de l'amphiphile **10** à 10 mg/mL dans  $\text{D}_2\text{O}$  à 25°C à 38°C

La figure 7.5 représente les variations de la fréquence (courbe bleue) et de l'absorbance maximale du pic (courbe rouge) de la bande amide I lors de cette mesure. Un changement brusque se produit pour une température de 33-34°C : la bande amide I baisse d'intensité, tout en diminuant à 1628  $\text{cm}^{-1}$ .

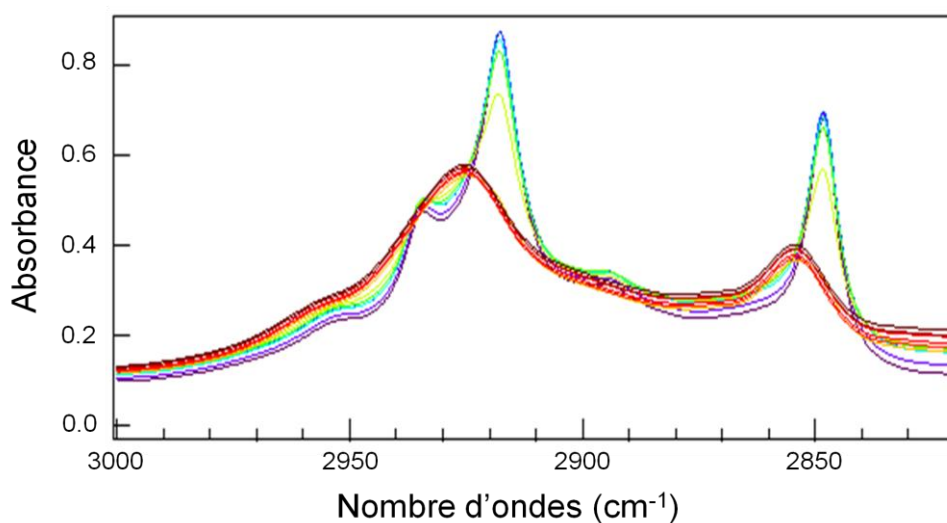


**Figure 7.5.** Nombre d'ondes et absorbances en fonction de la température du maximum de la bande amides I de l'amphiphile **10** à 10 mg/mL



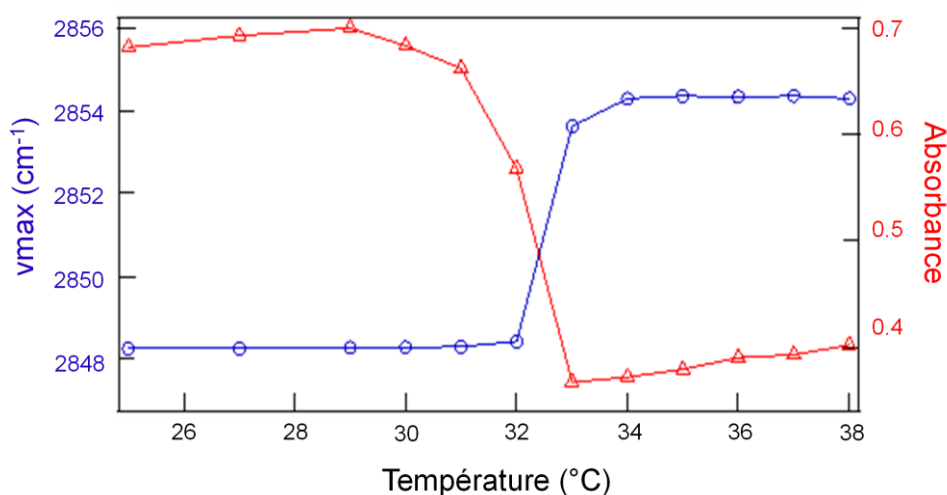
Ces changements coïncident avec la transition sol-gel. La transformation de la bande des amides I montre la modification des liaisons hydrogène reliant les amides. Au-delà de 34°C, la bande de l'amide I est en réalité déconvoluée en deux pics : le premier à 1628 cm<sup>-1</sup>, décrit précédemment, et le second à 1647 cm<sup>-1</sup>. Ce dernier est caractéristique de la présence de liaisons hydrogène plus faibles que dans l'état gel et il peut indiquer la présence de liaisons hydrogène avec l'eau. Le pic à 1628 cm<sup>-1</sup> indique des liaisons hydrogène plus fortes que dans le gel et est probablement dû à des liaisons amphiphile-amphiphile. Cela laisse penser que la dissociation des auto-arrangements de l'amphiphile **10** ne conduit pas à des molécules isolées, mais à des oligomères comprenant deux types de liaisons hydrogène, certaines entre les molécules d'amphiphile et d'autres avec le solvant.

Dans les hautes fréquences, le spectre montre une série de pics correspondant aux vibrations d'élongation des CH<sub>2</sub>. A température ambiante, les deux bandes les plus intenses sont mesurées à 2848 cm<sup>-1</sup> et 2918 cm<sup>-1</sup>. Elles correspondent respectivement aux vibrations symétriques et asymétriques des CH<sub>2</sub>. Les valeurs trouvées sont proches de celles des paraffines cristallines, ce qui indique que les chaînes sont toutes ordonnées et en configuration trans. (Figure 8.5)

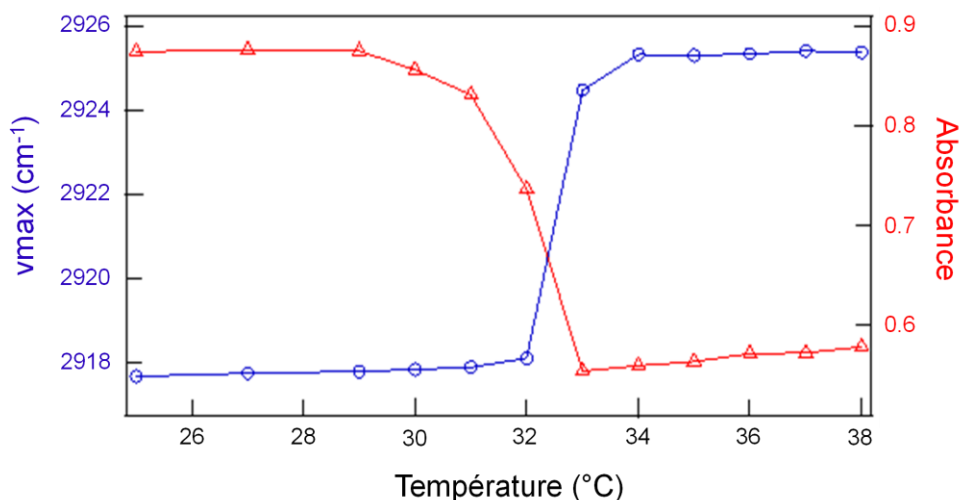


**Figure 8.5.** Spectre FTIR entre 2820 et 3000 cm<sup>-1</sup> de l'amphiphile **10** à 10 mg/mL dans D<sub>2</sub>O de 25°C à 38°C

Lorsque la température augmente, les fréquences de ces bandes augmentent brusquement de 2848 à 2854  $\text{cm}^{-1}$  et de 2915 à 2924  $\text{cm}^{-1}$  entre 32°C et 33°C. Ces déplacements sont caractéristiques de l'augmentation du nombre de « conformations gauches » dans la chaîne alkyle et montent clairement qu'elles ne sont plus ordonnées. Les variations en fréquences et intensités en fonction de la température des bandes  $\nu_s$  et  $\nu_{as}$  sont représentées figures 9.5 et 10.5. Les brusques modifications coïncident avec la transition observée sur les courbes de DSC, ce qui montre que cette transition s'accompagne d'une évolution vers un désordre des chaînes alkyles.



**Figure 9.5.** Nombre d'ondes et absorbances en fonction de la température de l'amphiphile **10** à 10 mg/mL pour les vibrations  $\nu_s$  des  $\text{CH}_2$



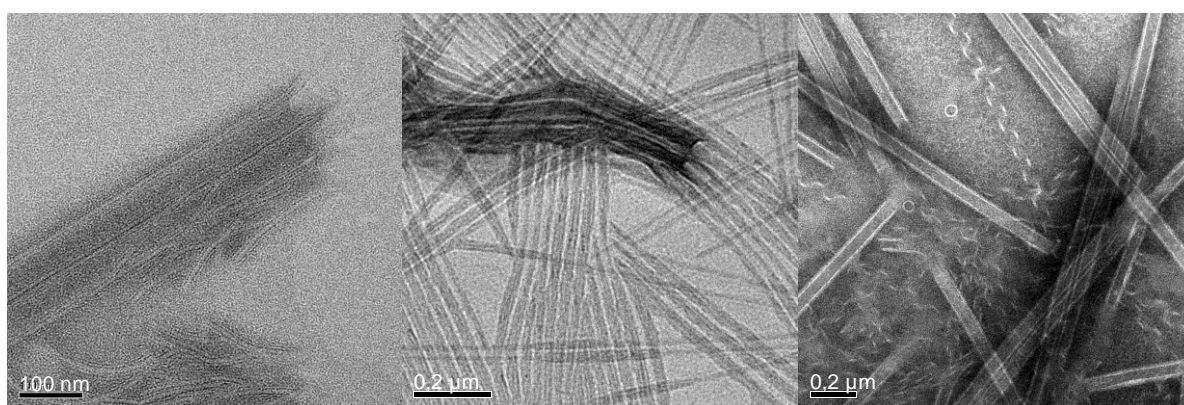
**Figure 10.5.** Nombre d'ondes et absorbances en fonction de la température de l'amphiphile **10** à 10 mg/mL pour les vibrations  $\nu_{\text{asy}}$  des  $\text{CH}_2$

Les études réalisées en FTIR ont permis de déterminer les changements structuraux qui interviennent lors de la transition gel-sol vers 33°C. En effet la transition s'accompagne :

- ✓ d'une réorganisation des liaisons hydrogène entre les amides, où l'on observe une diminution du nombre de liaisons hydrogène entre amphiphiles voisins,
- ✓ d'un désordre dans les chaînes alkyles comparable à une transition solide-liquide.

### II.2.3. Etude des solutions d'amphiphile **10** en MET et Cryo-MET

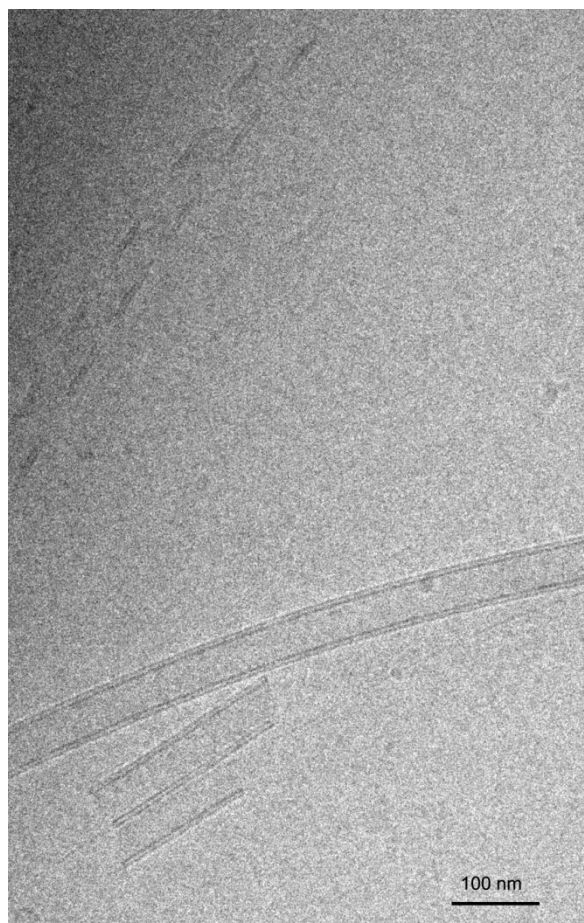
La structure des agrégats a été étudiée par microscopie électronique. Une solution à 1 mg/mL dans de l'eau a été déposée directement sur une grille de carbone puis colorée à l'acétate d'uranyle. Les photos montrent principalement des hélices de plusieurs micromètres de longueur. Le diamètre des hélices est d'environ 60 nm et les parois ont des épaisseurs entre 17 et 19 nm. D'autre part, des nanotubules sont observés, certaines semblant contenir plusieurs rainures qui apparaissent en blanc. Ces nanotubules mesurent plusieurs micromètres de longueur et possèdent des diamètres d'environ 70 nm. (Figure 11.5)



**Figure 11.5.** Images MET des auto-arrangements de l'amphiphile **10** à une 1 mg/mL dans l'eau

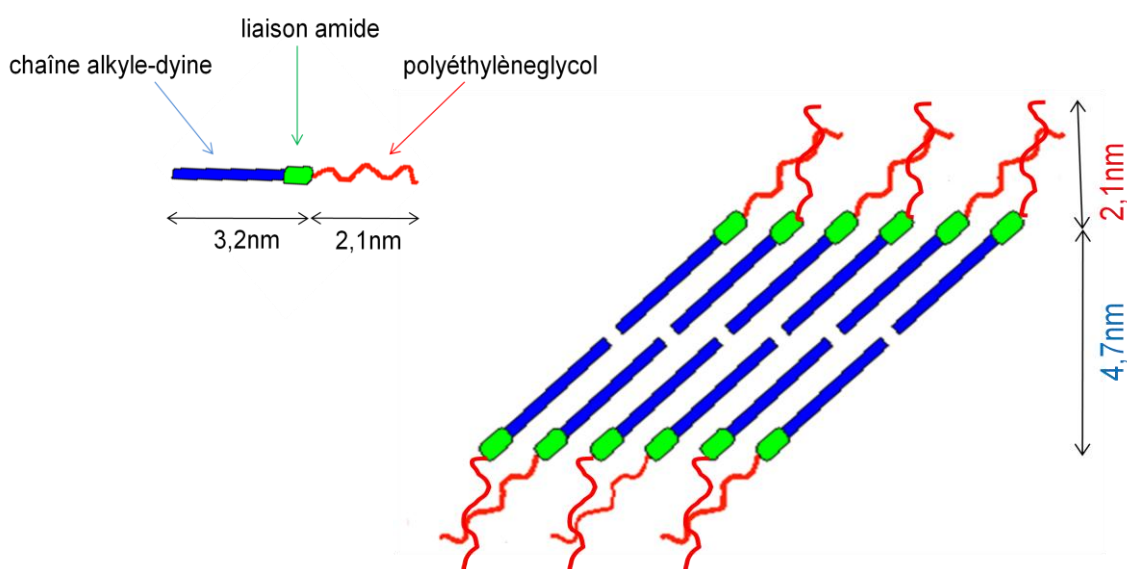
La coloration utilisée étant négative, les parties hydrophobes paraissent avoir une couleur plus claire que le fond de la grille. Ces mesures ne prennent donc pas en compte les parties polyéthylène glycol, hydrophiles, des auto-arrangements.

C'est pourquoi nous avons étudié les arrangements par cryo-MET avec l'aide du Dr. Marc Schmutz. Cette technique a l'avantage de ne pas utiliser de coloration par un agent de contraste. Les contrastes obtenus sur les photos sont donc uniquement dus aux potentiels des atomes et par conséquent à la nature chimique des objets. D'autre part, les objets sont préservés dans leur environnement d'origine grâce à une congélation rapide produisant de la glace amorphe. Cette technique est donc utile pour confirmer que les résultats obtenus par adsorption sur grille de carbone en MET ne sont pas dus à des variations de concentrations par évaporation, à une absorption sélective ou à la réorganisation des objets causés par la présence de colorant. La photo présentée figure 12.5 montre la présence de rubans et de nanotubules.



**Figure 12.5.** Image cryo-MET des auto-arrangements de l'amphiphile **10** à 0,1 mg/mL dans l'eau

Les sections des hélices sont parfaitement visibles et montrent une structure en triple couche, où la couche claire est comprise entre deux couches plus foncées. La couche intérieure a une épaisseur de  $4 \pm 1$  nm, pour une épaisseur totale de la section de  $10 \pm 1$  nm. Le contraste obtenu dans les arrangements permet de comprendre la composition des couches : la clarté de la couche intérieure montre qu'elle est composée en majorité de chaînes alkyles, tandis que les couches foncées correspondent à des densités plus grandes, ce qui suggère qu'elles sont composées de chaînes polyéthylène glycol, à cause de la présence des atomes d'oxygène et d'azote, possédant un fort potentiel atomique. En considérant ces observations expérimentales, un modèle bicouche peut être proposé : les chaînes alkyle-diyne se trouvent dans la couche centrale. (Figure 13.5) Dans ce modèle, un angle d'inclinaison doit être introduit pour ajuster la largeur de la couche centrale à l'épaisseur mesurée. Cette hypothèse est justifiée a posteriori par le fait que la polymérisation a bien lieu dans les auto-assemblages, et le fait qu'elle requiert un angle d'environ  $45^\circ$ .<sup>15</sup> D'autre part, les chaînes polyéthylène glycol peuvent être orientées ou non, dans le sens des chaînes alkyles, ce qui permet de calculer la valeur théorique de l'épaisseur de la bicouche.

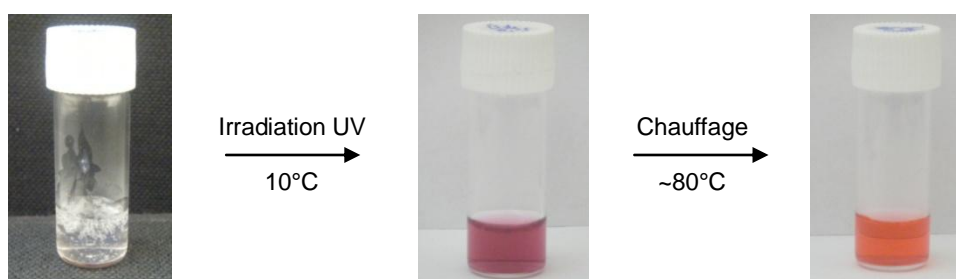


**Figure 13.5.** Structure possible des auto-arrangements de l'amphiphile 10

Dans cette configuration, l'épaisseur de la couche serait de 8,9 nm, ce qui concorde avec les mesures faites en cryo-MET. Un modèle alternatif avec une interpénétration des chaînes alkyles peut être envisagé mais il réduirait l'épaisseur de la couche centrale ou ne permettrait pas d'introduire une inclinaison suffisante pour la polymérisation.

### II.3. Etude du polymère de l'amphiphile **10**

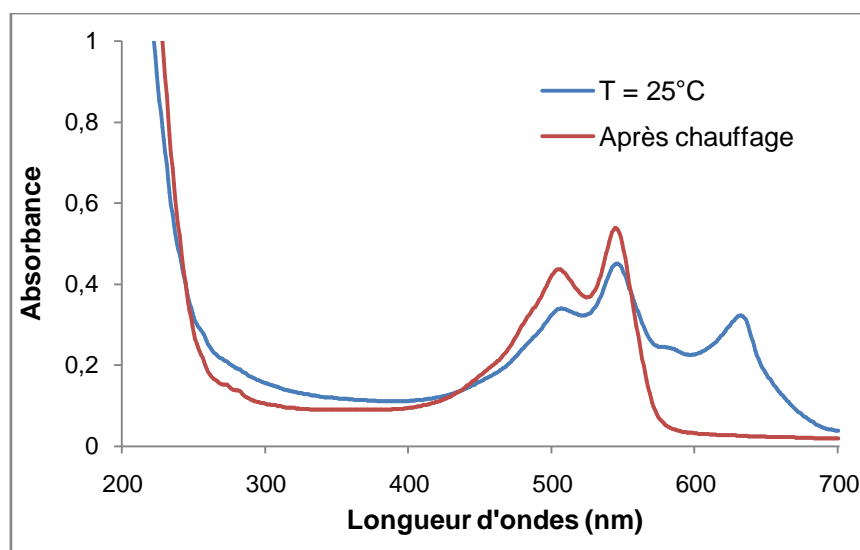
Après formation des auto-arrangements dans l'eau, la solution est soumise à une irradiation UV afin de photopolymériser les groupements diacétyléniques. La solution à 1 mg/mL d'amphiphile **10** a donc été placée sous une lampe UV (1000W) pendant 15 minutes, à une température constante de 10°C. La couleur de la solution ayant radicalement changé pour passer de l'incolore au violet, nous en avons déduit que la polymérisation des polydiacétylènes avait bien eu lieu. D'autre part, le chauffage de cette solution 80°C, a induit un changement de couleur qui s'est révélé irréversible. (Figure 14.5)



**Figure 14.5.** Observations des auto-arrangements de l'amphiphile **10** à 1 mg/mL dans H<sub>2</sub>O, irradiation 15 minutes à 1000 W à 10°C puis chauffage à 80°C

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2, les groupes diacétylènes peuvent réagir entre eux pour former des enchaînements ene-yne dans les structures. Dans ce cas, les chaînes sont bien orientées et la polymérisation a lieu entre un grand nombre de diacétylènes, contrairement à ce que l'on avait observé pour les micelles. C'est pourquoi la solution a une couleur violette et est caractérisée par des bandes d'absorption à 506 nm, 545 nm et 632 nm.

Si l'on chauffe cette solution à 80°C, elle devient orange et est caractérisée par des bandes d'absorbance à 505 nm et 544 nm. (Figure 15.5)



**Figure 15.5.** Spectres d'absorption de l'amphiphile **10** à 0,1 mg/mL dans l'eau MilliQ avant et après chauffage

Afin d'étudier les différences de structure après polymérisation, les auto-arrangements ont été étudiés par DSC, FTIR, cryo-MET et spectrométrie UV-visible.

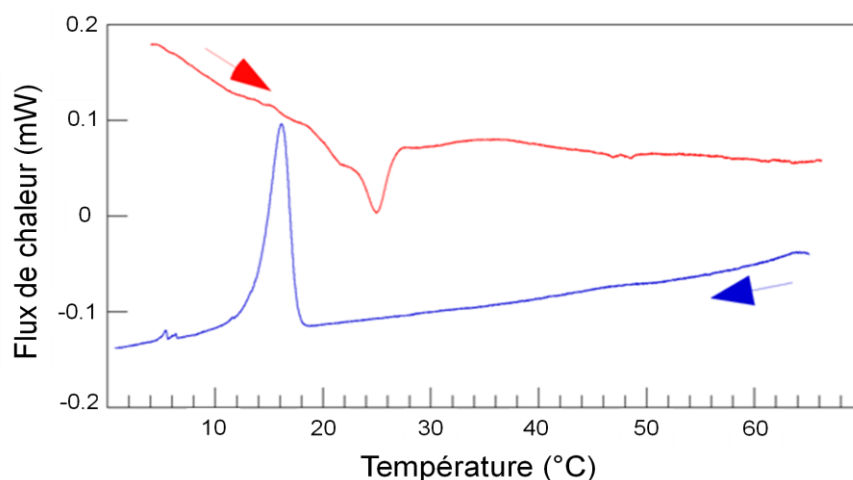
### II.3.1. Mesure de l'enthalpie de dissociation du polymère par calorimétrie différentielle à balayage

Une solution d'auto-assemblages à 1 mg/mL a été photopolymérisée. La solution correspondante a ensuite été chauffée jusqu'à 75°C, puis refroidie à température ambiante.

La solution de polymère va subir deux cycles de chauffe, afin de vérifier si les courbes de DSC sont identiques. En effet, si le chauffage induit des modifications dans les auto-arrangements, le deuxième cycle ne sera pas équivalent au premier.

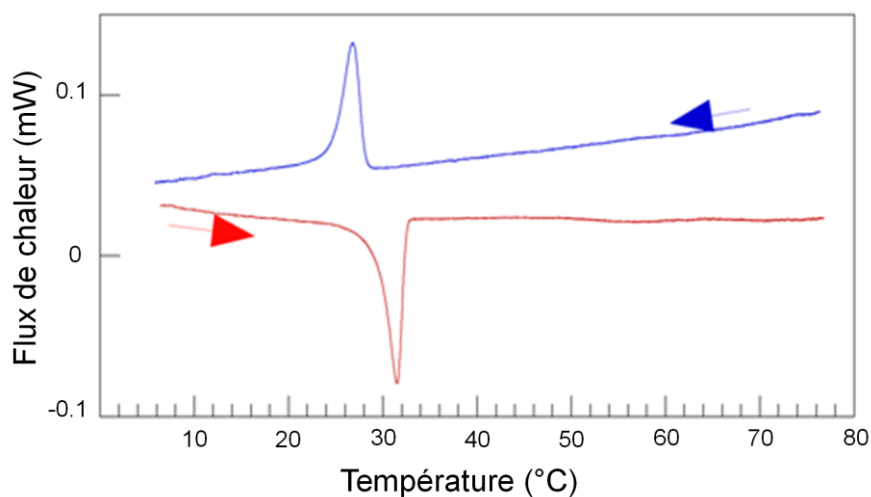
Pendant la première phase de chauffe, un large pic endothermique est apparu à partir de 27°C, avec un maximum à 34,9°C. (Figure 16.5, **A**) L'enthalpie correspondante, 23 kJ.mol<sup>-1</sup>, est plus faible que celle mesurée pour la transition sol-gel du monomère. Pendant le premier

refroidissement, un pic exothermique plus intense que le pic endothermique est observé à 26,5°C mais avec une enthalpie similaire (- 22,6 kJ.mol<sup>-1</sup>).



**Figure 16.5.** Thermogrammes du polymère de l'amphiphile **10** à 5 mg/mL dans l'eau lors du premier cycle de chauffe (rouge) puis refroidissement (bleu)

La seconde phase de chauffe a produit un thermogramme différent avec un pic endothermique à 31,5°C, plus étroit que pour le premier cycle, et avec une enthalpie plus importante de 28,6 kJ.mol<sup>-1</sup>. (Figure 17.5)



**Figure 17.5.** Thermogrammes du polymère de l'amphiphile **10** à 5 mg/mL dans l'eau lors du deuxième cycle de chauffe (rouge) puis refroidissement (bleu)

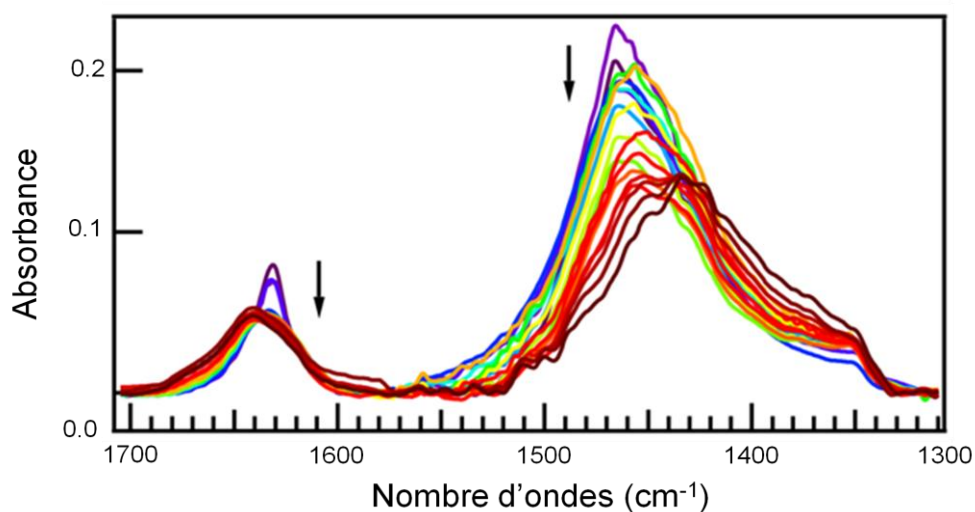
Ces observations sont cohérentes avec une transformation irréversible du polymère après chauffage. En effet, si les structures revenaient à leur état initial en refroidissant, ce qui était le



cas pour le monomère, la courbe du refroidissement devrait être similaire à celle du chauffage. D'après la littérature, des nanotubules de phospholipides diacétyléniques polymérisés ont produit une analyse calorimétrique sans transition.<sup>7</sup> Par contre, des bicouches de polydiacétylènes ont montré des pics exo et endotherme après polymérisation, avec une irréversibilité au-dessous d'une certaine température observée par la suppression de la première exotherme.<sup>16</sup> Dans notre cas, le microcalorimètre ne permet pas de chauffer au-delà de 80 °C et une certaine irréversibilité après la première chauffe est visible. Ainsi, il se peut que la transformation irréversible ne soit pas totalement observée.

### II.3.2. Etude des interactions dans le polymère par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

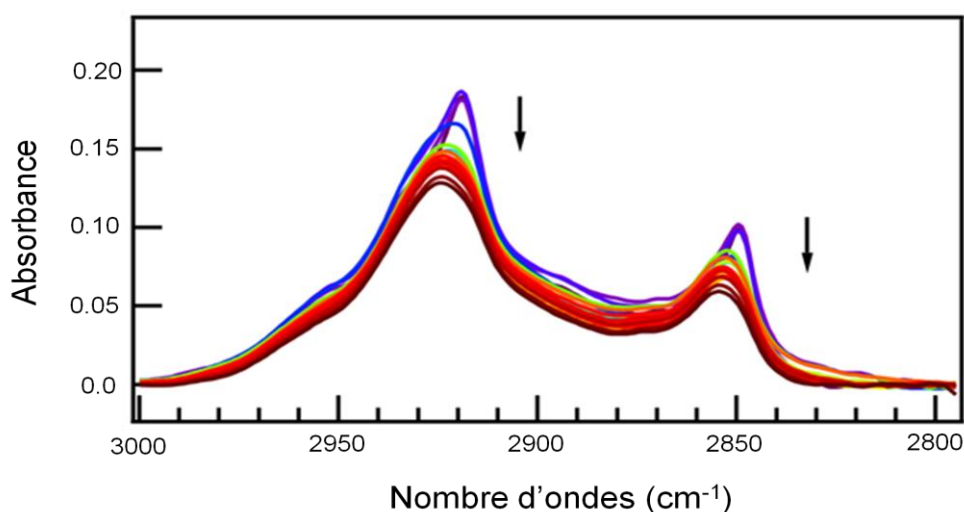
Les spectres infrarouge ont été mesurés sur un échantillon de polymère à 5 mg/mL durant l'étape de chauffe de 27°C à 80°C. A température ambiante, les bandes des amides I et II ont des fréquences de 1632 cm<sup>-1</sup> et 1450 cm<sup>-1</sup>, respectivement, valeurs proches de celles trouvées pour le monomère. Lorsque la température augmente, l'intensité de la bande amide I décroît de façon abrupte entre 27°C et 33°C. D'autre part, la bande amide I se déplace graduellement de 1632 cm<sup>-1</sup> à 1641 cm<sup>-1</sup> et la bande amide II de 1463 à 1430 cm<sup>-1</sup>. (Figure 18.5)



**Figure 18.5.** Spectre FTIR entre 1290 et 1720 cm<sup>-1</sup> du polymère à 5 mg/mL dans D<sub>2</sub>O à 27 à 80°C

L'interprétation de l'évolution des bandes des amides indique que les groupes amides sont engagés dans des liaisons hydrogène avant et après la transition, mais l'intensité, ou du moins la géométrie des liaisons hydrogène évolue. Pour des températures situées après la transition, l'absorbance se situe entre  $1660\text{ cm}^{-1}$  et  $1680\text{ cm}^{-1}$ , zone qui correspond aux amines libres, ce qui montre qu'une partie des liaisons hydrogène est perdue. Ceci est corrélé par la diminution des maximums des bandes de l'amide II. Cependant, cette zone du spectre est délicate à interpréter à cause du faible ratio signal/bruit et la présence des bandes de cisaillement des  $\text{CH}_2$ , présentes sous la forme d'un pic étendu.

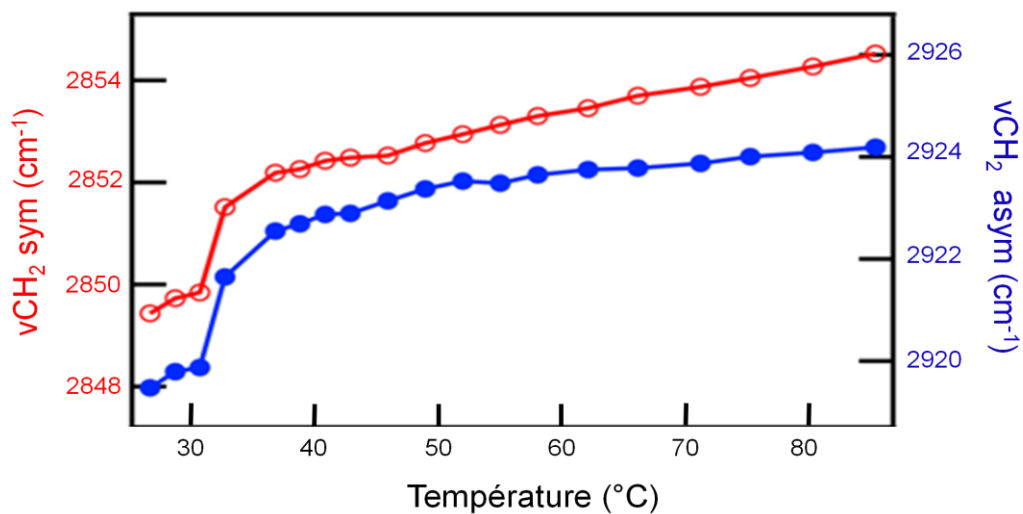
Les bandes correspondant aux vibrations d'élongation, vibrations symétriques et asymétriques des  $\text{CH}_2$  sont mesurées à  $2849,4\text{ cm}^{-1}$  et  $2919,5\text{ cm}^{-1}$ . Ces valeurs indiquent que les chaînes alkyles sont ordonnées. (Figure 19.5)



**Figure 19.5.** Spectre FTIR entre  $2780$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$  du polymère à  $5\text{ mg/mL}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  à  $27$  à  $80^\circ\text{C}$

Lorsque la température augmente entre  $31^\circ\text{C}$  et  $37^\circ\text{C}$ , ces nombres d'ondes se déplacent à  $2852\text{ cm}^{-1}$  et  $2922\text{ cm}^{-1}$ . Ces transformations coïncident avec les transitions endothermiques observées en DSC. La présence de points isobestiques est également cohérente avec une transition du premier ordre. L'évolution des bandes d'élongation des  $\text{CH}_2$  durant le chauffage

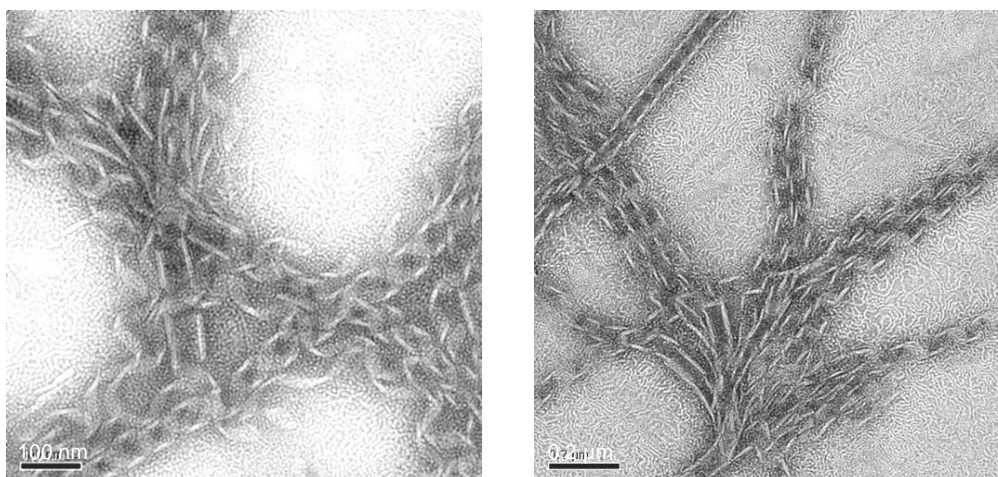
révèle que, durant la transition, les chaînes passent d'un état ordonné à un état désordonné, comme dans le cas du monomère. (Figure 20.5)



**Figure 20.5.** Déplacements des bandes de vibrations des CH<sub>2</sub> symétriques (courbe rouge) et asymétriques (courbe bleue) en fonction de la température

### II.3.3. Etude de la structure du polymère en MET et Cryo-MET

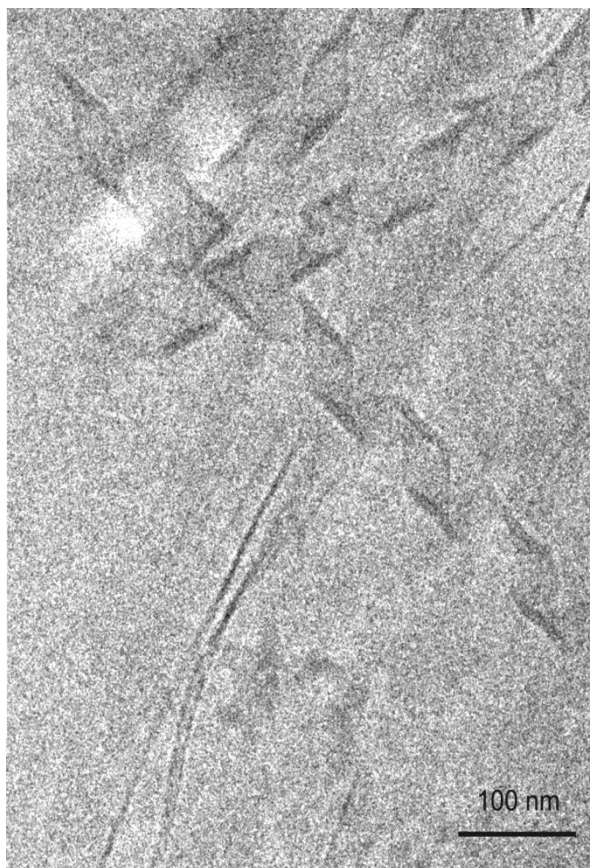
Les solutions de polymère à une concentration de 1 mg/mL ont tout d'abord été observées en MET. (Figure 21.5)



**Figure 21.5.** Images MET du polymère issu des auto-arrangements de l'amphiphile **10** à 1 mg/mL dans l'eau

Ces photos révèlent que les nanotubules que l'on observait après auto-arrangement de l'amphiphile **10** en solution aqueuse ne semblent plus présentes après polymérisation. Ici, nous observons en majorité des rubans, qui ont tendance à se débobiner.

Un échantillon du polymère obtenu à partir des auto-arrangements de l'amphiphile **10** a ensuite été observé en Cryo-MET à une concentration de 1 mg/mL. (Figure 22.5)



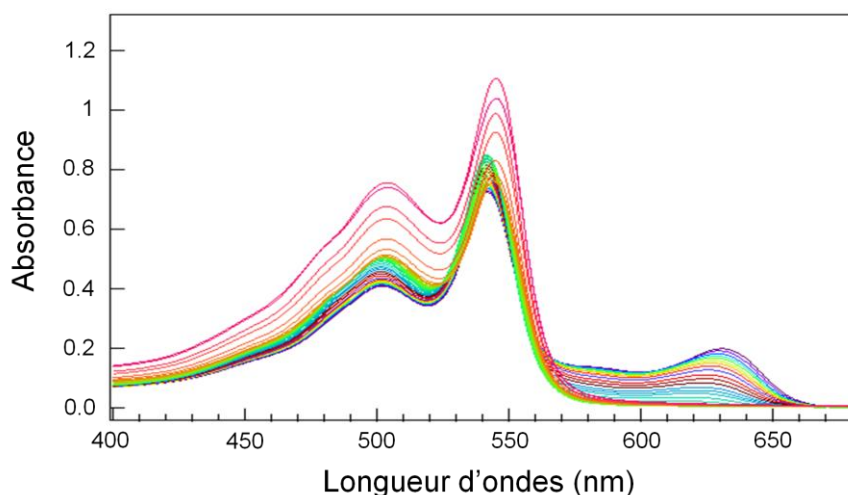
**Figure 22.5.** Image cryo-MET du polymère issu des auto-arrangements de l'amphiphile **10** à 1 mg/mL dans l'eau

L'image de cryo-MET montre bien la présence d'hélices formées, comme avant polymérisation, possédant une structure en bicouche avec les mêmes dimensions. Néanmoins, on observe également dans cette image la présence de matériel sur le fond de grille qui semble correspondre à des rubans qui se seraient dépliés.

## II.3.4. Etude du polymère par spectrométrie UV-visible

### II.3.4.a. Chauffage d'une solution de polymère

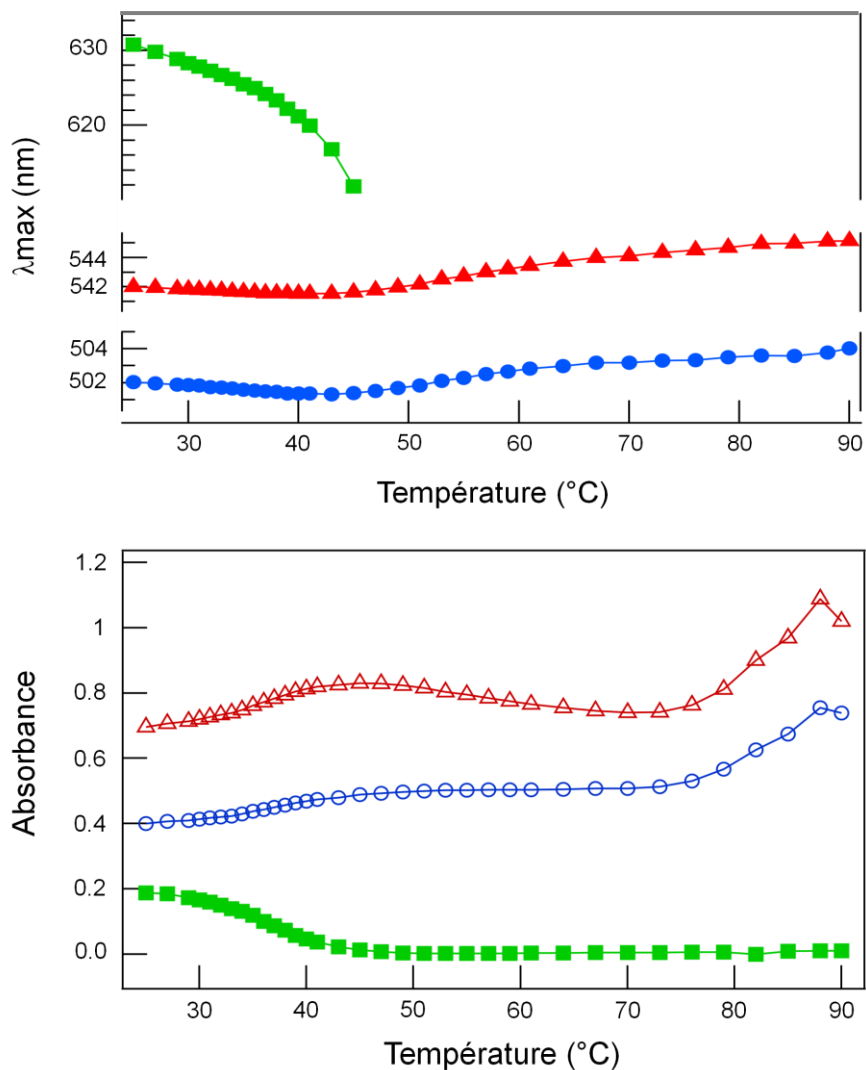
Nous avons suivi les spectres électroniques d'une solution de polymère de l'amphiphile **10** à la concentration de 1 mg/mL dans l'eau, en fonction de la température. Les spectres ont été enregistrés de 25°C à 90°C et sont présentés dans la figure 23.5.



**Figure 23.5.** Spectres d'absorption de l'amphiphile **10** à 1mg/mL, cuve de 1 mm de longueur. Chauffage de la solution de 25°C à 90°C

Le spectre de la solution de polymère à température ambiante comporte trois bandes ayant pour déplacement 502, 542 et 632 nm. La bande centrale à 542 nm étant la plus intense. Cette solution violette est chauffée et la solution devient rose foncé.

Les spectres montrent que lorsque la température augmente, le pic à 632 nm disparaît petit à petit, tandis que les deux premiers se déplacent légèrement avec une variation d'absorbance. La figure 24.5 montre l'évolution de la longueur d'onde maximum et de l'absorbance des trois pics pendant le chauffage de la solution de 25°C à 90°C.



**Figure 24.5.** Evolution de la longueur d'onde maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) des trois pics et de leur absorbance pendant le chauffage de 25°C à 90°C

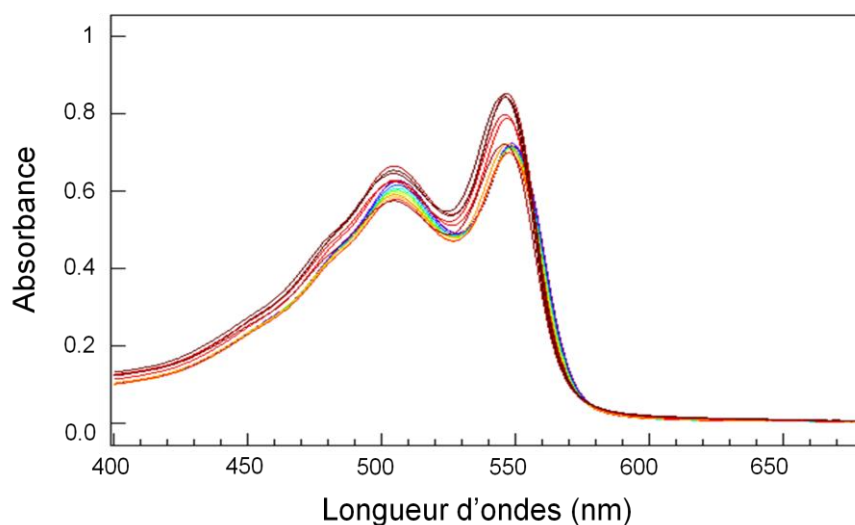
Pendant le chauffage, la courbe représentant l'évolution de la longueur d'onde du premier pic en fonction de la température (ronds bleus pleins) montre que la longueur d'onde passe de 502 nm à 504 nm. La première partie de la courbe a un aspect linéaire dont le milieu correspond à la température de transition détectée en DSC. Il en va de même pour l'absorbance, où une sigmoïde est observée en début de courbe (ronds bleus vides) et dont le milieu correspond à la température de transition observée en DSC.

Après le chauffage, les polydiacétylènes photopolymérisés se trouvent dans la forme « rouge ». En effet, pour les liposomes ou les couches de lipides constitués de polydiacétylènes conjugués, il existe trois formes principales : la forme bleue, la forme

violette et la forme rouge. La plupart du temps, la forme bleue apparaît après polymérisation des groupements ene-yne et est caractérisée par un maximum d'absorption vers 650 nm. Lorsqu'un stimulus externe est appliqué, sous la forme d'un chauffage, d'une variation de pH ou d'un changement de solvant, la forme rouge des polydiacétylènes apparaît avec un maximum d'absorption à 530 nm : la couleur passe alors du bleu au rouge.<sup>17</sup> La forme violette est une forme intermédiaire dont le spectre d'absorption correspond à un mélange entre la forme bleue et rouge, avec des bandes à 550 nm et 630 nm. C'est la forme qui est obtenue dans notre cas. Cette forme intermédiaire est rarement décrite, car seule la transition bleue-rouge est intéressante pour l'utilisation de ces objets en tant que biosenseurs.<sup>18</sup> Cependant elle a déjà été observée à plusieurs reprises, comme lors de la photopolymérisation d'amphiphiles polydiacétyléniques munis d'une tête polaire aniline<sup>19</sup> ou de bolaamphiphiles divers.<sup>20-21</sup> Les différentes formes obtenues dépendent de la longueur de la délocalisation dans les chaînes polymérisées : plus la délocalisation électronique est grande, plus l'énergie entre les orbitales frontières diminue et plus les longueurs d'ondes associées sont grandes. Le fait d'obtenir une forme violette montre que les chaînes dans les auto-arrangements ne sont pas assez ordonnées pour polymériser sous la forme bleue. Plusieurs raisons sont envisageables pour expliquer cette polymérisation. Les liaisons hydrogène entre les chaînes ne se faisant que par les liaisons amides, les chaînes polyéthylèneglycol ont un certain degré de liberté que l'on ne retrouve pas dans le cas d'acides aminés par exemple. D'autre part, les interactions électrostatiques présentes entre les têtes polaires réduisent certainement les interactions de Van der Waals entre les chaînes de lipides et donc le degré de cristallinité des arrangements.<sup>19</sup>

### II.3.4.b. Refroidissement d'une solution de polymère après le chauffage à 90°C

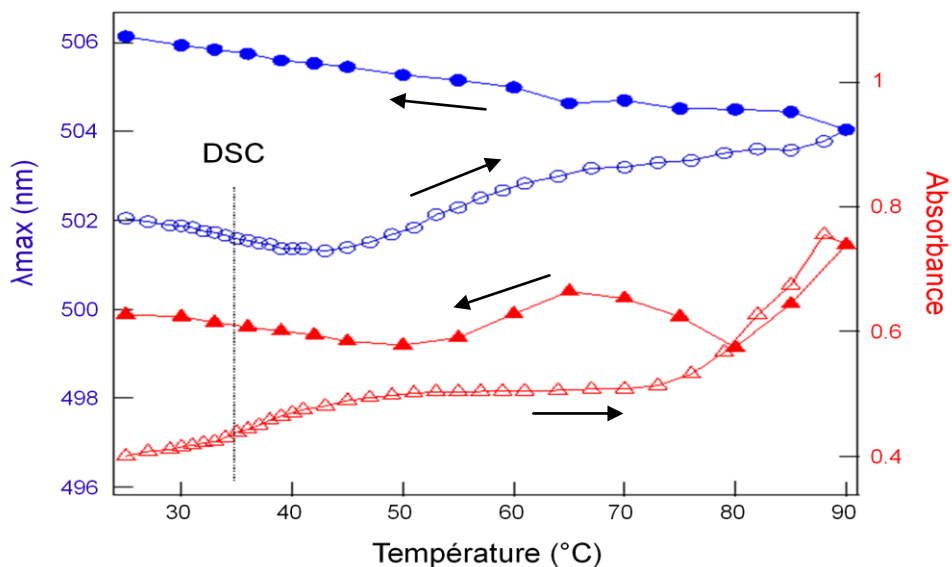
La solution de polymère à 1 mg/mL précédemment chauffée, a été refroidie de 90°C à 25°C, afin d'étudier le caractère réversible du chauffage. Visuellement, nous avons constaté que lorsque la solution du polymère est chauffée puis refroidie elle ne reprend pas la couleur violette. Les spectres UV de la solution chauffée ont été enregistrés lors du refroidissement et sont présentés dans la figure 25.5.



**Figure 25.5.** Spectres d'absorption de l'amphiphile **10** à 1mg/mL, cuve de 1 mm de longueur après chauffage à 90°C puis refroidissement à 25°C

Les spectres UV de la solution chauffée et enregistrés durant le refroidissement montrent que les spectres ne reviennent pas à l'état violet initial durant cette phase, ni en longueur d'onde, ni en absorbance. En particulier, le pic à 631 nm ne réapparaît pas. Les autres pics subissent également une hystérèse en fréquence et en intensité. La figure 26.5 montre à titre d'exemple l'évolution de l'absorbance et du maximum de la longueur d'onde du premier pic du spectre en fonction de la température.





**Figure 26.5.** Evolution du premier pic du spectre de la solution d'amphiphile **10** à 1 mg/mL photo-polymérisée puis chauffée jusqu'à 90°C ( $\lambda_{\max}$  :  $\circ$ , absorbance :  $\Delta$ ) puis refroidie à 25°C ( $\lambda_{\max}$  :  $\bullet$ , absorbance :  $\blacktriangle$ )

Le fait de ne pas retrouver le spectre initial signifie que le chauffage à 90°C transforme le polymère de façon irréversible. Lors du refroidissement, le polymère se réarrange différemment de son état de départ, ce qui ne conduit pas aux mêmes contraintes du squelette. Dans l'état qui est atteint après refroidissement, le polymère est rouge et reflète une longueur de conjugaison qui a diminué par rapport à l'état initial. Ceci montre que le polymère ne se réarrange pas spontanément dans l'état où il a été formé.

La présence d'un petit nombre de liaisons hydrogène pourrait également expliquer pourquoi le système, une fois chauffé, ne retrouve pas son état initial après refroidissement. En effet, plus le nombre de liaisons hydrogène entre les amphiphiles est grand, plus les systèmes pourront être réversibles, comme dans le cas de bolaamphiphiles<sup>21</sup> ou de couches composées de polydiacétylènes munis d'une tête triaminotriazine.<sup>22</sup> Dans la plupart de ces systèmes, le chauffage a des effets réversibles jusqu'à une certaine température, au-delà de laquelle ils deviennent irréversibles.

Afin d'améliorer la l'efficacité de la polymérisation, des liposomes ont par exemple été immobilisés sur une surface de verre. Leur polymérisation a ensuite permis d'obtenir une forme bleue, avec un maximum d'absorption à 640 nm, contrairement aux liposomes libres sous la forme violette, avec un maximum d'absorption à 540 nm.<sup>23</sup> L'étude de Lee *et coll.* précédemment citée<sup>6</sup> et utilisant un amphiphile semblable à notre amphiphile **10**, a montré que la polymérisation des auto-arrangements conduisait à un spectre dont le maximum d'absorption était à 540 nm, soit la forme violette. Par la suite, les amphiphiles ont été auto-arrangés autour d'une surface de verre afin d'obtenir une polymérisation complète, dont le maximum d'absorption était cette fois-ci à 640 nm.<sup>24</sup>

La polymérisation des auto-arrangements que l'on observe avec l'amphiphile **10** doit être proche de celle observée par Lee *et coll.* Si l'on voulait également observer une polymérisation plus efficace, il faudrait mettre au point un système similaire à celui décrit.

### **III. Conclusion**

La synthèse d'un lipide particulier, et en même temps semblable à ceux synthétisés précédemment, a permis de produire des auto-arrangements tubulaires et hélicoïdaux. Grâce aux différentes analyses réalisées, nous avons pu élucider la structure de ces arrangements comme étant des bicouches d'amphiphiles s'auto-arrangeant en rubans, puis en tubes. La polymérisation des arrangements a conduit à un polymère de couleur violette. Le chauffage de ce polymère a conduit à une forme rouge, dont l'état s'est révélé irréversible après refroidissement. Cependant, la polymérisation n'était pas optimum, mais elle pourrait être améliorée en déposant, par exemple, les auto-arrangements sur des surfaces orientant parfaitement les chaînes les unes par rapport aux autres.

## Références

- (1) Cheng, Q.; Yamamoto, M.; Stevens, R.C. Amino acids terminated polydiacetylene lipid microstructures : morphology and chromatic transition, *Langmuir* **2000**, *16*, 5333-5342
- (2) Kamiya, S.; Minamikawa, H.; Jung, J.H.; Yang, B.; Masuda, M.; Shimizu, T. Molecular structure of glycopyranosylamide lipid and nanotube morphology, *Langmuir* **2005**, *21*, 743-750
- (3) Masuda, M.; Hanada, T.; Yase, K.; Shimizu, T. Polymerization of bolaform butadiyne 1-glucosamide in self-assembled nanoscale-fiber morphology, *Macromolecules* **1998**, *31*, 9403-9405
- (4) Lindsell, W.E.; Preston, P.N.; Seddon, J.M.; Rosair, G.M.; Woodman, T.A.J. Macroscopic helical and cylindrical morphologies from achiral 1,3-diynes, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1572-1576
- (5) Pakhomov, S.; Hammer, R.P.; Mishra, B.K.; Thomas, B.N. Chiral tubule self-assembly from an achiral diyne lipid, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3040-3042
- (6) Lee, S.B.; Koepsel, R.; Stolz, D.B.; Warriner, H.E.; Russell, A.J. Self-assembly of biocidal nanotubes from a single-chain diacetylene amine salt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13400-13405
- (7) Svenson, S.; Messersmith, P.B. Formation of polymerizable phospholipid nanotubules and their transformation into a network gel, *Langmuir* **1999**, *15*, 4464-4471
- (8) Ambrosi, M.; Fratini, E.; Alfredsson, V.; Ninham, B.W. ; Giorgi, R. ; Lo Nostro, P.L. ; Baglioni, P. Nanotubes from a vitamin C-based bolaamphiphiles, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7209-7214
- (9) George, M.; Weiss, R.G. Low molecular-mass gelators with diyne functional groups and their unpolymerized and polymerized gel assemblies, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2879-2888
- (10) Gatebe, E.; Herron, H.; Zakeri, R.; Rajasekaran, P.R.; Aouadi, A.; Kohli, P. Synthesis and characterization of polydiacetylene films and nanotubes, *Langmuir* **2008**, *24*, 11947-11954
- (11) Ahn, D.J.; Chae, E.H.; Lee, G.S.; Shim, H.Y.; Chang, T.E.; Ahn, K.D.; Kim, J.M. Colorimetric reversibility of polydiacetylene supramolecules having enhanced hydrogen-bonding under thermal and pH stimuli, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8976-8977
- (12) Vass, E.; Hollosi, M.; Besson, F.; Buchet, R. Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917-1954
- (13) Wu, Y.; Xu, Y.; Wang, D.; Zhao, Y. ; Weng, S.; Xu, D.; Wu, J. FT-IR spectroscopic investigation on the interaction between nylon 66 and lithium salts, *J. App. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 2869-2875
- (14) Kogiso, M.; Hanada, T.; Yase, K.; Shimizu, T. Intralayer hydrogen-bond-directed self-assembly of nano-fibers from dicarboxylic valylvaline bolaamphiphiles, *Chem. Commun.* **1998**, 1791-1792

- (15) Mowery, M.D.; Cai, M.; Menzel, H.; Evans, C.E. Nanometer-scale design and fabrication of polymer interfaces using polydiacetylene monolayers, *J. Vac. Sci. Technol.* **1999**, *17*, 2136-2141
- (16) Huggins, K.E.; Son, S.; Stupp, S.I. Two-dimensional supramolecular assemblies of a polydiacetylene. Synthesis, structure, and third-order nonlinear optical properties, *Macromolecules* **1997**, *30*, 5305-5312
- (17) Boullanger, P.; Lafont, D.; Bouchu, M.N.; Jiang, L.; Liu, T. ; Lu, W. ; Guo, C.X. ; Li, J. The use of glycolipids inserted in color-changeable polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition, *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 43-60
- (18) Reppy, M.A.; Pindzola, B.A. Biosensing with polydiacetylene materials : structures, optical properties and applications, *Chem. Commun.* **2007**, 4317-4338
- (19) Wacharasindhu, S.; Montha, S.; Boonyiseng, J.; Potisatityuenyong, A.; Phollookin, C.; Tumcharern, G.; Sukwattanasinitt, M. Tuning of thermochromism properties of polydiacetylene toward universal temperature sensing materials through amide hydrogen bonding, *Macromolecules* **2010**, *43*, 716-724
- (20) Dautel, O.J.; Robitzer, M.; Lère-Porte, J.P.; Serein-Spirau, F.; Moreau, J.J.E. Self-organized ureido substituted diacetylenic organogel. Photopolymerization of one-dimensional supramolecular assemblies to give conjugated nanofibers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16213-16223
- (21) Song, J.; Cisar, J.S.; Bertozzi, C.R. Functional self-assembling bolaamphiphilic polydiacetylenes as colorimetric sensor scaffolds, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8459-8465
- (22) Huo, Q.; Russel, K.C.; Leblanc, R.M. Chromatic studies of a polymerizable diacetylene hydrogen bonding self-assembly: a “self-folding” process to explain the chromatic changes of polydiacetylenes, *Langmuir* **1999**, *15*, 3972-3980
- (23) Kim, J.M.; Ji, E.K.; Woo, S.M.; Lee, H.; Ahn, D.J. Immobilized polydiacetylene vesicles on solid substrates for use as chemosensors, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1118-1121
- (24) Lee, S.B.; Koepsel, R.R.; Russel, A.J. Surface dispersion and hardening of self-assembled diacetylene nanotubes, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2202-2206

# **CONCLUSION GENERALE**



# Conclusion générale

---

Durant ces travaux de thèse, plusieurs types d'auto-arrangements d'amphiphiles diacétyléniques ont été étudiés : les micelles sphériques, les auto-arrangements autour des nanotubes de carbone et les nanotubules.

Pour commencer, nous avons formé des micelles sphériques constituées d'amphiphiles diacétyléniques munis de têtes polaires variées. Nous nous sommes d'abord attachés à étudier les structures de micelles formées par des amphiphiles munis de têtes polaires acides nitrilotriacétiques avant et après photopolymérisation. Les analyses que nous avons effectuées ont révélé que la polymérisation n'induisait ni de changement de forme, ni de changement de taille. Cependant, l'efficacité de la polymérisation a été attestée grâce à des analyses d'exclusions stériques et de diffusion des neutres aux petits angles. Ces résultats ont été acceptés pour publication dans le journal scientifique *Macromolecular Chemistry and Physics* cette année.

Par la suite, nous avons synthétisé un autre type de micelles formées d'amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête polaire polyéthylèneglycol. Par synthèse d'un amphiphile dérivé, nous avons formé des micelles mixtes contenant une proportion égale de groupements alcools et acides carboxyliques, nous avons entrepris de fonctionnaliser la surface de ces micelles. Malheureusement, la fonctionnalisation n'a jamais pu être totalement sélective et n'a pas permis d'obtenir des micelles constituées d'une seule population utilisable pour des tests sur cellules et des tests *in vivo*. Des possibilités restent cependant toujours possibles pour

fonctionnaliser ces micelles de façon spécifique, comme un temps de polymérisation des micelles plus long ou l'utilisation de micelles polymérisables et réticulables. Nous nous sommes alors tournés vers un autre type de marquage des micelles pour les rendre détectables en imagerie et avons choisi d'encapsuler une sonde fluorescente, le NR12S, dans le cœur hydrophobe des micelles. Après encapsulation, les micelles se sont révélées être fortement fluorescentes, et elles ont été logiquement testées sur des cellules. Les images enregistrées avec un microscope à fluorescence ont révélé que la présence des micelles permettait une internalisation plus rapide dans les cellules HeLa.

Pour compléter l'étude sur les micelles diacétyléniques, nous avons synthétisé d'autres types de micelles mixtes composées d'amphiphiles diacétyléniques munis d'une tête polaire polyéthylèneglycol et d'amphiphiles munis de têtes polaires acides nitrilotriacétiques. Grâce à la présence des acides carboxyliques sur ces micelles, du technétium a pu être chélaté et nous avons obtenu des images *in vivo*, montrant une longue circulation. Cette étude va être poursuivie au laboratoire en injectant ces micelles marquées à des souris porteuses d'une tumeur pour étudier leur diffusion passive. Les différentes micelles menées sur les micelles diacétyléniques montrent qu'elles pourraient potentiellement être utilisées en tant qu'agent de délivrance de principes actifs.

D'autre part, nous avons exploité le potentiel de ces amphiphiles diacétyléniques qui ont la capacité de former des suspensions stables de nanotubes de carbone en solution aqueuse. Grâce à la synthèse de plusieurs amphiphiles possédant des têtes polaires différentes, nous avons mis au point une méthode permettant de prévoir la stabilité des suspensions de nanotubes de carbone nTec en fonction du pH de la solution aqueuse. Ainsi, un amphiphile ayant la capacité de s'auto-arranger sous forme de micelles à un certain pH, permettra la suspension de nanotubes de carbone à ce même pH. D'autre part, les nanotubes de carbone



couverts par nos amphiphiles n'ont montré aucune cytotoxicité sur deux types de cellules épithéliales bronchiques humaines non lésées. Cela nous laisse penser que ces nanotubes pourraient être utilisés dans différents domaines, notamment dans le domaine médical.

Pour finir, nous avons étudié les auto-arrangements en nanotubules et en hélices, observés pour un amphiphile particulier. Très peu d'études ont été décrites sur les nanotubules formés par un amphiphile monochaine sans centre chiral tel que le nôtre. Par l'utilisation de différentes techniques, nous avons élucidé la structure des arrangements comme étant des bicouches d'amphiphiles s'auto-arrangeant en rubans, puis en tubes. La polymérisation des arrangements a conduit à un polymère de couleur violette dont le chauffage a conduit à une forme rouge. L'état atteint s'est révélé irréversible. L'élucidation de ces caractéristiques est toujours en cours d'étude.



# **PARTIE EXPERIMENTALE**



# Experimental Part

---

## I. General procedure

### I.1. Chemistry

Unless indicated, reactions are carried out under an atmosphere of argon in flame-dried glassware with magnetic stirring. All reagents are obtained from Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics or Fluka and used without further purifications. Dry MeOH and DMF are purchased from Aldrich. Dichloromethane, diethyl ether and tetrahydrofuran are dried with a dry station for solvents GT S100, passing through a column of activated alumina under nitrogen. Fluorescent dyes are purchased on Invitrogen.

Buffers are prepared with MilliQ Water: Tris buffer pH 8 and 10 (100 mM Tris and 150 mM NaCl), Phosphate buffer pH7.4 100mM (77 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 23 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), HEPES pH7.4 (100 mM HEPES), Acetate pH4.7 100mM (52mM acetic acid, 48mM sodium acetate).

Analytical thin layer chromatography (TLC) is performed using plates cut from glass sheets (silica gel 60F-254 from Merck). Visualization is achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in a solution of vanillin, ninhydrine or phosphomolybdic acid. Column chromatography is carried out as “Flash Chromatography” using silica gel G-25 (40-63 μm, 230-400 mesh ASTM) from Merck Kieselgel.

### I.2. Analysis

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra are recorded at room temperature on the following spectrometers: Bruker Advance 400 (RMN <sup>1</sup>H: 400 MHz; RMN <sup>13</sup>C, 100 MHz), Bruker DPX-300 (RMN <sup>1</sup>H, 300 MHz; RMN <sup>13</sup>C, 75 MHz), Bruker DPX-200 (RMN <sup>1</sup>H, 200 MHz; RMN <sup>13</sup>C, 50 MHz). Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual undeuterated solvent. Data are represented as follows chemical shift, multiplicity (s = singlet, sb = broad singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet and m = multiplet), integration and coupling constant (J in Hz).

IR spectra are recorded on a Nicolet 380 FT-IR spectrometer from Thermo Electron Corporation as a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or MeOH solution.

High resolution mass spectra (HRMS) are obtained using an Agilent Q-TOF (time of flight) 6520 and mass spectra using an Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC 1200 SL.

UV-Vis spectra are recorded on Shimadzu UV-1800 spectrophotometer and fluorescence spectra on a Fluorolog spectrofluorometer (Jobin Yvon, Horiba).

Sonications are realized in an ultrasound bath Bandelin Sonorex RK100H with a power of 80 W and ultra-sonication is done with a Digital Sonifier Branson 450 with a power of 170W.

Centrifugations are carried out with a centrifuge Br4i Jouan in a mobile rotor S40 and the irradiation steps for photopolymerization with a UV wave (48W, 254 nm) Cross-linker Bio-link 254, Fischer Bioblock.

The hydrodynamic diameters of micelles are determined by the Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instruments). The values are presented as the volume average size  $\pm$  standard deviation of three runs. The error on the measurements is calculated as the width at mid height of the peak divided by two.

Observations in TEM are recorded with a microscope Philips CM 120: its tension of acceleration for the electrons was 100 kV. Measures are carried out at low dose of electrons (10-15 e-/Å<sup>2</sup>) in order to reduce the involved damages to the samples because of the beam of light. Grids of microscopy are made of copper/rhodium 300 mesh and are recovered with a film of carbon. This one is naturally hydrophobic, that's why it is necessary to make it hydrophilic for the observations of the objects which are in aqueous solution: it is carried out with an electroluminescent discharge on the grid which is placed in a gaseous atmosphere under vacuum (10<sup>-1</sup> torr) during thirty seconds. 5  $\mu$ L of the studied solution is placed on the grid, incubated during one minute and dried with a filter. The sample is then colored negatively with 50  $\mu$ L of uranyl acetate (2%). After one minute of incubation, uranyl acetate is eliminated with a filter and the grid is air-dry before microscope analysis.

Small-angle Neutron Scattering (SANS) experiments are performed on the PAXE camera located at the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEN Saclay, France). A wavelength of  $\lambda_m = 0.6$  nm is used with a wavelength distribution characterized by a full width at half maximum,  $\Delta\lambda/\lambda$ , of about 10%. Neutron detection is achieved with a built-in two-dimensional sensitive detector composed of 64x64 cells (further details are available on <http://www-llb.cea.fr>). The sample-detector distance is fixed at 1.4 m so that the available  $q$ -range is  $0.25 < q \text{ (nm}^{-1}\text{)} < 2.5$  where  $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$ ,  $\theta$  being the scattering angle. Samples are prepared directly in rectangular quartz cells with a 0.5 cm optical path from Hellma. The position sensitive detector is calibrated by means of light water. The scattering intensities are corrected for sample transmission and sample thickness.

Gel permeation chromatography is performed on a Shimadzu Prominence System (online degasser, pump, auto-sampler, column oven) equipped with 5 serial mixed B PLgel columns (30cm) and a guard column. Detection is performed by a differential refractometer RID10A (Shimadzu), an UV/Vis PDA detector SPD-20A (Shimadzu) and a multi angle light scattering (MALS) detector DAWN TREOS (Wyatt Techn). The injected volume is 0.1 mL. The flow rate is 1 mL/min and high purity THF is used as eluent. The calibration curve is established with 16 polystyrene standards (PL laboratories). Samples are dissolved in THF during 20h with stirring at room temperature, then 3 h at 60°C followed by sonication for 45 min

## II. Experimental results

### II.1. Synthesis and polymerization of micelles

The amphiphile is dispersed in an appropriate buffer and sonicated in a bath (80 W for 30 min at 25°C). Polymerization is performed by irradiating the solution in a UV chamber (1000 W, 254 nm) for 45 min. Absorption spectra are recorded using Shimadzu UV-1800UV/Visible spectrophotometer.

When required, the samples of NTA micelles are dried. To that end, micelles are precipitated in the aqueous solution of Tris by adding concentrated hydrochloric acid, and then a mixture THF/CHCl<sub>3</sub> (50/50, v/v) is added. Due to their neutralized acid moieties, the micelles moved to the organic layer which is evaporated to obtain a dried sample.

## II.2. Encapsulation of NR12S in MP<sub>PEG-OH</sub> micelles and *in vitro* studies

A solution of MP<sub>PEG8</sub> micelles is prepared in phosphate buffer pH7.4 at 5 mg/mL. A solution of NR12S is separately prepared at 0.2  $\mu$ M then 2  $\mu$ L of this solution is mixed with 20  $\mu$ L of the solution of micelles in 1 mL of Optimen buffer. In parallel, 2  $\mu$ L of NR12S solution is mixed in 1mL of Optimen buffer to perform the control experiment.

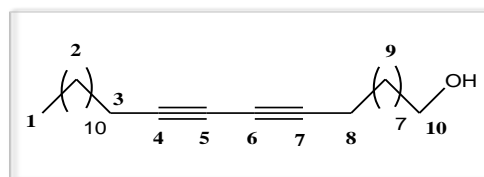
HeLa cells were prepared in ibidi dishes in 800  $\mu$ L of EMEM buffer and incubated one day. Then, the supernatant is replaced by 1mL of Optimem buffer. 400  $\mu$ L of the solution of micelles and NR12S solution only are separately incubated with cells at 37°C during 15 minutes, 1h and 4h. After these times, the supernatant is replaced by 400  $\mu$ L of Optimem and the cells are observed in fluorescence microscopy.

## II.3. Synthesis

### Synthesis of pentacos-10,12-diyne-1-ol (**1**)

Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O

Molecular weight: 360.62 g/mol



To a solution of pentacos-10,12-diyne-1-ol (10 g; 26.7 mmol; 1 eq) in anhydrous THF (200 mL) is added LiAlH<sub>4</sub> (1.82 g; 48.1 mmol; 1.8 eq) slowly at 0°C. The solution is stirred at room temperature until the color of the reaction mixture becomes red (1h45). Then, 100 mL of a solution of hydrochloric acid 1N are added slowly to neutralize the excess of LiAlH<sub>4</sub>. Finally, the aqueous layer is extracted three times with ethyl acetate (100 mL) and the combined organic layers are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford **1** as a white solid (9.1 g, yield 95%), pure enough to be engaged in the next reaction.

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 0.85(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.0Hz), 1.23-1.58(m, 34H<sub>2-9</sub>), 2.21(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.8Hz), 3.60(t, 2H<sub>10</sub>, J=6.4Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 14.3(C<sub>1</sub>)-19.4(C<sub>3-8</sub>)-22.9-25.9-28.6-28.8-29.0-29.1-29.2-29.3-29.5-29.6-29.7-29.8-32.1-33.0(C<sub>2-9</sub>)-63.2(C<sub>10</sub>)-65.5(C<sub>5-6</sub>)-77.7(C<sub>4-7</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3306 (OH), 2917 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2850 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1469, 1058, 718.

**Rf** = 0.4 (CHCl<sub>3</sub>).

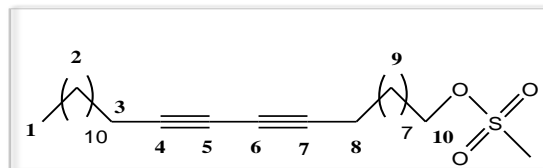
**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 361.3.



## Synthesis of pentacos-10,12-diyne-1-yl hydrogen sulfate (2)

Chemical Formula:  $C_{25}H_{44}O_4S$

Molecular weight: 440.68 g/mol



To a solution of **1** (9.1 g; 25.2 mmol; 1eq) in anhydrous THF (120 mL), are added methanesulfonyl chloride (2.34 mL; 30.3 mmol; 1.2eq) and triethylamine (4.5 mL; 32.8 mmol; 1.3eq). The mixture is stirred at room temperature one hour. 100 mL of a solution of saturated  $NaHCO_3$  is added and the aqueous layer is extracted three times with ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts (j'ai enlevé la repetition) are dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated. The residue is purified by flash column chromatography eluted with  $CHCl_3/CyHex$  (35/65, v/v) to afford **2** as a white solid (8.04 g, 73% yield).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 300MHz): 0.86(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.24-1.54(m, 32H<sub>2-9</sub>), 1.73(q, 2H<sub>αH-10</sub>, J=6.6Hz), 2.22(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.6Hz), 2.98(s, 3H<sub>11</sub>), 4.20(t, 2H<sub>10</sub>, J=6.3Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 75MHz): 14.3(C<sub>1</sub>)-19.3(C<sub>3-8</sub>)-22.8-25.5-28.4-28.5-28.9-29.0-29.1-29.3-29.4-29.5-29.6-29.8-30.1-32.1(C<sub>2-9</sub>)-37.5(C<sub>11</sub>)-65.4-65.5(C<sub>5-6</sub>)-70.3(C<sub>10</sub>)-77.6-77.7(C<sub>4-7</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 2918 ( $CH_2$  vib.asym), 2850 ( $CH_2$  vib.sym), 1471, 1333, 1173, 1165 ( $SO_2-CH_3$ ), 999, 965, 854.

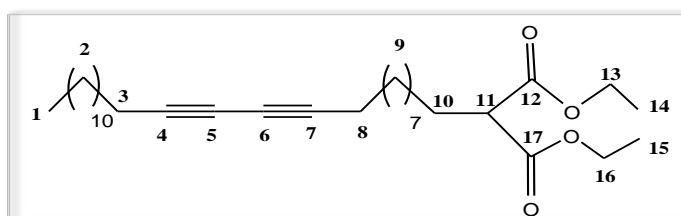
**Rf** = 0.46 ( $CHCl_3/CyHex$ : 35/65).

**SM** (ESI) m/z:  $[M-H]^- = 439.3$ .

## Synthesis of diethyl pentacos-10,12-diyne-1-ylmalonate (3)

Chemical Formula:  $C_{32}H_{54}O_4$

Molecular weight: 502.77 g/mol



To a suspension of sodium hydride (205 mg; 5.13 mmol; 1.5 eq) in anhydrous DMF (10 mL), is added diethyl malonate (586  $\mu$ L; 5.13 mmol; 1.5 eq). The solution is stirred one hour at room temperature to activate the malonate. A solution of **2** (1.5 g; 3.42 mmol; 1 eq) and TBAI (126 mg; 0.34 mmol; 0.1 eq) in anhydrous DMF (10 mL) is then added. The mixture is heated

under microwaves at 200°C during 25 minutes and the resulting solution is concentrated under reduced pressure. The residue is redissolved in ethyl acetate (50 ml) and washed with 50 mL of a solution of hydrochloric acid 1N. The aqueous layer is extracted two times with ethyl acetate (50 mL). The combined organic extracts are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue is purified by flash column chromatography eluted with CHCl<sub>3</sub>/CyHex (20/80, v/v) to afford **3** as a pale yellow oil (1.1 g, 64%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>,300MHz): 0.86(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.20-1.52(m, 40H<sub>2-9-14-15</sub>), 1.70-1.81(m, 2H<sub>10</sub>), 2.22(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.9Hz), 3.29(t, 1H<sub>11</sub>, J=7.5Hz), 4.17(q,4H<sub>13-16</sub>, J=7.2Hz).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>,75MHz): 14.1(C<sub>1-14-15</sub>)-19.2(C<sub>3-8</sub>)-22.7-27.3-28.4-28.8-28.9-29.0-29.1-29.2-29.3-29.4-29.5-29.7-31.9(C<sub>2-9-10</sub>)-52.1(C<sub>11</sub>)-61.3(C<sub>13-16</sub>)-65.3(C<sub>5-6</sub>)-77.6(C<sub>4-7</sub>)-169.6(C<sub>12-17</sub>).

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 2923 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2853 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1751 (C=O), 1732 (C=O), 1464, 1368, 1176, 1151, 1030.

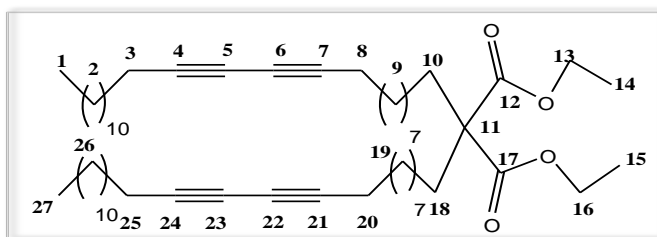
**Rf** = 0.37 (CHCl<sub>3</sub>/CyHex: 20/80).

**SM** (ESI) m/z: [M+K]<sup>+</sup> = 541.4, [M+Na]<sup>+</sup> = 525.4, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 520.4, [M+H]<sup>+</sup> = 503.4.

#### Synthesis of diethyl dipentacos-10,12-diyn-1-ylmalonate (**4**)

*Chemical Formula:* C<sub>57</sub>H<sub>96</sub>O<sub>4</sub>

*Molecular weight:* 845.37 g/mol



To a suspension of sodium hydride (16.5 mg; 0.41 mmol; 1 eq) in anhydrous DMF (1.5 mL), is added **3** (204 mg; 0.41 mmol; 1 eq). The solution is stirred one hour at room temperature then **2** (178 mg; 0.41 mmol; 1 eq) and TBAI (15 mg; 0.041 mmol; 0.1 eq) in DMF (0.5 mL) are added. The mixture is heated under microwaves at 200°C during 20 minutes. 5 mL of ethyl acetate and 15 mL of a solution of hydrochloric acid 1N are added and the mixture was extracted three times with ethyl acetate (5 mL). The combined organic layers are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography eluted with CHCl<sub>3</sub>/CyHex (20/80, v/v) to afford a mixture of **4** as a yellow oil (114 mg, 33%) and **5** as a transparent oil (51 mg, 29%).

#### Compound 4

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>,300MHz): 0.86(t, 6H<sub>1-2,7</sub>, J=6.8Hz), 1.20-1.53(m, 74H<sub>2-9-14-15-19-26</sub>), 1.70(m, 4H<sub>10-18</sub>), 2.20-2.26(m, 8H<sub>3-8-20-25</sub>), 4.09-4.16(m, 4H<sub>13-16</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>,75MHz): 13.1(C<sub>1-2,7</sub>)-13.3(C<sub>14-15</sub>)-18.2(C<sub>3-8-20-25</sub>)-21.7-22.9-24.0-24.8-27.4-27.5-27.8-27.9-18.0-28.1-28.2-28.3-28.6-28.4-28.5-28.6-28.8-30.9-31.2-33.4(C<sub>2-9-10-18</sub>)-56.6(C<sub>11</sub>)-60.2-63.1-63.4-64.3(C<sub>5-6-22-23</sub>)-76.5-76.6(C<sub>4-7-21-24</sub>)-171.0(C<sub>12-17</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2922 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2853 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1732 (C=O), 1465, 1177, 722.

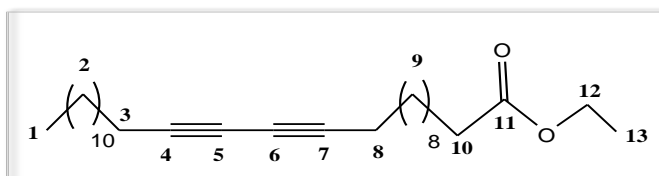
**R<sub>f</sub>** = 0.32 (CHCl<sub>3</sub>/CyHex: 20/80).

**SM** (ESI) m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 867.8.

#### Compound 5: ethyl heptacos-12,14-diynoate

*Chemical Formula:* C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 430.71 g/mol



**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>,300MHz): 0.85(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.24-1.53(m, 38H<sub>2-9</sub>), 2.18-2.78(m, 6H<sub>3-8-10</sub>), 4.08-4.13(q, 2H<sub>12</sub>, J=7.2Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) 14.1(C<sub>1</sub>)-19.2(C<sub>3-8</sub>)-22.7-25.0-28.3-28.4-28.8-28.9-29.1-29.1-29.1-29.2-29.4-29.4-29.5-29.6-29.6-29.7-31.9(C<sub>2-9</sub>)-34.4 (C<sub>10</sub>)-60.1(C<sub>12</sub>)-65.3(C<sub>5-6</sub>)-77.6(C<sub>4-7</sub>)-173.9(C<sub>11</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2922 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2852 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1731 (C=O), 1466, 1178.

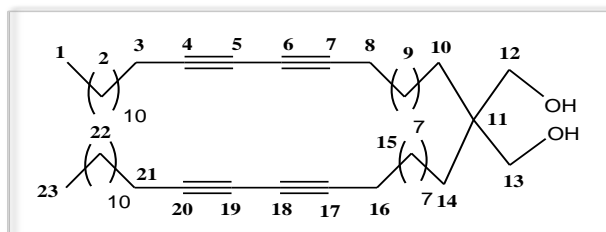
**R<sub>f</sub>** = 0.42(CHCl<sub>3</sub>/CyHex: 20/80).

**SM** (ESI) m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 453.7.

#### Synthesis of 2,2-dipentacos-10,12-diyn-1-ylpropane-1,3-diol (11)

*Chemical Formula:* C<sub>53</sub>H<sub>92</sub>O<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 761.30 g/mol



To a solution of **4** (100 mg; 0.12 mmol; 1 eq) in anhydrous THF (1.5 mL) is added DIBAL-H 1M in solution of toluene (473  $\mu$ L; 0.47mmol; 4 eq) at 0°C. The mixture is stirred one hour at 0°C and 14h at room temperature. Then the solution is concentrated and the residue is purified

by flash column chromatography eluted with  $\text{CHCl}_3$  (100%) to afford **11** as a white solid (14 mg, 15%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz): 0.86(t, 6H<sub>1-23</sub>, J=6.6Hz), 1.21-1.52(m, 72H<sub>2-9-10-14</sub>), 2.22(t, 8H<sub>3-8-16-21</sub>, J=6.0Hz), 3.55(s, 4H<sub>12-13</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz): 14.4(C<sub>1-23</sub>)-19.4(C<sub>3-8-16-21</sub>)-22.9-23.1-28.6-29.1-29.3-29.6-29.7-29.8-29.8-29.9-28.9-29.9-30.8-31.1-32.1(C<sub>2-9-10-14-15-22</sub>)-41.3(C<sub>11</sub>)-65.5(C<sub>5-19</sub>)-65.5(C<sub>6-18</sub>)-69.7(C<sub>12-13</sub>)-77.7(C<sub>4-20</sub>)-77.8(C<sub>7-17</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3309 (OH), 2918 ( $\text{CH}_2$  vib.asym), 2849 ( $\text{CH}_2$  vib.sym), 1473, 1060.

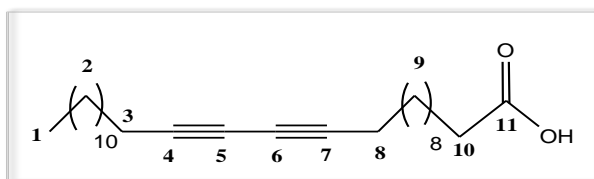
**Rf** = 0.29( $\text{CHCl}_3$ )

**SM** (ESI) m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 762.3$ .

### Synthesis of heptacos-12,14-diynoic acid (**6**)

*Chemical Formula:*  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$

*Molecular weight:* 402.65 g/mol



To a solution of ester **5** (80 mg; 0,095 mmol; 1 eq) in THF/MeOH (1 mL/0.5 mL) is added LiOH (solution 1M, 0.95 mL, 10 eq). The solution is stirred at room temperature for 14h and the mixture is acidified with 2 mL of a solution of HCl 1N. The aqueous layer is extracted three times with ethyl acetate (2 mL) and the combined organic layers are dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  then concentrated. The crude product is purified by flash column chromatography eluted with  $\text{CHCl}_3$  (100%) to afford **6** as a white solid (59 mg, 79%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz): 0.86(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.24-1.36(m, 30H<sub>2-9</sub>), 1.45-1.52(m, 4H <sub>$\alpha$ (H<sub>3-8</sub>)</sub>), 1.57-1.64(m, 2H <sub>$\alpha$ (H<sub>10</sub>)</sub>), 2.22(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.9Hz), 2.32(t, 2H<sub>10</sub>, J=7.5Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz): 14.3(C<sub>1</sub>)-19.4(C<sub>3-8</sub>)-22.9-24.9-28.6-28.6-29.0-29.1-29.3-29.3-29.4-29.6-29.6-29.7-29.8-29.9-29.9-32.1(C<sub>2-9</sub>)-34.2(C<sub>10</sub>)-65.5(C<sub>5</sub>)-65.5(C<sub>6</sub>)-77.7(C<sub>4</sub>)-77.8(C<sub>7</sub>)-179.9(C<sub>11</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2918 ( $\text{CH}_2$  vib.asym), 2849 ( $\text{CH}_2$  vib.sym), 1721 (C=O), 1467, 1296, 1273.

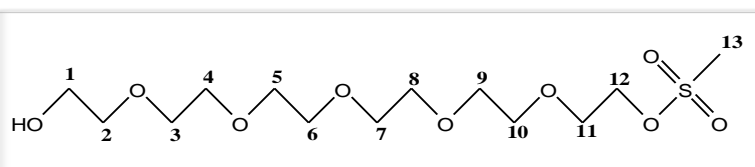
**Rf** = 0.19 ( $\text{CHCl}_3$ )

**SM** (ESI) m/z:  $[M+H]^+ = 403.4$ , **HRMS** m/z  $[M-H]^-$ : calculated :  $C_{27}H_{45}O_2$  401.3498; found: 401.3432.

### Synthesis of 17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-yl hydrogen sulfate (7)

*Chemical Formula:*  $C_{13}H_{28}O_9S$

*Molecular weight:* 360.42 g/mol



To a solution of hexaethylene glycol (5 g; 17.7 mmol; 1 eq) in tetrahydrofuran (300 mL) are added methanesulfonyl chloride (685  $\mu$ L; 8.86 mmol; 0.5 eq) and triethylamine (1.23 mL; 8.86 mmol; 0.5 eq). The solution is stirred 6h at room temperature, filtered and the filtrate is concentrated. The residue is purified by flash column chromatography eluted with MeOH/ $CHCl_3$  (3/97, v/v) to afford **7** as a colorless oil in a quantitative yield (rendement quantitatif??) (2.6 g, 41%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 300MHz): 2.42(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.06(s, 3H<sub>13</sub>), 3.57-3.75(m, 22H<sub>1-2-3-7-5-6-7-8-9-10-11</sub>), 4.34-4.37(m, 2H<sub>12</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 75MHz): 37.9(C<sub>13</sub>)-61.8(C<sub>1</sub>)-69.2(C<sub>12</sub>)-69.5-70.5-70.7-70.7-70.7-70.8-70.8(C<sub>3-4-5-6-7-8-9-10-11</sub>)-72.4(C<sub>2</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 2870 (OH), 2360, 2341, 1101 ( $SO_2-CH_3$ ).

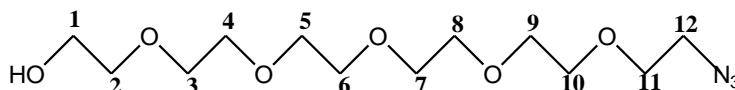
**Rf** = 0.26 (MeOH/ $CHCl_3$ : 2/98).

**SM** (ESI) m/z:  $[M+H]^+ = 361.1$ .

### Synthesis of 17-(2(15-triaz-1-en-2-yn-1-yl)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol (8)

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

Molecular weight: 307.34 g/mol



To a solution of **7** (1 g; 2.78 mmol; 1 eq) in 20 mL of acetonitrile is added sodium azide (271 mg; 4.16 mmol; 1.5 eq). The solution is stirred 48h at reflux and sodium azide is filtered. The filtrate is concentrated to give **8** as pure yellow oil (804 mg, 94%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 2.55(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.36(t, 2H<sub>12</sub>, J=5.1Hz), 3.56-3.69(m, 22H<sub>2-3-4-5-6-7-8-9-10-11</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 50.9(C<sub>12</sub>)-62.0(C<sub>1</sub>)-70.2-70.6-70.8-70.8-70.8-70.9-70.9(C<sub>3-4-5-6-7-8-9-10-11</sub>)-72.7(C<sub>2</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2867 (OH), 2096, 1558, 1104.

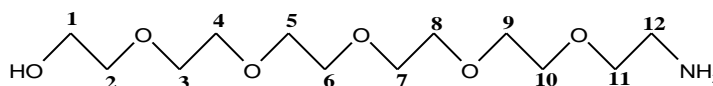
**Rf** = 0.23 (CHCl<sub>3</sub>).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 308.1.

### Synthesis of 17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol (9)

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>

Molecular weight: 281.35 g/mol



To a solution of **8** (763 mg; 2.48 mmol; 1 eq) in 7 mL of anhydrous MeOH is added palladium on carbon 10% weight (153 mg, 20% weight). The solution is stirred at room temperature 18h under hydrogen atmosphere and filtered on celite. The filtrate is concentrated and the residue is purified by flash column chromatography eluted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> (15/85, v/v + 1% NH<sub>4</sub>OH) to afford **9** as a yellow oil (620 mg, 89%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 2.55(sb, 1H<sub>OH</sub>), 2.85(t, 2H<sub>12</sub>, J=5.1Hz), 3.49-3.70(m, 22H<sub>1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11</sub>), 7.78(sb, 2H<sub>NH2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 40.9(C<sub>12</sub>)-60.9(C<sub>1</sub>)-67.2(C<sub>11</sub>)-69.6-69.6-70.1-70.1-70.2-70.3-70.4-70.5-70.5-70.6-70.7(C<sub>3-4-5-6-7-8-9-10</sub>)-73.0(C<sub>2</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3383 ( $\text{NH}_2$ ), 2874 ( $\text{OH}$ ), 2360, 2342, 1110.

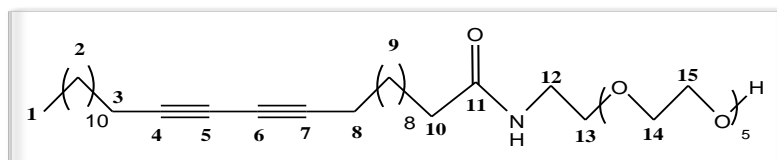
**Rf** = 0.23 (MeOH/ $\text{CHCl}_3$ : 15/85 + 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ )

**SM** (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 282.2$ .

### Synthesis of *N*-(17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-yl)heptacosamide (10)

*Chemical Formula:*  $\text{C}_{39}\text{H}_{71}\text{NO}_7$

*Molecular weight:* 665.98 g/mol



To a solution of acid **6** (215 mg; 0.53 mmol; 1 eq) in anhydrous DMF (4 mL) are added EDC (153.5 mg; 0.80 mmol; 1.5 eq) and HOBt (108.5 mg; 0.80 mmol; 1.5 eq). Then, amine **9** (181 mg; 0.64 mmol; 1.2 eq) and DIPEA (140  $\mu\text{L}$ ; 0.80 mmol; 1.5 eq) in 1.5 mL of anhydrous DMF are added. The solution is stirred 18h at room temperature, diluted with a saturated solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted three times with DCM (10 mL). The combined organic layers are washed with 20 mL of a saturated solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The residue is purified by flash column chromatography eluted with MeOH- $\text{CHCl}_3$  (3/97, v/v) to give **10** as a white solid (248mg, 70%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz): 0.83(t, 3 $\text{H}_1$ ,  $J = 6.4\text{Hz}$ ), 1.20-1.58(m, 36 $\text{H}_{2-9}$ ), 2.12(t, 2 $\text{H}_{10}$ ,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 2.18(t, 4 $\text{H}_{3-8}$ ,  $J = 6.8\text{Hz}$ ), 3.06(sb, 1 $\text{H}_{\text{OH}}$ ), 3.38-.40(m, 2 $\text{H}_{12}$ ), 3.49-3.68(m, 22 $\text{H}_{13-14-15}$ ), 6.27(sb, 1 $\text{H}_{\text{NH}}$ ).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz): 14.3( $\text{C}_1$ )-19.3( $\text{C}_{3-8}$ )-22.8-25.9-28.5-29.0-29.2-29.5-29.5-29.6-29.6-29.6-29.7-29.8-29.8-32.1( $\text{C}_{2-9}$ )-36.8( $\text{C}_{10}$ )-39.1( $\text{C}_{12}$ )- 61.8( $\text{C}_{15\text{terminal}}$ )-65.4( $\text{C}_5$ )-65.4( $\text{C}_6$ )-70.1-70.3-70.4-70.5-70.6-70.6-70.7-70.7-70.8-70.9-72.7( $\text{C}_{13-14-15}$ )-77.6( $\text{C}_4$ )-77.7( $\text{C}_7$ )-173.5( $\text{C}_{11}$ ).

**Rf** = 0.34 (MeOH/ $\text{CHCl}_3$ : 3/97).

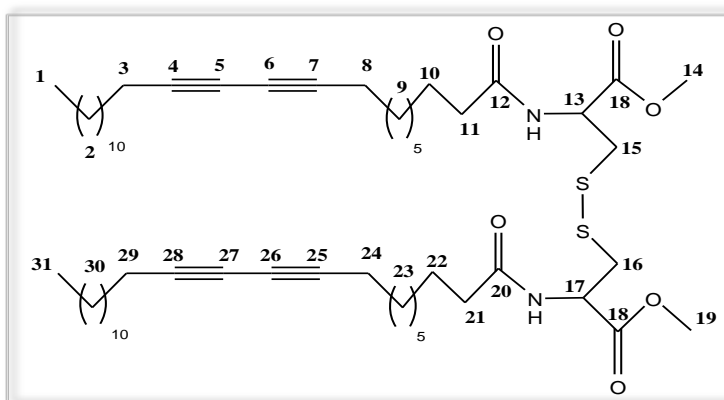
**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3301( $\text{OH}$ ), 2916 ( $\text{CH}_2\text{vib.asym}$ ), 2847 ( $\text{CH}_2\text{vib.sym}$ ), 1638 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1555, 1463, 1348, 1110 ( $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ ).

**HRMS**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : calculated :  $\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{NO}_7$  666.5231 found: 666.5255.

## Synthesis of dimethyl N,N'-dipentacos-10,12-diynoylecystinate (**12**)

Chemical Formula: C<sub>58</sub>H<sub>96</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

Molecular weight: 981.52 g/mol



To a solution of pentacos-10,12-diynoic acid (1.34 g; 3.67 mmol; 2.5 eq) in 50 mL of anhydrous DMF are added EDC (1.06 g; 3.13 mmol; 3.75 eq) and HOBt (745 mg; 3.13 mmol; 3.75 eq). Then, L-cystine ester dimethylic (500 mg; 1.47 mmol; 1 eq) and DIPEA (960  $\mu$ L; 3.13 mmol; 3.75 eq) are added. The mixture is stirred 14h at room temperature, then, diluted with 100 mL of brine and extracted three times with ethyl acetate (50 mL). The combined organic layers are concentrated, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the residue is purified by flash column chromatography eluted with AcOEt/CyHex (30/70, v/v) to give **12** as a white solid (681 mg, 47%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): 0.84(t, 6H<sub>1-31</sub>, J=7.2Hz), 1.22-1.34(m, 64H<sub>2-9-10-22-23-30</sub>), 2.19-2.24(m, 12H<sub>3-8-11-21-24-29</sub>), 3.10-3.25(m, 4H<sub>15-16</sub>), 3.73(s, 6H<sub>14-19</sub>), 4.83(q, J=7.3Hz; 2H<sub>13-17</sub>), 6.40(d, 1H<sub>NH</sub>, J=7.6Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): 14.3(C<sub>1-31</sub>)-19.4(C<sub>3-8-24-29</sub>)-19.4-19.4-22.9-25.6-28.5-28.5-28.9-29.0-29.1-29.3-29.3-29.4-29.5-29.7-29.8-29.8-29.8-32.1(C<sub>2-9-10-22-23-30</sub>)-36.6(C<sub>11-21</sub>)-40.9(C<sub>15-16</sub>)-51.7(C<sub>14</sub>)-52.9(C<sub>19</sub>)-65.4(C<sub>5-6-26-27</sub>)-77.8(C<sub>4-7-25-28</sub>)-171.1(C<sub>18</sub>)-173.2(C<sub>12-20</sub>).

**Rf** = 0.29 (AcOEt/CyHex: 30/70).

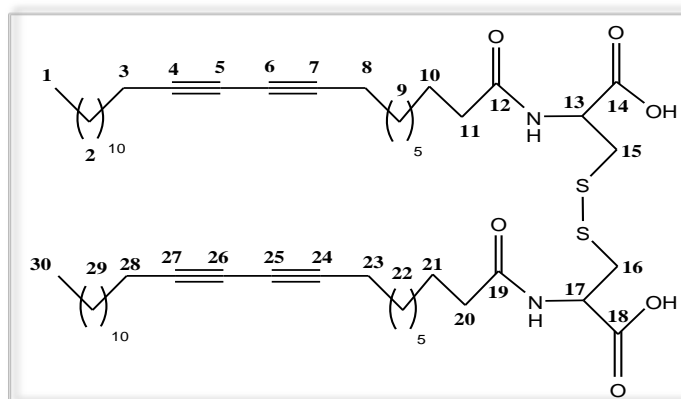
**HRMS** m/z [M+H]<sup>+</sup>: calculated : C<sub>58</sub>H<sub>97</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 981,6710 found: 981.6783.



## Synthesis of N,N'-dipentacos-10,12-diynoylecystine (**13**)

Chemical Formula: C<sub>56</sub>H<sub>92</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

Molecular weight: 953.47 g/mol



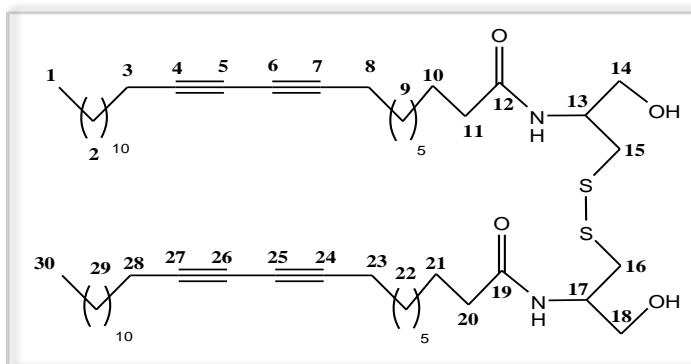
To a solution of **12** (100 mg; 0.1 mmol; 1 eq) in THF/MeOH (1.5 mL/0.9 mL) is added LiOH 1M (510  $\mu$ L; 0.51 mmol; 5 eq). The mixture is stirred 14h at room temperature, filtered to recover a white solid which is redissolved in ethyl acetate. 5 mL of a solution of NaOH 1N are then added and the aqueous layer is extracted. The recovered aqueous layer is then acidified with 10 mL of a solution of HCl 1N and extracted with ethyl acetate (20 mL). The organic layer is dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford **13** as a white solid (37mg, 39%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (THF-d<sub>8</sub>, 400MHz): 0.91(t, 6H<sub>1-30</sub>, J=6.8Hz), 1.32-1.75(m, 64H<sub>2-9-10-21-22-29</sub>), 2.20-2.27(m, 12H<sub>3-8-11-20-23-28</sub>), 2.80-3.25(m, 4H<sub>15-16</sub>), 4.70-4.75(m, 2H<sub>13-17</sub>), 7.30-7.42(m, 1H<sub>NH</sub>), 11.34(sb, 2H<sub>COOH</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (THF-d<sub>8</sub>, 100MHz): 15.0(C<sub>1-30</sub>)-20.1-20.2(C<sub>3-8-23-28</sub>)-24.1-25.5-25.7-25.9-26.1-26.3-27.0-30.0-30.1-30.3-30.4-30.6-30.6-30.7-30.8-30.9-31.0-31.1-31.2-33.4-36.1-36.6(C<sub>2-9-10-21-22-29</sub>)-36.9-37.0(C<sub>11-20</sub>)-42.8(C<sub>15-16</sub>)-53.3-53.4(C<sub>13-17</sub>)-67.0(C<sub>5-6-25-26</sub>)-78.0-78.1(C<sub>4-7-24-27</sub>)-172.9-173.0(C<sub>14-18</sub>)-173.4-173.5(C<sub>12-19</sub>).

**HRMS** m/z [M+H]<sup>+</sup>: calculated : C<sub>56</sub>H<sub>93</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 953.6397 found: 953.6466.

## Synthesis of N,N'-[dithiobis(3-hydroxypropane-1,2-diyl)]bispentacos-10,12-diynamide (14)



Chemical Formula:  $C_{56}H_{96}N_2O_4S_2$

Molecular weight: 925,50 g/mol

To a solution of **12** (446 mg; 0.45 mmol; 1 eq) in THF/MeOH (3 mL/2 mL),  $NaBH_4$  (325 mg; 9.10 mmol; 20 eq) is added slowly at  $0^\circ C$ . The mixture is stirred one hour at room temperature, and ethyl acetate (5 mL) is added, followed by 10 mL of a solution of HCl 1N. The aqueous layer is extracted three times with ethyl acetate (5 mL) and the combined organic layers are dried over  $Na_2SO_4$  then concentrated. The residue is then purified by flash column chromatography eluted with AcOEt/CyHex (55/45, v/v) to give **14** as a blue pale solid (248 mg, 60%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 400MHz): 0.85(t, 6H<sub>1-2,6</sub>, J=6.9Hz), 1.23-1.61(m, 64H<sub>2-9-10-21-22-29</sub>), 2.17-2.24(m, 12H<sub>3-8-11-20-23-29</sub>), 2.56(sb, 2H<sub>OH</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $CDCl_3$ , 100MHz): 14.3(C<sub>1-30</sub>)-19.4(C<sub>3-8-23-28</sub>)-19.4-22.9-25.7-25.9-28.5-28.6-29.0-29.1-29.2-29.3-29.4-29.4-29.6-29.7-29.8-29.8-29.9-32.1(C<sub>2-9-10-21-22-29</sub>)-37.0(C<sub>11-20-15-16</sub>)-52.7(C<sub>13-17</sub>)-63.2(C<sub>14-18</sub>)-65.4(C<sub>5-26</sub>)-65.5(C<sub>6-25</sub>)-77.7(C<sub>4-27</sub>)-77.9(C<sub>7-24</sub>)-173.9(C<sub>12-19</sub>).

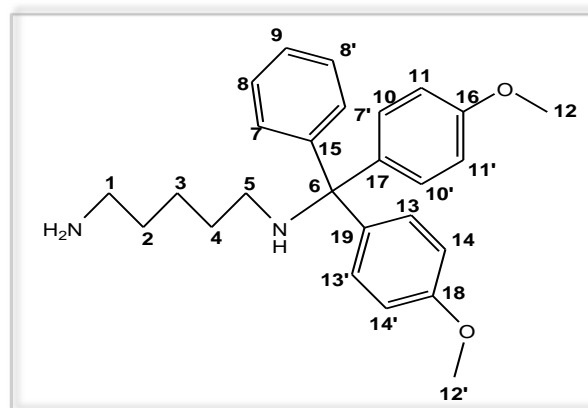
**Rf** = 0.32 (AcOEt/CyHex: 55/45).

**HRMS** m/z  $[M+H]^+$ : calculated  $C_{56}H_{96}N_2O_4S_2$  925.6812 found: 925.6881.

## Synthesis of N-(bi-4-methoxyphenyl)(phenyl)methylpentane-1,5-diamine (**15**)

Chemical Formula:  $C_{26}H_{32}N_2O_2$

Molecular weight: 404.54 g/mol



To a solution of 1,5-diaminopentane (500 mg; 4.89 mmol; 5 eq) in THF (13 mL), a solution of dimethoxytrityl chloride (332 mg; 0.98 mmol; 1 eq) in THF (6 mL) is added dropwise at 0°C. The mixture is stirred 14h at room temperature and filtered over cotton. The solvent is evaporated and the residue is dissolved in 20 mL of ethyl acetate, then washed three times with a solution of saturated  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL). The organic layer is dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated. The residue is then purified by flash column chromatography eluted with DCM/MeOH +10%  $\text{NEt}_3$  to avoid the degradation of the methoxytrityl because of the acidity of the silica gel) to obtain **15** as a yellow oil (105 mg, 5%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz): 1.36-1.56(m, 6 $\text{H}_{2-3-4}$ ), 2.16(t, 2 $\text{H}_1$ ,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 2.70(t, 2 $\text{H}_5$ ,  $J=6.5\text{Hz}$ ), 3.82(s, 6 $\text{H}_{12+12'}$ ), 6.83(d, 4 $\text{H}_{11+11'+14+14'}$ ), 7.20-7.51(m, 9 $\text{H}_{7-7'-8-8'-9-10-10'-13-13'}$ ).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz): 25.1( $\text{C}_3$ )-31.1( $\text{C}_4$ )-34.2( $\text{C}_2$ )-42.6( $\text{C}_1$ )-44.0( $\text{C}_5$ )-55.6( $\text{C}_{12-12'}$ )-70.3( $\text{C}_6$ )-113.4( $\text{C}_{11-11'-14-14'}$ )-126.4( $\text{C}_9$ )-128.1( $\text{C}_{7-7'}$ )-128.9( $\text{C}_{8-8'}$ )-130.1( $\text{C}_{13-13'-10-10'}$ )-139.2( $\text{C}_{17-19}$ )-147.3( $\text{C}_{15}$ )-158.1( $\text{C}_{16-18}$ ).

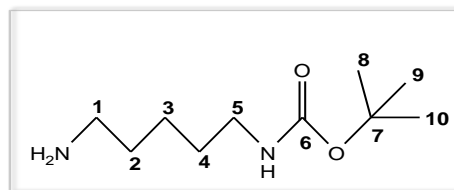
**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3361( $\text{NH}_2$ ), 1508, 1251, 754(aromatiques).

**SM** (ESI)  $m/z$ : 147 (correspond à la masse du DMT déprotégé).

## Synthesis of tert-butyl-(5-aminopentyl)carbamate (**16**)

*Chemical Formula:* C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 202.29 g/mol



To a solution of 1,5-diaminopentane (2.3 mL; 19.57 mmol; 5 eq) in THF (45 mL), a solution of Boc<sub>2</sub>O (854 mg; 3.92 mmol; 1 eq) in THF (35 mL) is added dropwise at 0°C. The mixture is stirred 14h at room temperature, then the solution is filtered and the filtrate is evaporated. The residue is dissolved in ethyl acetate (30 mL) and washed three times with brine (40 mL). The organic layer is dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue is purified by flash chromatography eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (70/30, v/v + 5% NH<sub>3</sub>,) to yield **16** as a white oil (677 mg, 17%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (MeOH, 300MHz): 1.35-1.52(m, 15H<sub>8-9-10-2-3-4</sub>), 2.65(t, 2H<sub>5</sub>, J=7.3Hz), 3.04(t, 2H<sub>1</sub>, J=7.5Hz).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (MeOH, 75MHz): 24.0(C<sub>3</sub>)-27.7(C<sub>6</sub>)-29.7(C<sub>2-4</sub>)-32.1-40.1(C<sub>5</sub>)-41.2(C<sub>1</sub>)-78.7(C<sub>8-9-10</sub>)-157.4(C<sub>6</sub>).

**Rf** = 0.14 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 70/30 + 5% NH<sub>4</sub>OH)

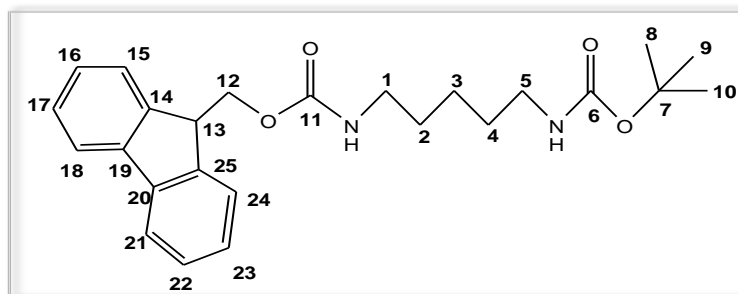
**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 3349 (NH<sub>2</sub>), 2975, 2935, 1693 (C=O), 1533, 1393, 1367, 1278, 1248.

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 203.4.

## Synthesis of tert-butyl 9H-fluoren-9-ylmethyl pentane-1,5-diylbiscarbamate (**17**)

*Chemical Formula:* C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

*Molecular weight:* 424.43 g/mol



To a solution of compound **16** (588 mg; 2.91 mmol; 1 eq) in THF, a solution of sodium bicarbonate (1.22 g; 14.54 mmol; 5 eq) in THF is added. The mixture is stirred 15 min and a solution of Fmoc-Cl (753 mg; 2.91 mmol; 1 eq) in THF is added dropwise at 0°C. The mixture is then stirred 5h at room temperature, filtered and concentrated. The residue is

dissolved in ethyl acetate (5 mL) and water (5 mL) is added. The organic layer is extracted three times with ethyl acetate (5 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford **17** as a white solid (1 g, 83%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 1.27-1.55(m, 6H, H<sub>2-3-4</sub>), 1.46(s, 9H, H<sub>8-9-10</sub>), 3.11-3.21(m, 4H, H<sub>1-5</sub>), 4.22(t, J=7Hz, 1H, H<sub>13</sub>), 4.41(d, J=7,7Hz, 2H, H<sub>12</sub>), 4.59(sb, 1H<sub>NH</sub>), 4.89(sb, 1H<sub>NH</sub>), 7.27-7.43(m, 4H, H<sub>16-17-22-23</sub>), 7.60(d, J=8Hz, 2H<sub>15-24</sub>), 7.77(d, J=8,HHz, 2H<sub>18-21</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 24.0(C<sub>3</sub>)-28.6(C<sub>8-9-10</sub>)-29.8(C<sub>2</sub>)- 29.9(C<sub>4</sub>)-40.5(C<sub>1</sub>)-41.1(C<sub>5</sub>)-47.5(C<sub>13</sub>)-66.7(C<sub>12</sub>)-79.3(C<sub>7</sub>)-120.1(C<sub>18-21</sub>)-125.2(C<sub>15-24</sub>)-127.2(C<sub>16-23</sub>)-127.8(C<sub>17-22</sub>)-141.5(C<sub>19-20</sub>)-142.2(C<sub>14-25</sub>)-156.2(C<sub>6</sub>)-156,66(C<sub>11</sub>).

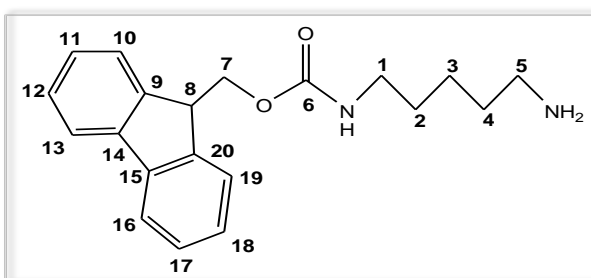
**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 673, 1250, 1522, 1694 (C=O).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 425.3.

### Synthesis of 9H-fluoren-9-ylmethyl (5-aminopentyl)carbamate (**18**)

*Chemical Formula:* C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 324.42 g/mol



To a solution of compound **17** (1 g; 2.36 mmol; 1 eq) in 15 mL of dry DCM, a solution of trifluoroacetic acid in DCM (38 mL) is added. The mixture is stirred 1h at room temperature and the solvent is evaporated. The residue is then dissolved in ethanol and diethyl ether and concentrated to afford an orange solid. This solid is dissolved in the minimum of ethanol and diethyl ether is added. The solution is placed in the fridge during 1h to give a white solid which is recovered by filtration. This purification is repeated two times to yield **18** as a white salt (655 mg, 65%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (MeOH, 300MHz): 1.07-1.55(m, 6H<sub>2-3-4</sub>), 2.79(t, 2H<sub>1</sub>, J=19.0Hz), 3.01(t, 2H<sub>5</sub>, J=17.0Hz), 4.09(t, 1H<sub>8</sub>, J=17Hz), 4.26(d, 2H<sub>7</sub>, J=16.5Hz), 7.16-7.32(m, 4H<sub>11-12-17-18</sub>), 7.53(d, 2H<sub>10-19</sub>, J=18.5Hz), 7.69(d, 2H<sub>13-16</sub>, J=17.5Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (MeOH, 75MHz): 24.7(C<sub>3</sub>)-28.3(C<sub>2</sub>)-30.5(C<sub>4</sub>)-40.8(C<sub>5</sub>)-41.4(C<sub>1</sub>)-47.5(C<sub>8</sub>)-67.7(C<sub>7</sub>)-121.1(C<sub>13-16</sub>)-126.2(C<sub>10-19</sub>)-128.3(C<sub>11-18</sub>)-128.9(C<sub>12-17</sub>)-142.8(C<sub>14-15</sub>)-145.5(C<sub>9-20</sub>)-159.2(C<sub>6</sub>).

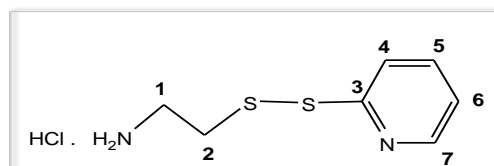
**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3359 (NH<sub>2</sub>), 3042, 1698 (C=O), 1539, 1437, 1283, 1202, 838, 801, 762, 733.

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 325.4.

### Synthesis of the 2-(pyridyldithio)-ethylamine (**19**)

*Chemical Formula:* C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 186.30 g/mol



To a solution of 2-mercaptoethylamine hydrochloride (246 mg; 2.17 mmol; 1 eq) in 4 mL of MeOH, a solution of 2,2'-dipyridyl disulfide (955 mg; 4.33 mmol; 2 eq) in MeOH (2.5 mL) containing glacial acetic acid (0.5 mL) is added dropwise. The mixture is stirred under argon for 48h at room temperature then concentrated under reduced pressure to give a yellow oil. This oil is dissolved in a minimum of methanol and diethyl ether is added. The solution is conserved in the fridge during 30 min to precipitate a white solid, which is recovered by filtration. This operation is repeated one more time to afford compound **19** (364 mg, 75%).

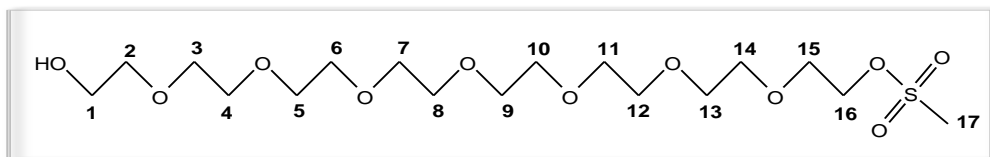
**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (D<sub>2</sub>O, 300MHz): 2.88-3.01(m, 2H<sub>2</sub>), 3.18-3.33(m, 2H<sub>1</sub>), 7.14-7.22(m, 1H<sub>5</sub>), 7.54-7.73(m, 2H<sub>4-6</sub>), 8.29(t, 1H<sub>7</sub>, J=6.0Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (D<sub>2</sub>O, 75MHz): 37.3(C<sub>1</sub>)-39.2(C<sub>2</sub>)-123.3(C<sub>4-6</sub>)-123.7(C<sub>1</sub>)-139.5(C<sub>5</sub>)-151.3(C<sub>7</sub>)-159.9(C<sub>3</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3115 (NH<sub>2</sub>), 1607, 1575, 1417, 1328, 1113, 1099, 870, 812, 765.

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 187.

## Synthesis of 23-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaooxatricos-1-yl hydrogen sulfate (20)



*Chemical Formula:* C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>O<sub>11</sub>S

*Molecular weight:* 448.53 g/mol

To a solution of octaethylene glycol (5 g; 13.5 mmol; 1 eq) in THF (500 mL), methanesulfonyl chloride (522  $\mu$ L; 6.75 mmol; 0.5 eq) and triethylamine (935  $\mu$ L; 6.75 mmol; 0.5 eq) are added. The solution is stirred 2h at room temperature, filtrated over cotton and the filtrate is concentrated under vacuum. The residue is then purified by flash column chromatography eluted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> (3/97, v/v) to afford **20** as a colorless oil (2.12 g, 70%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): 2.70(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.04(s, 3H<sub>17</sub>), 3.55-3.73(m, 30H<sub>1-15</sub>), 4.33-4.35(m, 2H<sub>16</sub>).

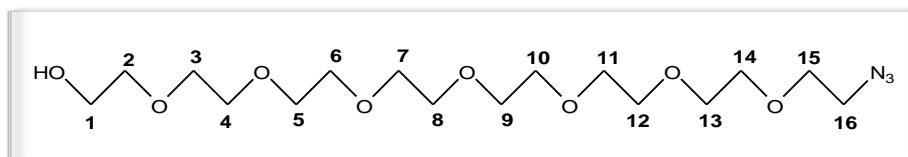
**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): 37.9(C<sub>17</sub>)-61.9(C<sub>1</sub>)-69.2(C<sub>16</sub>)-69.5-70.5-70.7-70.7-70.7-70.8-70.8(C<sub>3-15</sub>)-72.4(C<sub>2</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2870 (OH), 1378 (Mesylate), 1101.

**Rf** = 0.25 (MeOH/CHCl<sub>3</sub>: 3/97)

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 449.2.

### Synthesis of 23-(2l-triaz-1-en-2-yn-1-yl)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (21)



*Chemical Formula:* C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

*Molecular weight:* 395.45 g/mol

To a solution of **20** (2.12 g; 4.73 mmol; 1 eq) in 40 mL of CH<sub>3</sub>CN is added sodium azide (461 mg; 7.09 mmol; 1.5 eq). The solution is stirred 48h under reflux and sodium azide is filtered. The filtrate is concentrated under vacuum to give **21** as a pure yellow oil (1.79 g, 96%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): 2.79(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.34(t, 2H<sub>16</sub>, J=5.2Hz), 3.54-3.64(m, 30H<sub>1-15</sub>).

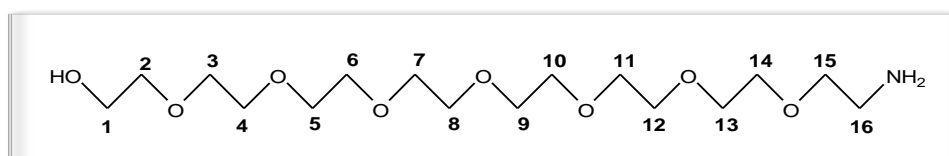
**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): 50.8(C<sub>16</sub>)-61.8(C<sub>1</sub>)-70.2-70.5-70.5-70.6-70.7-70.7-70.80-70.9(C<sub>3-15</sub>)-72.7(C<sub>2</sub>).

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 2867 (OH); 2100 (N<sub>3</sub>); 1104.

**Rf** = 0.18 (CHCl<sub>3</sub>)

**SM** (ESI) m/z: [M-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> = 368.2.

### Synthesis of 23-amino-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (22)



*Chemical Formula:* C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>8</sub>

*Molecular weight:* 369.45 g/mol

To a solution of **21** (1.79 g; 4.53 mmol; 1 eq) in THF (20 mL) is added triphenylphosphine (1.31 g; 4.98 mmol; 1.1 eq) and water (122 μL; 6.80 mmol; 1.5 eq). The solution is stirred at room temperature 18h and concentrated under vacuum. The residue is purified by flash



column chromatography eluted with MeOH/CHCl<sub>3</sub>: 15/85, v/v + 1% NH<sub>4</sub>OH to afford **22** as a transparent oil (1.46 g, 87%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 2.53(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.05-3.15(m, 4H<sub>1-16</sub>), 3.17-3.36(m, 30H<sub>2-15</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 40.6(C<sub>16</sub>)-60.3(C<sub>1</sub>)-69.5-69.7-70.0-71.7-72.2(C<sub>3-15</sub>)-73.0(C<sub>2</sub>).

**IR**: ν (cm<sup>-1</sup>) 3383 (NH<sub>2</sub>), 2874 (OH), 1110.

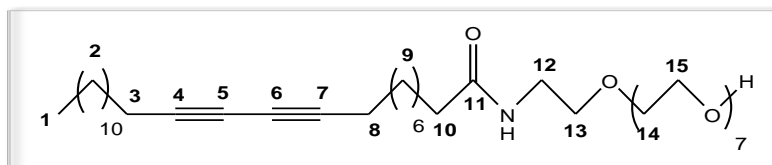
**Rf** = 0.20 (MeOH/CHCl<sub>3</sub>: 15/85 + 1% NH<sub>4</sub>OH).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 370.2.

### Synthesis of N-(23-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricos-1-yl)pentacos-10,12-diynamide (**23**)

*Chemical Formula*: C<sub>41</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>9</sub>

*Molecular weight*: 726.04 g/mol



To a solution of pentacos-10,12-diynoic acid (1.23 g; 3.29 mmol; 1 eq) in 10 mL of anhydrous DMF are added EDC (947 mg; 4.94 mmol; 1.5 eq), HOBt (667.5 mg; 4.94 mmol; 1.5 eq), DIPEA (860 μL; 4.94 mmol; 1.5 eq) and finally **22** (1.46 g; 3.95 mmol; 1.2 eq) in DMF (5 mL). The reaction is stirred 18h at room temperature and 40 mL of a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl is added. The aqueous layer is extracted with DCM (30 mL) and the organic layer is washed three times with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl to eliminate traces of DMF, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product is purified by flash column chromatography eluted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> (3/97, v/v) to afford **23** as a pale blue solid (1.30 g, 54%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 0.82(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.19-1.47(m, 32H<sub>2-9</sub>), 2.08-2.20(m, 6H<sub>3-8-10</sub>), 2.89(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.37-3.0(m, 2H<sub>12</sub>), 3.49-3.67(m, 30H<sub>13-14-15</sub>), 6.15(sb, 1H<sub>NH</sub>).

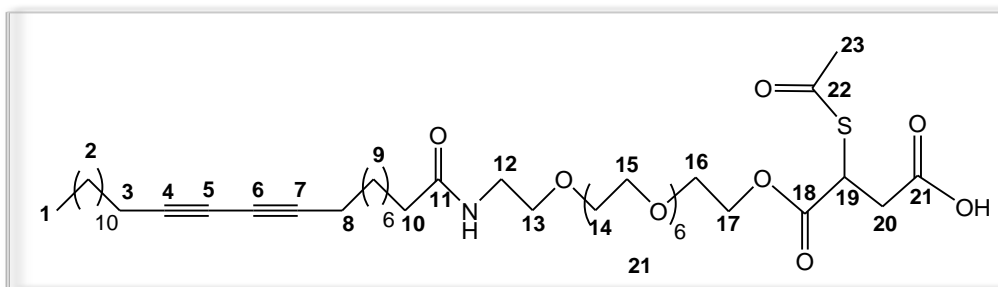
**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 14.2(C<sub>1</sub>)-19.3(C<sub>3-8</sub>)-19.3-22.8-25.8-28.4-28.5-28.9-29.0-29.1-29.2-29.3-29.4-29.5-29.6-29.7-29.8-32.0(C<sub>2-9</sub>)-36.8(C<sub>10</sub>)-39.3(C<sub>12</sub>)-61.8(C<sub>15terminal</sub>)-65.4(C<sub>5</sub>)-65.4(C<sub>6</sub>)-70.1-70.3-70.5-70.6-70.7-70.7-70.9-72.7(C<sub>13-14-15</sub>)-77.7(C<sub>4-7</sub>)-173.3(C<sub>11</sub>).

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3301(OH), 2918( $\text{CH}_2$  vib.asym), 2847( $\text{CH}_2$  vib.sym), 1638(C=O), 1111.

**R<sub>f</sub>** = 0.24 (MeOH/ $\text{CHCl}_3$ : 3/97).

**SM** (ESI)  $m/z$ : 726.04 [M].

**Synthesis of 3-(acetylthio)-4,30-dioxo-5,8,11,14,17,20,23,26-octaoxa-29-azatetrapentaconta-39,41-diyn-1-oic acid (24)**



**Chemical Formula:**  $\text{C}_{47}\text{H}_{81}\text{NO}_{13}\text{S}$

**Molecular weight:** 900.21 g/mol

To a solution of amphiphile **23** (80 mg; 0.11 mmol; 1 eq) in 0.5 mL of anhydrous dichloromethane are added DMPA (7 mg; 0.06 mmol; 0.5 eq) and S-acetylmercaptosuccinic anhydride (58 mg; 0.33 mmol; 3 eq). The mixture is stirred 14h at room temperature and diluted with dichloromethane (2 mL). 2 mL of a solution of hydrochloric acid 1N are then added and the aqueous layer is extracted three times with DCM (2 mL). The combined organic layers are dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The crude product is purified by flash column chromatography eluted with MeOH/ $\text{CHCl}_3$  (4/96, v/v) to afford the compound **24** as a transparent oil (46mg, 46%).

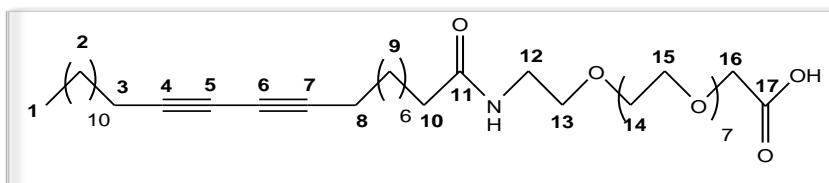
**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz): 0.85(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.8Hz), 1.21-1.58(m, 32H<sub>2-9</sub>), 2.14-2.22(m, 6H<sub>3-8-10</sub>), 2.33(s, 3H<sub>23</sub>), 2.87(d, 2H<sub>20</sub> J=6.4Hz), 3.40-3.43(m, 2H<sub>12</sub>), 3.52-3.70(m, 28H<sub>13-14-15-16</sub>), 4.19-4.35(m, 2H<sub>17</sub>), 4.54(t, 1H<sub>19</sub>, J=6.4Hz), 6.42(sb, 1H<sub>NH</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz): 14.1(C<sub>1</sub>); 19.2(C<sub>3-8</sub>)-22.7-25.7-28.4-28.4-28.8-28.9-29.0-29.1-29.2-29.3-29.4-29.5-29.6-29.6-29.7-29.7-31.9-36.6(C<sub>2-9</sub>)-37.0(C<sub>10</sub>)-39.2(C<sub>12</sub>)-30.1(C<sub>23</sub>)-42.0(C<sub>19</sub>)-65.3(C<sub>17</sub>)-65.4(C<sub>5-6</sub>)-68.7(C<sub>16</sub>)-70.0-70.2-70.4-70.4-70.5-70.5-70.6-70.6-70.8-76.7-77.0-77.3(C<sub>13-14-15</sub>)-77.5(C<sub>4</sub>)-77.6(C<sub>7</sub>).

**R<sub>f</sub>**: 0.29 (MeOH/ $\text{CHCl}_3$ : 4/96).

**SM** (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 901.4$ .

## Synthesis of 28-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxa-27-azadopentaconta-37,39-diyn-1-oic acid (**25**)



*Chemical Formula:* C<sub>43</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>11</sub>

*Molecular weight:* 784.07 g/mol

To a suspension of NaH (50 mg; 2.07 mmol; 3 eq) in anhydrous THF (3 mL), is added bromoacetic acid (144 mg; 1.03 mmol; 1.5 eq) at 0°C. The reaction was stirred 30 min at room temperature and a solution of **23** (500 mg; 0.69 mmol; 1 eq) in anhydrous DMF (3 mL) is added at 0°C. The mixture is stirred 14h at room temperature, then diluted with 10 mL of a solution of HCl 1N and extracted three times with ethyl acetate (5mL). The combined organic layers are washed with 30 mL of a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography eluted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> (8/92, v/v) to afford **25** as a white solid (168 mg, 54%).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 0.84(t,3H<sub>1</sub>, J=6.9Hz), 1.17-1.48(m, 32H<sub>2-9</sub>), 2.12-2.21(m, 6H<sub>3-8-10</sub>), 3.26(sb, 1H<sub>OH</sub>), 3.38(m, 2H<sub>12</sub>), 3.41-3.67(m, 30H<sub>13-14-15</sub>), 2.69(s, H<sub>16</sub>), 6.58(sb, 1H<sub>NH</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz): 14.3(C<sub>1</sub>)-19.4(C<sub>3-8</sub>)-22.9-25.9-28.5-29.0-29.0-29.1-29.3-29.4-29.5-29.6-29.8-32.1(C<sub>2-9</sub>)-36.8(C<sub>10</sub>)-39.2(C<sub>12</sub>)-65.4(C<sub>5</sub>)-65.5(C<sub>6</sub>)-69.4(C<sub>16</sub>)-69.8-69.9-70.1-70.2-70.3-70.5-70.6-70.8(C<sub>13-14-15</sub>)-77.5(C<sub>4</sub>)-77.7(C<sub>7</sub>)-173.6(C<sub>11</sub>)-175.4(C<sub>17</sub>).

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 3304 (OH), 2918 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2848 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1637 (C=O), 1464, 1347.

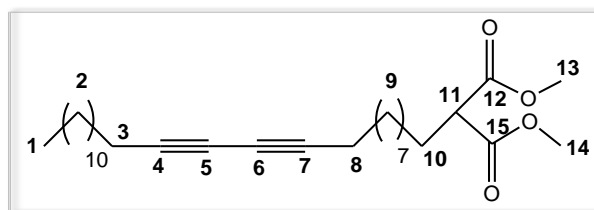
**Rf** = 0.34 (MeOH/CHCl<sub>3</sub>: 8/92).

**SM** (ESI) m/z: [M-H]<sup>-</sup> = 783.1.

## Synthesis of dimethyl pentacos-10,12-diyn-1-ylmalonate (**28**)

*Chemical Formula:* C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub>

*Molecular weight:* 474.72 g/mol



To a suspension of sodium hydride (119 mg; 2.96 mmol; 1.3 eq) in anhydrous THF (12 mL), is added dimethyl malonate (339  $\mu$ L; 2.96 mmol; 1.3 eq). The solution is stirred one hour at room temperature to activate the malonate. Then, a solution of pentacos-10,12-diynyl methanesulfonate **2** (1 g; 2.28 mmol; 1 eq) and TBAI (126 mg; 0.34 mmol; 0,1 eq) in anhydrous THF (12 mL) are added. The mixture is refluxed 24h, diluted with 50 mL of a solution of hydrochloric acid 1N and extracted two times with ethyl acetate (50 ml). The combined organic layers are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue is then purified by flash chromatography eluted with CHCl<sub>3</sub>/CyHex (20/80, v/v) to afford **28** as a yellow oil (986 mg, 76%).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 0.85(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.0Hz), 1.22-1.80(m, 34H<sub>2-9</sub>), 1.78-1.89(m, 2H<sub>10</sub>), 2.20(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.8Hz), 3.32(t, 1H<sub>11</sub>, J=5.2Hz), 3.37(s, 6H<sub>13-14</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz): 14.3(C<sub>1</sub>); 19.4(C<sub>3-8</sub>); 22.9-27.5-28.6-28.6-29.0-29.1-29.1-29.2-29.3-29.6-29.4-29.4-29.5-29.6-29.7-29.8-29.9-32.1(C<sub>2-9</sub>)-51.9(C<sub>11</sub>)-52.6(C<sub>13-14</sub>)-65.4-65.5(C<sub>5-6</sub>)-77.8(C<sub>4-7</sub>)-170.2(C<sub>12-15</sub>).

**IR:** 2925 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2854 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1756 (C=O), 1739 (C=O), 1463, 1434, 1197.

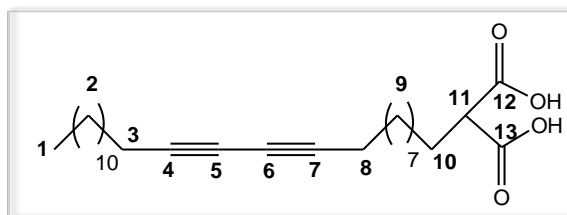
**Rf** = 0.28 (CHCl<sub>3</sub>/CyHex: 20/80).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 475.3.

### Synthesis of pentacos-10,12-diyne-1-ylmalonic acid (**A1**)

*Chemical Formula:* C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>

*Molecular weight:* 446.66 g/mol



To a solution of **28** (200 mg; 0.42 mmol; 1 eq) in a mixture of THF/MeOH (1.5 mL/1.2 mL), is added a solution of LiOH 1M (1.3 mL; 1.3 mmol; 3 eq). The solution is stirred at room temperature 14h, diluted with 10 mL of a solution of hydrochloric acid 1N and extracted three times with ethyl acetate (10 mL). The combined organic layers are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to give **A1** as a white pure solid in a quantitative yield (121.5 mg).

**RMN<sup>1</sup>H** δ(ppm) (THFd<sub>8</sub>, 400MHz): 1.0(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.8Hz), 1.41-1.63(m, 34H<sub>2-9</sub>), 1.92-1.95(m, 2H<sub>10</sub>), 2.35(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.8Hz), 3.31(t, 1H<sub>11</sub>, J=7.5Hz).

**RMN<sup>13</sup>C** δ(ppm) (THFd<sub>8</sub>, 100MHz): 15.0(C<sub>1</sub>)-20.2(C<sub>3-8</sub>)-22.9-28.6-29.1-29.3-29.6-29.7-29.9-29.7-32.2(C<sub>2-9-10</sub>)-52.7(C<sub>11</sub>)-66.9(C<sub>5</sub>)-67.0(C<sub>6</sub>)-77.9(C<sub>4</sub>)-78.0(C<sub>7</sub>)-171.7(C<sub>12-13</sub>).

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 2918 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2848 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1704 (C=O), 1465.

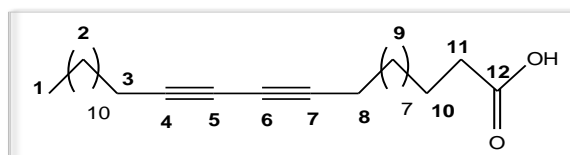
**Rf** = 0.43 (MeOH/CHCl<sub>3</sub>: 20/80 + 0,5% acetic acid).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 447.3.

### Synthesis of heptacos-12,14-diyneic acid (**29**)

*Chemical Formula:* C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>

*Molecular weight:* 402.65 g/mol



To a solution of malonic acid **A1** (240 mg; 0.54 mmol; 1 eq) in THF (4.3 mL) is added a solution of HCl in acetic acid (0.1% of concentrated acid; 4.3 mL). The mixture is stirred under microwaves 21 min at 150°C. Ethyl acetate and water are added and the aqueous layer is extracted. Combined organic layers are dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue is purified over silica eluted with CHCl<sub>3</sub> to give **29** as a white solid in a quantitative yield (215 mg).

**RMN<sup>1</sup>H**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):  $\delta$  0.86(t, 3H<sub>1</sub>, J=6.6Hz), 1.24-1.52 (m, 34H<sub>2-9</sub>), 1.57-1.64(m, 2H<sub>10</sub>), 2.22(t, 4H<sub>3-8</sub>, J=6.9Hz), 2.32(t, 2H<sub>11</sub>, J=7.5Hz).

**RMN<sup>13</sup>C**  $\delta$ (ppm) (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz):  $\delta$  14.3(C<sub>1</sub>); 19.4(C<sub>3-8</sub>); 22.9-24.9-28.6-28.6-29.0-29.1-29.3-29.3-29.4-29.6-29.6-29.7-29.8-29.9-30.0-32.1(C<sub>2-9-10</sub>)-34.2(C<sub>11</sub>)-65.5(C<sub>5</sub>)-65.5(C<sub>6</sub>)-77.7(C<sub>4</sub>)-77.8(C<sub>7</sub>)-179.9(C<sub>12</sub>).

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2918 (CH<sub>2</sub> vib.asym), 2848 (CH<sub>2</sub> vib.sym), 1721 (C=O); 1467, 1296.

**Rf** = 0.19 (100% chloroform).

**SM** (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 403.4.