



HAL
open science

Synthèse et étude des propriétés d'auto-association de molécules amphiphiles dérivées de D-glucose

Christelle Silioc

► **To cite this version:**

Christelle Silioc. Synthèse et étude des propriétés d'auto-association de molécules amphiphiles dérivées de D-glucose. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10083 . tel-01127474

HAL Id: tel-01127474

<https://theses.hal.science/tel-01127474>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 83-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE « MATERIAUX DE LYON »

Spécialité « Chimie et Physico-Chimie »

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 juin 2012

par

Mlle SILIOC Christelle

**Synthèse et étude des propriétés d'auto-association de molécules
amphiphiles dérivées de D-glucose**

Directrice de thèse : Mme LADAVIERE Catherine
Co-directeur : M. TROMBOTTO Stéphane

JURY :

Mme M. BLANZAT	Chargée de Recherche CNRS, Université Paul Sabatier	Examinatrice
M. L. DAVID	Professeur, Université Lyon 1	Examinateur
M. Y. GROHENS	Professeur, Université de Bretagne Sud	Rapporteur
Mme C. LADAVIERE	Chargée de Recherche CNRS, Université Lyon 1	Directrice
M. A. POLIDORI	Professeur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Rapporteur
M. S. TROMBOTTO	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

If "plan A" didn't work, the alphabet has 25 more letters. Stay cool.

Remerciements

Ce manuscrit marque la fin de mes études. Pendant ces huit années, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes extraordinaires. Je remercie vivement Thierry Delcroix d'avoir encadré mon stage de DUT chez Colas. Un grand merci au Commandant Philippe Chopin de m'avoir accueillie pour mon stage de licence à la Police Scientifique de Paris. Moreover, I have been very fortunate to be supervised by Professor Bo Nystrøm (Polymer Research Group, University of Oslo, Norway) during my Bachelor internship. He was the reason why I decided to pursue a career in research. His enthusiasm and love for science was contagious. I will forever be thankful to my former colleagues and friends Atoosa Maleki and Neda Behesti, they have been so kind and helpful. Merci !

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (IMP@UCBL1), dirigé par le Professeur Philippe Cassagnau. Ce projet de recherche a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie Catherine Ladavière et Stéphane Trombotto qui m'ont accueillie et encadrée pendant ces trois années. Merci pour votre disponibilité et vos conseils scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche pluridisciplinaire. Je tiens également à exprimer mes remerciements au Pr. Laurent David pour son implication dans ce travail, ses précieuses explications, sa patience et son enthousiasme. Merci d'avoir présidé le jury de thèse.

Je suis très honorée par la présence au titre de rapporteurs de Messieurs Yves Grohens (Trugarez !) et Ange Polidori. Merci à Muriel Blanzat d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à ce travail : Fernande Boisson, Cécile Chamignon, Annick Waton, Nathalie Henriques, Cyrille Rochas, Beatrice Burdin & Pierre Alcouffe. Muchas gracias Johan Pineda !

Le travail au sein du laboratoire n'aurait pas été si sympathique sans la bonne humeur des personnes qui y travaillent. Vous avez contribué à la réussite de cette thèse. Merci à tous les permanents et en particulier à Jean-Mi, Agnès, Olivier, Sylvie, Sabine, Nadia & Thierry; ainsi qu'aux étudiants et stagiaires, notamment à Maher, Siham, Neithita, Cé Guinto, Ancuta, Rihab, Wafa, Kelsey, Rokhsana, Cédric, Emilie... et au bureau 426 (the Best Ever!).

Un énorme merci à mes amis Lyonnais : Aline, Sébastien, Kévin, Julien, Denis, Camille, Jessica, Mathieu, Ramona... tellement de souvenirs.... ! Sans oublier les West Coast Swingers avec qui on a partagé plein de bons moments en dansant mais pas que... Et puis aussi aux amis d'ailleurs: Laëtitia, Marie, Eugénie, Julien, Claire, Sophie, Laure... Loin des yeux mais près du cœur ! Enfin, je tiens à remercier ma famille, mes parents et Ludo qui m'ont supportée et encouragée tout au long de ces trois années... et demi !

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I	3
Etude bibliographique – Les molécules amphiphiles monocaténares	
Chapitre II	75
Synthèse de molécules amphiphiles dérivées de D-glucose et de N-acétyl-D-glucosamine	
Chapitre III	137
Etude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose, seules, ou en mélange avec un phospholipide	
Conclusion générale	207
Annexes	211

Liste des abréviations

ACUR	Acétate d'Uranyle
C6	Hexylamine
C8	Octylamine
C12	Dodécylamine
C16	Hexadécylamine
CAC	Concentration d'agrégation critique
CMC	Concentration micellaire critique
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
Glc	D-Glucose
GlcC6	<i>N</i> -hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol
GlcC8	<i>N</i> -octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol
GlcC12	<i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol
GlcC16	<i>N</i> -hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol
GlcN	D-Glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -Acétyl-D-glucosamine
MET	Microscopie électronique en transmission
QELS	Diffusion quasi-élastique de la lumière
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles
SMO	Système moléculaire organisé
TMS	Tétraméthylsilane

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

De nos jours, le développement de (nano)matériaux innovants dérivés de ressources naturelles est en plein essor. En effet, ceux-ci permettent des applications dans des domaines variés, notamment à l'interface entre la Chimie et les Sciences de la Vie. Dans ce contexte, l'élaboration de systèmes basés sur des structures moléculaires dont les éléments constitutifs sont présents au sein de la biomasse répond à des enjeux permanents. Les polymères naturels répondent à ces critères, en particulier ceux de la famille des glycosaminoglycanes (chitosane, acide hyaluronique...). Ainsi, les propriétés de biocompatibilité, biodégradabilité et biorésorbabilité de ces polymères peuvent être préservées au sein des systèmes envisagés, et qui plus est, leur conférer leur propriété inhérente de bioactivité. Par ailleurs, le cas des systèmes moléculaires organisés composés de molécules amphiphiles, présente un intérêt majeur en raison de leur propriété d'auto-organisation supramoléculaire spontanée dans l'eau, leur procurant ainsi la capacité d'incorporer, par exemple, des principes actifs pour des applications biomédicales.

Ce travail doctoral s'inscrit dans un axe de recherche qui consiste à élaborer une nouvelle génération de systèmes moléculaires nano-organisés qui présenteront une bioactivité propre et pourront être les moteurs d'un nouveau mode de formulations bioactives. A long terme, l'objectif est de synthétiser des molécules amphiphiles possédant des têtes polaires dérivées d'oligomères de glycosaminoglycanes afin d'exploiter leur caractère non seulement hydrosoluble mais surtout biocompatible et bioactif (activités bactériostatique, fongistatique, élicitrice...), et une queue hydrophobe, constituée de chaînes lipidiques de dimensions contrôlées.

Dans ce contexte, ce travail porte plus précisément sur la validation d'un modèle de molécules amphiphiles dérivées du monosaccharide D-glucose et possédant une chaîne hydrocarbonée de différentes longueurs (6, 12 ou 16 atomes de carbone). En parallèle, la démarche envisagée est d'examiner un deuxième modèle se rapprochant des molécules

amphiphiles présentant des têtes polaires dérivées d'oligomères de glycosaminoglycanes, en accédant à des molécules amphiphiles dont la tête polaire est dérivée de la *N*-acétyl-*D*-glucosamine, un des monosaccharides constitutif des glycosaminoglycanes.

Ce travail est divisé en trois principaux chapitres qui sont brièvement décrits ci-dessous :

- Le premier chapitre est consacré à l'état de l'art sur les molécules amphiphiles monocaténares dérivées de saccharides, leurs voies de synthèse, leur capacité d'auto-association en systèmes moléculaires organisés et les applications associées à leurs propriétés bioactives.

- Le deuxième chapitre traite de la synthèse et la caractérisation des molécules amphiphiles dérivées de *D*-glucose et de *N*-acétyl-*D*-glucosamine, deux saccharides modèles choisis pour ce travail.

- Le troisième chapitre est dédié à l'étude des systèmes moléculaires organisés, à partir des molécules amphiphiles synthétisées dérivées de *D*-glucose, seules, et en mélange avec un phospholipide modèle.

CHAPITRE I

CHAPITRE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

LES MOLECULES AMPHIPHILES MONOCATENAIRE

SOMMAIRE

Introduction	- 7 -
I. Voies de synthèse des molécules amphiphiles monocaténares	- 9 -
I.1. Introduction.....	- 9 -
I.2. Synthèse par O-glycosylation	- 10 -
I.3. Synthèse par estérification.....	- 14 -
I.4. Synthèse par acétalisation.....	- 17 -
I.5. Synthèse par étherification	- 20 -
I.6. Synthèse par <i>N</i> -acylation.....	- 24 -
I.7. Synthèse par amination réductrice	- 26 -
I.8. Conclusion	- 36 -
II. Propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles monocaténares en solution	- 37 -
II.1. Généralités sur les phénomènes d'auto-association moléculaire	- 37 -
II.2. Propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles monocaténares.....	- 42 -
II.3. Propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles en mélange avec des phospholipides	- 44 -
II.4. Conclusion	- 46 -
III. Applications associées à la bioactivité des molécules amphiphiles monocaténares	- 47 -
III.1. Dans le domaine végétal	- 47 -
III.2. Dans le domaine animal	- 51 -
III.3. Conclusion	- 62 -
Conclusion	- 63 -
Références bibliographiques	- 64 -

Introduction

Les molécules amphiphiles (Figure 1) peuvent être répertoriées en plusieurs catégories en fonction du nombre, de la nature et de la disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes au sein de la molécule. La structure la plus simple, que l'on nommera molécule amphiphile monocaténaire, est celle comportant une tête hydrophile et une chaîne hydrophobe. Des molécules amphiphiles possédant plusieurs chaînes hydrophobes greffées sur la même tête hydrophile (molécules amphiphiles bicaténares et tricaténares) peuvent être rencontrés, mais également des molécules amphiphiles avec plusieurs têtes hydrophiles reliées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes (molécules amphiphiles bolaformes ou géminés).

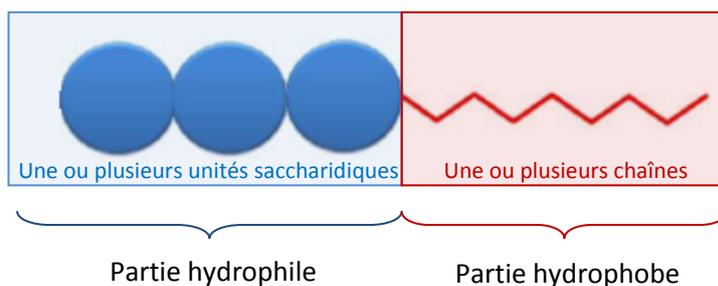


Figure 1: Représentation schématique d'une molécule amphiphile

La littérature est riche de travaux de recherche concernant les molécules amphiphiles. Une partie de ces travaux concerne l'étude des molécules amphiphiles naturelles, déjà présentes au sein des organismes vivants, et une autre s'intéresse aux molécules amphiphiles synthétisées chimiquement ou bien produites grâce aux biotechnologies. Dans cette étude bibliographique, nous avons choisi de nous focaliser sur les recherches menées sur les molécules amphiphiles de synthèse de type monocaténaire.

Cette étude bibliographique est divisée en trois parties. La première décrit les différentes voies de synthèses qui permettent d'obtenir des molécules amphiphiles monocaténares, en mettant en évidence leurs intérêts et limites. La deuxième partie est orientée sur les propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles monocaténares. Enfin, la troisième partie est dédiée aux applications associées aux propriétés bioactives des molécules amphiphiles monocaténares.

I. Voies de synthèse des molécules amphiphiles monocaténares

I.1. Introduction

De nos jours, une tendance générale pour les industriels est d'utiliser des matières premières renouvelables, facilement mises en œuvre à moindre coût. Dans ce contexte exigeant, les molécules amphiphiles dérivées de saccharide sont des candidates intéressantes. En effet, il existe une large gamme de saccharides présentant de nombreux sites d'ancrage grâce à leur poly-hydroxylation, à la présence éventuelle de groupements spécifiques (amine, acide carboxylique) et à l'existence de la fonction aldéhyde au niveau de la position anomère pour les sucres dits réducteurs. Qui plus est, ces molécules amphiphiles présentent des propriétés physico-chimiques intéressantes permettant d'atteindre des applications variées (par exemple dans le domaine du biomédical, de l'agroalimentaire, de la cosmétique).

La partie hydrophobe peut être attachée au saccharide par voie enzymatique ou chimique. La voie enzymatique est une méthode efficace pour la synthèse de molécules amphiphiles¹. Cependant, une enzyme est spécifique vis-à-vis de l'espèce amphiphile synthétisée et cette voie de synthèse conviendra rarement pour l'utilisation à l'échelle industrielle. Ainsi, la synthèse enzymatique est souvent délaissée au profit de la synthèse chimique.

Plusieurs voies peuvent être utilisées pour synthétiser chimiquement des molécules amphiphiles, elles sont décrites et discutées ci-après: l'O-glycosylation, l'estérification, l'acétalisation, l'éthérification, la *N*-acylation, et l'amination réductrice. Les défis majeurs à relever sont de réduire le nombre d'étapes de synthèse, d'obtenir un rendement élevé, de minimiser les étapes de purification, et surtout d'obtenir des produits finaux purs, non toxiques, et biorésorbables voire biodégradables.

1.2. Synthèse par O-glycosylation

Les alkylglucosides sont obtenus par la réaction de O-glycosylation qui permet de coupler de façon sélective un glucose polyfonctionnel avec un composé nucléophile de type alcool. Cette réaction est largement publiée dans la littérature²⁻⁵. A l'échelle industrielle, les alkylglucosides sont synthétisés par la réaction de Fischer^{6,7} (Figure 2) par laquelle un mélange d'alkylglucosides est obtenu⁸.

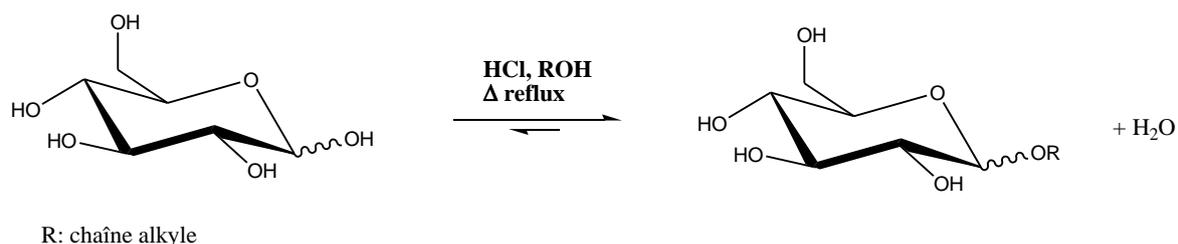


Figure 2: Synthèse d'un alkylglucoside par la réaction de Fischer⁹

La configuration au niveau de la position anomère peut être α ou β ¹⁰ (Figure 3). Les propriétés physico-chimiques de ces deux composés diffèrent. Par exemple, Savelli et coll.¹¹ a montré que l'octyl- β -D-glucoside est soluble dans l'eau alors que son homologue l'octyl- α -D-glucoside est peu soluble.

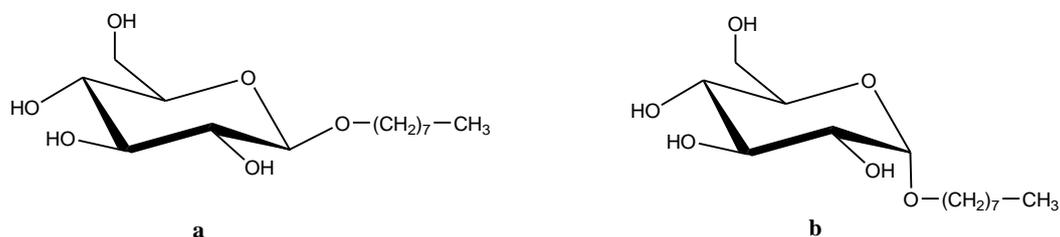


Figure 3: (a) octyl- β -D-glucoside et (b) octyl- α -D-glucoside

En s'inspirant de la réaction de Fischer, Castro et coll.¹² ont synthétisé des alkylglucosides en faisant varier la longueur de la chaîne hydrophobe (Figure 4). L'ajout d'une étape de purification par chromatographie (sur les composés peracétylés) a été nécessaire afin d'obtenir des produits sous forme d'anomère α uniquement.

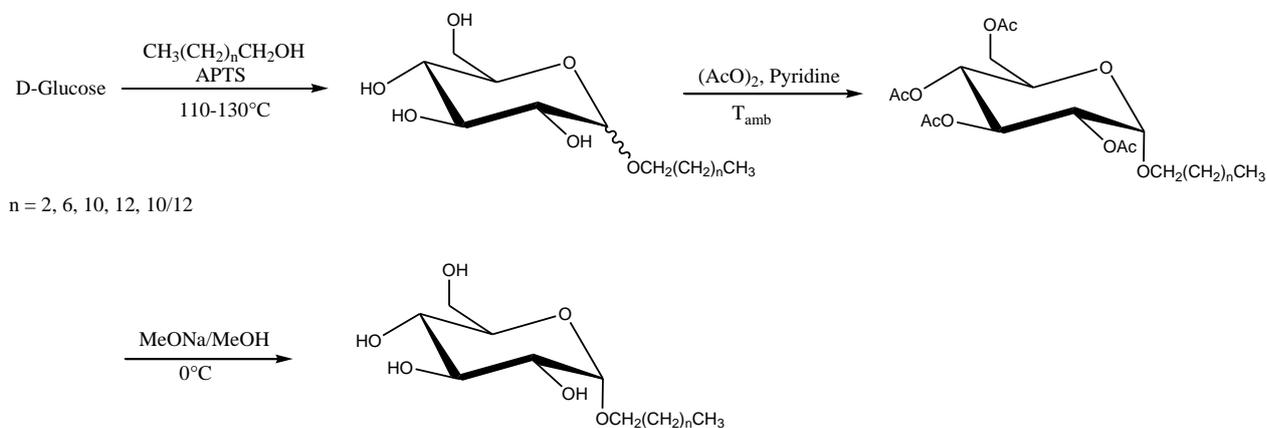


Figure 4: Schéma de synthèse d'alkylglucosides par Castro et coll.¹²

En outre, Hill et coll.¹³ ont montré que l'utilisation d'un catalyseur acide, le plus souvent l'acide paratoluènesulfonique (APTS), favorise la formation de polymères de glucose. Les alkylglucosides synthétisés se retrouvent alors en mélange d'alkyl mono, oligo et polyglucosides, mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse à haute température (Figure 5).

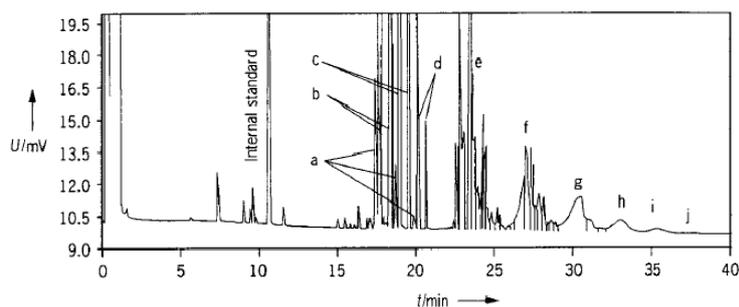


Figure 5: Chromatogramme d'une analyse CPG à haute température d'un mélange de polyglucosides¹³ (a) C12/14/16 furanosides, (b) C12 monoglucosides, (c) C14 monoglucosides, (d) C16 monoglucosides, (e) diglucosides, (f) triglucosides, (g) tetraglucosides, (h) pentaglucosides, (i) hexaglucosides, (j) heptaglucosides (Détection: FID, 420°C).

Le degré de polymérisation (DP) moyen peut ensuite être calculé grâce au pourcentage molaire p de chaque oligomère de DP n présent dans le mélange (Figure 6).

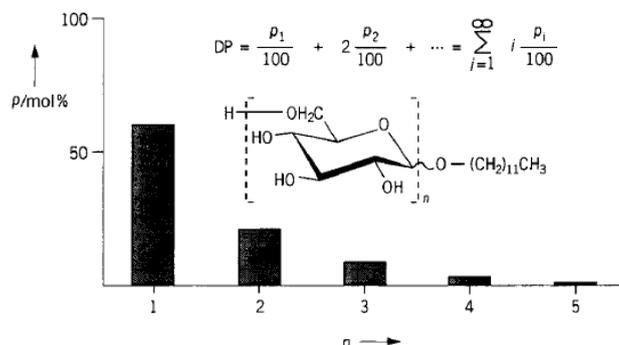


Figure 6: Distribution typique d'oligomères de dodécyl mono et polyglucosides ($DP_{\text{moy}} = 1.3$)¹³

Afin de contourner l'utilisation de catalyseur acide, Gervay-Hague et coll.^{14,15} ont réalisé la synthèse « one-pot » de molécules amphiphiles sous forme α ou β , dépendamment des conditions de réaction. Par exemple, la synthèse de l'octyl- α -D-glucopyranoside et de l'octyl- β -D-glucopyranoside (Figure 7) commence par la mise en solution du 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-triméthylsilyl-D-glucopyranose et de l'iodure de triméthylsilyle (TMSI) dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) à 0°C.

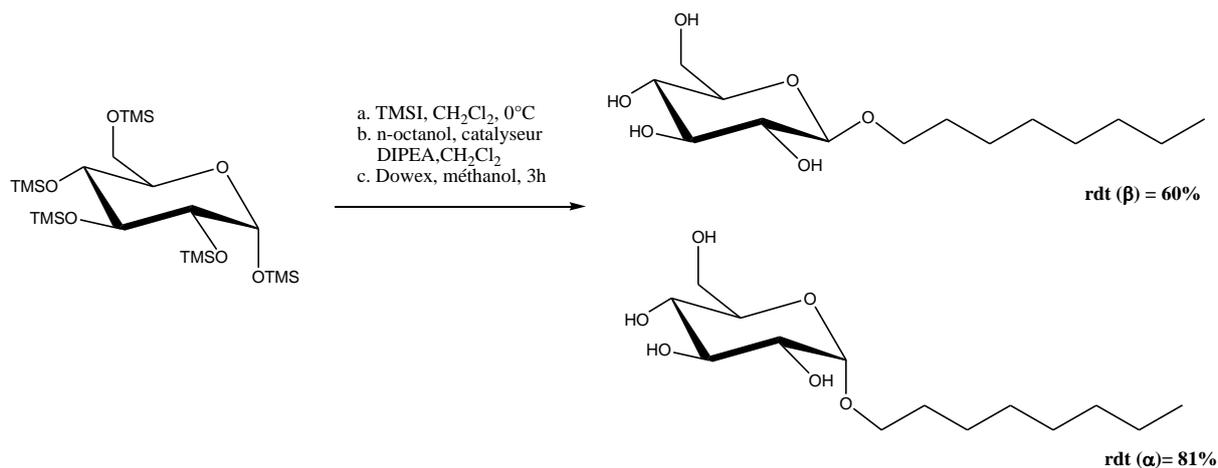


Figure 7: Synthèse de l'octyl- α -D-glucopyranoside et de l'octyl- β -D-glucopyranoside

Après agitation sous flux d'argon, l'iodo-sucre est ajouté à une solution contenant le catalyseur (l'iodure de tétrabutylammonium : TBAI ou le carbonate d'argent : Ag_2CO_3), l'alcool, la diisopropyléthylamine (DIPEA), puis ce mélange est agité à température ambiante. Ensuite, l'espèce amphiphile est déprotégée par ajout d'une résine échangeuse d'ions Dowex® et de méthanol. Après purification sur une colonne de gel de silice, le produit visé est obtenu. La variation de la quantité des réactifs ainsi que des conditions réactionnelles permettent d'obtenir la molécule amphiphile α ou β à façon (Tableau 1).

Tableau 1: Obtention des molécules amphiphiles α ou β en fonction des conditions réactionnelles

	octyl-α-D-glucopyranoside	octyl-β-D-glucopyranoside
Ratio molaire TMSI/ sucre	0.7/1	1/1
Conditions	45 min à 0°C	30 min à 0°C
Ratio molaire catalyseur/ sucre	TBAI : 2/1	Ag_2CO_3 : 1.4/1
Ratio molaire n-octanol /sucre	0.7/1	0.3/1
Ratio molaire DIPEA/ sucre	2/1	3/1
Conditions	48 h à température ambiante	24 h à température ambiante
Rendement	81%	60%

Cette synthèse « one-pot » à l'échelle du laboratoire est efficace et permet de réaliser le couplage ainsi que les étapes de protection et déprotection dans un seul mélange réactionnel.

Depuis la première commercialisation d'octyl et décylpolyglucosides par la société Rohm & Hass à la fin des années 70, les alkylpolyglucosides se retrouvent dans la formulation de nombreux produits cosmétiques, détergents, ou encore d'additifs agricoles. Les tests de biodégradabilité (réalisés par l'organisation de développement et de

coopération économique, nommés « tests OECD ») ont montré sans équivoque qu'ils subissent une rapide et complète biodégradation dans l'environnement¹⁶. Leur absence de toxicité a également été prouvée. En regard de la consommation importante en alkylpolyglycosides à travers le monde (100 000 T en 2008)¹⁷, ces molécules amphiphiles sont considérées comme étant les tensioactifs à base de saccharide les plus importants. La réaction d'O-glycosylation permet donc de synthétiser à l'échelle industrielle des molécules amphiphiles sous forme de mélange, présentes dans de nombreuses applications.

1.3. Synthèse par estérification

Les esters de sucre peuvent être obtenus par une réaction d'estérification au cours de laquelle les alcools réagissent avec les acides carboxyliques (ou encore avec les chlorure d'acyle ou anhydrides d'acides par exemple) en milieu acide pour donner un ester (Figure 8a) ; ou bien par réaction d'un ester et d'un alcool par une réaction de transestérification en milieu alcalin (Figure 8b).

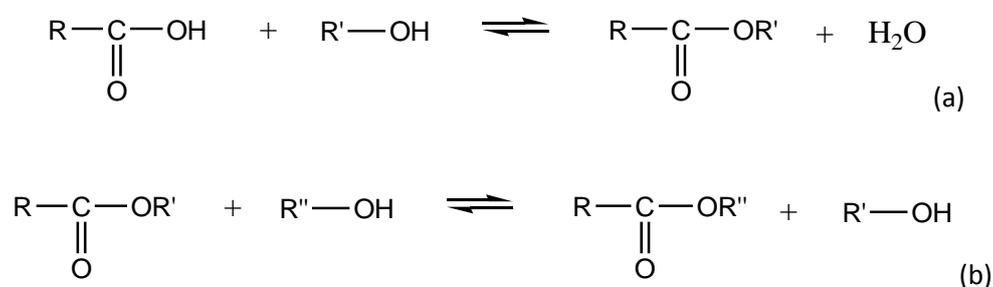


Figure 8: Equation générale de la réaction d'estérification (a) et de transestérification (b)

L'utilisation de ce type de synthèse ne permet pas de contrôler le nombre de groupements hydroxyle estérifiés ni le site d'ancrage¹⁸⁻²⁰. Cependant, la réaction de transestérification peut être orientée en fonction du catalyseur alcalin utilisé et des conditions opératoires. Par exemple, Liu et coll.²¹ ont réalisé la synthèse d'un sucroester à base de saccharose et de l'ester palmitate de méthyle (rapport molaire 2 :1) en faisant varier

la nature du catalyseur alcalin. Les trois réactifs sont chauffés à 185°C sous agitation pendant 14 minutes, puis à 170°C pendant 10 minutes sous une pression allant de 133 Pa à 400 Pa. Ensuite, 1.1 mol d'acide citrique sont ajoutés par mole de catalyseur afin de neutraliser le mélange. Le mélange réactionnel est mis en solution dans du butanol et 5% (v/v) de NaOH. Le butanol est évaporé par chauffage sous vide. Le produit est analysé sur une colonne de gel de silice avec le chloroforme comme solvant. Le produit est ainsi séparé en monoester, diester, triester et polyester. Le rendement et la composition des sucroesters en fonction des cinq catalyseurs utilisés et des trois mélanges de catalyseurs sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2: Efficacité des catalyseurs alcalins lors de la synthèse d'un sucroester²¹

Catalyseur		Rendement en sucroester (% masse)	Composition du sucroester (% en masse)		
Type	Masse (par rapport à 100 g de sucre)		Monoester	Diester	Triester et Polyester
Oléate de lithium	25.50	37.92	1.45	3.80	94.50
Palmitate de lithium	25.50	0	0	0	0
Oléate de sodium	25.50	21.17	39.43	46.65	9.38
Palmitate de sodium	25.50	9.78	49.02	32.11	18.25
Palmitate de potassium	25.50	10.03	29.07	34.30	34.97
Oléate de sodium + Oléate de lithium	25.50 + 5	41.40	33.25	35.91	28.56
Palmitate de potassium + Oléate de lithium	25.50 + 2	14.45	34.96	29.55	27.93
Palmitate de potassium + Oléate de lithium	25.50 + 5	16.15	34.39	26.79	29.40

Parmi les cinq catalyseurs, l'oléate de lithium est celui qui permet d'obtenir le rendement (37.92 %) en sucroester le plus élevé. Ce rendement a encore été amélioré (41.40 %) lorsque l'oléate de sodium est utilisé en mélange avec l'oléate de lithium. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'adapter le choix du catalyseur au produit souhaité. En effet, le catalyseur palmitate de sodium a permis d'obtenir la proportion en monoester la plus

importante (49.02 %) mais le rendement en sucroester est faible (9.78 %). Ainsi, en fonction du sucre et de l'ester utilisés comme produits de départ, les conditions réactionnelles sont à optimiser afin d'obtenir la molécule amphiphile avec un rendement optimal²² (Tableau 3).

Tableau 3: Exemples d'esters de sucres produits par estérification ou transestérification²²

Sucre	Ester réactif	Solvant	Catalyseur	Référence
Saccharose	Stéarate d'éthyle	DMSO	Carbonate de potassium	Farone, Serfass, 1998 ²³
	Stéarate de méthyle	DMSO	Lactate de potassium	Matsumoto <i>et al.</i> , 1992 ²⁴
	Chlorure de palmitoyle	DMF	Carbonate de potassium	Kea, Charles, 1986 ²⁵
	Palmitate de méthyle	NC	Oléate de lithium et de sodium	Liu <i>et al.</i> , 1999 ²¹
Maltose	Octanoate de méthyle	Pyridine	NC	Philippe, 1996 ²⁶
	Oléate de méthyle	Pyridine	NC	Philippe, 1996 ²⁶
Fructose	Octanoate de méthyle	Pyridine	Triméthylamine	Philippe, 1994 ²⁷
	Oléate de méthyle	Pyridine	Triméthylamine	Philippe, 1994 ²⁷
Glucose	Oléate de méthyle	NC	Sodium métallique	Kuang <i>et al.</i> , 2000 ²⁸
	Stéarate de méthyle	NC	Sodium métallique	Kuang <i>et al.</i> , 2000 ²⁸

DMSO: diméthylsulfoxyde; DMF: diméthylformamide; NC: non communiqué

Ce tableau met en évidence un inconvénient rencontré lors de la synthèse d'esters de sucres qui est l'utilisation de solvants et de catalyseurs toxiques. Afin de s'affranchir d'étapes supplémentaires d'élimination de ces produits, plusieurs équipes ont mis au point une synthèse en milieu aqueux. Par exemple, Queneau et coll.²⁹ ont réalisé la synthèse d'une molécule amphiphile à base de saccharose et d'un chlorure d'acyle à longue chaîne hydrocarbonée (Figure 9).

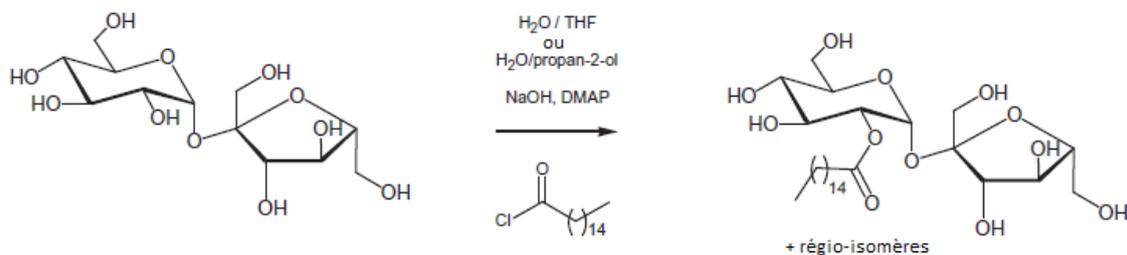


Figure 9: Synthèse d'un sucroester en milieu aqueux²⁹

Du tétrahydrofurane (THF) ou de l'isopropanol ont été ajoutés dans le milieu aqueux afin de diminuer la force cohésive de l'eau, ainsi que du 4-diméthylaminopyridine (DMAP) pour permettre au chlorure d'acyle à longue chaîne carbonée de s'introduire dans le milieu aqueux plus facilement. L'ajout de ces produits a d'ailleurs permis de limiter la polysubstitution. Dans ces conditions, des sucroesters monosubstitués ont été obtenus avec des rendements satisfaisants²⁹.

De nombreux groupes de recherche se sont intéressés à la synthèse d'ester de sucres par voie enzymatique comme alternative à la voie chimique²⁹⁻³². Ils ont montré que l'on pouvait obtenir un produit défini grâce à la capacité sélective des enzymes, dans des conditions douces. Cependant, la synthèse enzymatique est coûteuse, les rendements sont variables et elle nécessite des temps de réaction longs. Ainsi, la voie de synthèse chimique reste actuellement la seule envisagée industriellement.

De nos jours, il existe deux grandes classes de sucroesters disponibles sur le marché : les esters de saccharose et les esters de sorbitan (mieux connus sous les appellations commerciales Tween® et Span®). La littérature fait pourtant état de la production de sucroesters à base d'autres sucres tels le glucose²⁸ ou le fructose²⁷. Les esters de saccharose sont particulièrement intéressants car très bien tolérés par la peau, et ils présentent de bonnes propriétés toxicologiques et environnementales¹⁷. Les esters de sucres ont de nombreuses applications dans le domaine de l'agroalimentaire³³, de la biochimie³⁴, des applications pharmaceutiques³⁵ ou encore en tant qu'agents bactéricides et insecticides³⁶. Toutefois, la production annuelle des esters de sucres est beaucoup moins importante que celle des alkylpolyglucosides (environ 6000 T par an)^{37,38}.

I.4. Synthèse par acétalisation

En milieu acide, un aldéhyde va réagir avec deux molécules d'alcool pour former un hémiacétal puis un acétal (Figure 10).

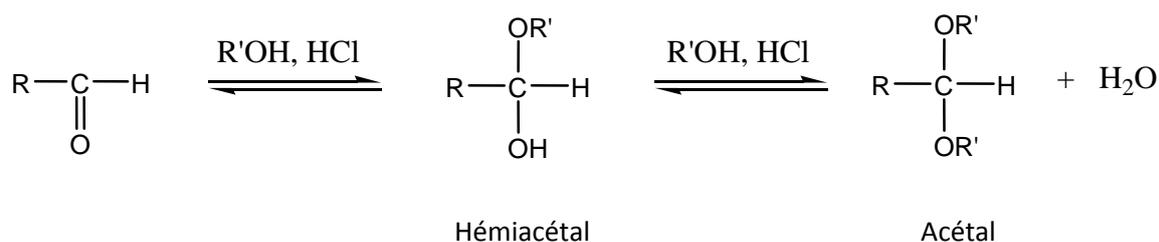


Figure 10: Réaction générale d'une acétalisation

En général, la formation d'un acétal est utilisée au cours d'une réaction pour protéger une fonction aldéhyde. Cependant, Su et coll.³⁹ ont introduit une longue chaîne carbonée sur un glycérol par la formation d'acétals de glycérol en une étape. L'hexadécane possédant une longue chaîne carbonée a été mis en solution dans du benzène avec le glycérol et la réaction est catalysée par l'acide paratoluènesulfonique. Un mélange de quatre isomères a été obtenu (Figure 11).

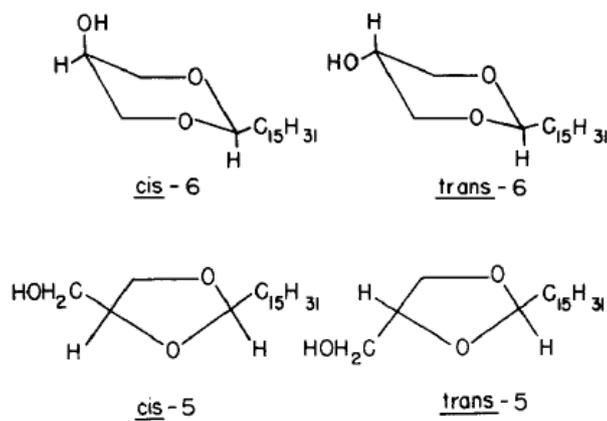


Figure 11: Mélange des quatre isomères d'acétals de glycérol³⁹

Afin de séparer les composés obtenus, une étape de purification a été nécessaire. Elle a consisté à peracétyler les molécules amphiphiles puis à utiliser la chromatographie sur couche mince avec un mélange d'hexane et de diéthyléther (v/v : 70/30). Les fractions ont

été désacétylés par réduction avec LiAlH_4 , puis de nouveau purifiées par chromatographie sur couche mince (v/v : 60/40) permettant d'obtenir une pureté supérieure à 99%. Cette méthode présente l'avantage d'obtenir des composés purs, mais l'inconvénient d'effectuer plusieurs étapes de purification.

En outre, Fanton et coll.⁴⁰ ont utilisé l'acétalisation pour introduire une longue chaîne carbonée sur un dérivé glucidique (Figure 12).

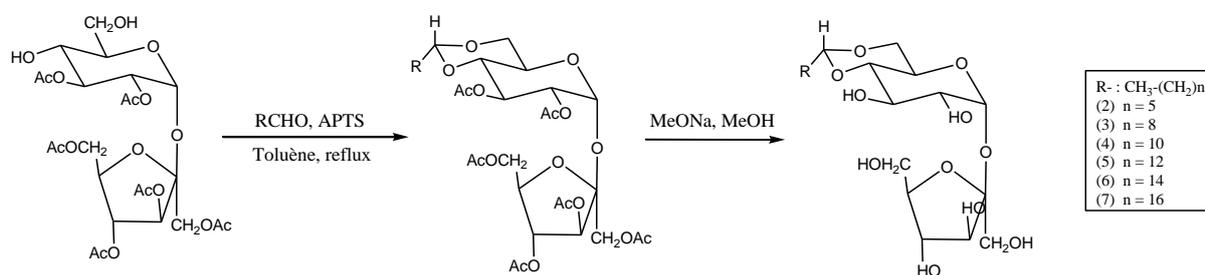


Figure 12: Synthèse par acétalisation de molécules amphiphiles à base de saccharose⁴⁰

Tout d'abord, la chaîne carbonée aldéhydique (équivalent molaire 3/1 par rapport au sucre) et l'acide paratoluènesulfonique (APTS) ont été ajoutés à une solution contenant le sucre de départ peracétylé (sauf en position 4 et 6 sur le sucre glucose) dans du toluène, et la solution a été portée à reflux pendant 3-4 heures dans un montage Dean-Stark®. Ensuite, la solution a été neutralisée avec du Na_2CO_3 , filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le produit brut a été purifié sur colonne à gel de silice. Les molécules amphiphiles ont ainsi été obtenues avec des rendements allant de 60 à 80 %. Les composés ont ensuite été désacétylés par ajout de méthanolate de sodium à température ambiante dans le méthanol (méthode dite « de Zemplén »). Cette voie de synthèse présente l'avantage d'être régiosélective et permet le contrôle stœchiométrique de l'introduction d'une longue chaîne. Toutefois, le sucre de départ nécessite d'être protégé puis déprotégé, ce qui engendre des étapes supplémentaires pouvant être un frein à l'échelle industrielle.

Contrairement aux dérivés esters, les molécules amphiphiles synthétisées par acétalisation présentent l'avantage d'être stables en milieu basique⁴⁰. La principale application visée de ces dérivés lipidiques du saccharose est dans le domaine de la détergence, leurs tensions de surface ayant été mesurées similaires à celle des alkylpolyglucosides commerciaux^{13,40,41}.

I.5. Synthèse par étherification

Il existe plusieurs voies de synthèse permettant d'accéder à des mono ou polyéthers parmi lesquelles la synthèse de Williamson⁴² (obtention d'éther-oxydes par substitution nucléophile d'un dérivé halogéné par un ion alcoolate) est l'une des plus utilisées (Figure 13).



Figure 13: Principe général de la synthèse de Williamson avec X = halogène⁴²

Cependant, celle-ci conduit à la formation de sels indésirables en quantités stœchiométriques. Une voie alternative pour la préparation d'éthers substitués à longue chaîne est basée sur la télomérisation du butadiène avec les alcools, sous catalyse palladium^{42,43}. Cette réaction a beaucoup été étudiée avec différents nucléophiles⁴⁴ de type alcool, phénol, acide carboxylique, amine et plus récemment avec des sucres.

En 1988, Zakharkin et coll.⁴⁵ ont réalisé la synthèse d'un éther d'octadiényle de galactose (Figure 14) en trois étapes. La première étape consiste à protéger quatre des cinq fonctions alcool du sucre par des groupements isopropylidéniques afin de pouvoir greffer sélectivement la chaîne hydrophobe sur la position 6, dont l'hydroxyle primaire est le plus réactif pour la réaction de télomérisation. Puis, la réaction de télomérisation a été effectuée dans le toluène à 80°C, catalysée par l'acétylacétonate de palladium (II) (Pd(acac)₂), la triphénylphosphine (PPh₃), et le triéthylaluminium (AlEt₃). Le rapport molaire entre le galactose et le palladium est de 250.

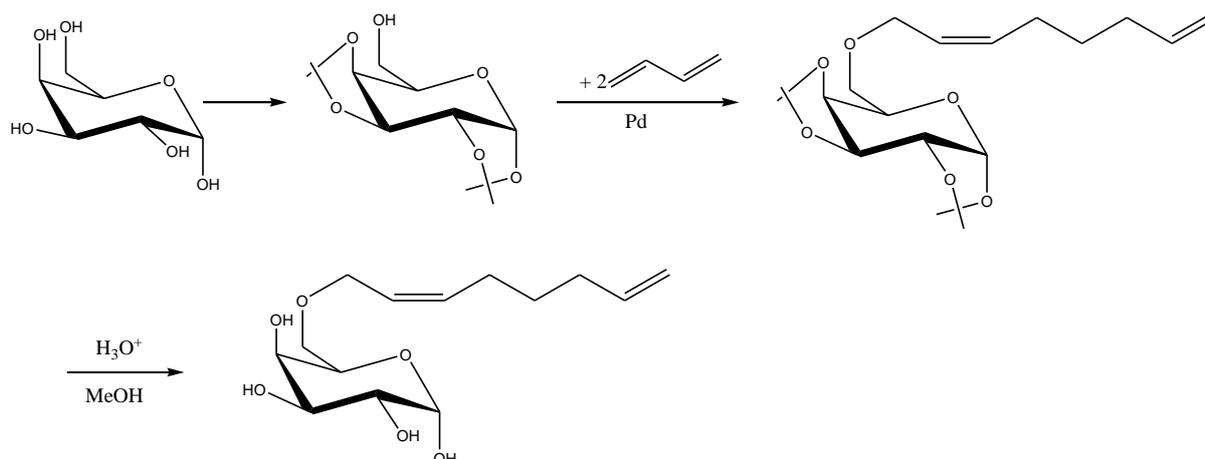


Figure 14: Synthèse d'éther de galactose en trois étapes selon Zakharkin et Coll.⁴⁵

Le produit final a été obtenu au bout de 10 heures, avec un rendement de 74 % par rapport au galactose protégé. Les analyses RMN ont montré que seul l'isomère *cis* a été formé alors que l'isomère *trans* est prépondérant dans la littérature. Selon les auteurs, cela est probablement dû à l'encombrement stérique du diisopropylidène de galactose. Cependant, la nécessité des étapes de protection et de déprotection limite le développement de cette voie de synthèse au niveau industriel.

C'est pourquoi, afin de s'affranchir d'étapes de protection et de déprotection, la société Henkel a déposé deux brevets^{46,47} qui avaient pour objectif la synthèse en une étape (sans protection du sucre de départ) de diènes avec des sucres : glucose, méthylglucoside, butylglucoside. La réaction de télomérisation a lieu dans un mélange de solvants isopropanol/eau, en présence d'un catalyseur Pd(acac)₂ activé par la PPh₃, pendant 10 heures à 70°C. Des rendements de 95 % ont été trouvés pour les trois sucres. La formation de monoéthers est minoritaire par rapport aux di-éthers et aux tri-éthers. La monoéthérisation des saccharides non protégés est donc délicate en regard de la faible différence au niveau des énergies d'activation des différents groupements –OH.

Dans la littérature, plusieurs publications font état de la télomérisation du butadiène par le saccharose⁴⁸⁻⁵⁰. En effet, même si d'autres sucres ont été utilisés : L-arabinose et D-xylose par Estrine et coll.⁵¹, ou encore l'amidon par Mesnager et coll.⁵², la littérature présente plus d'exemples de télomérisation à partir de saccharose. Par exemple, Hill et coll.⁴⁸ ont décrit une voie de synthèse pour la télomérisation du butadiène avec le saccharose en présence d'un catalyseur Pd(II)/PPh₃ dans un mélange de solvant isopropanol/eau. Les octadiényléthers (Figure 15) ont été obtenus avec des rendements élevés (63%) et avec un degré de substitution moyen de 5, déterminé par RMN ¹H.

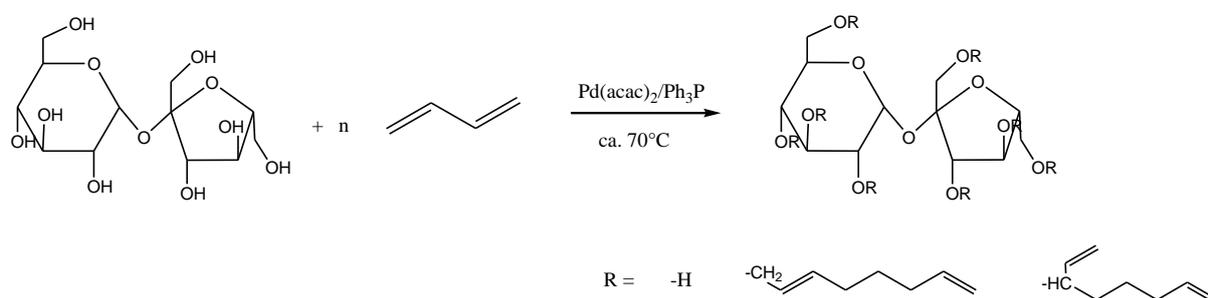


Figure 15: Télomérisation du butadiène avec du saccharose selon Hill et coll.⁴⁸

Pennequin et coll.⁴⁹ ont effectué la télomérisation du butadiène avec du saccharose catalysée par le palladium (II) et complexé par la TPPTS (triphénylphosphine trisulfonate) qui solubilise le catalyseur en milieu aqueux ou en milieu hydroalcoolique (Figure 16).

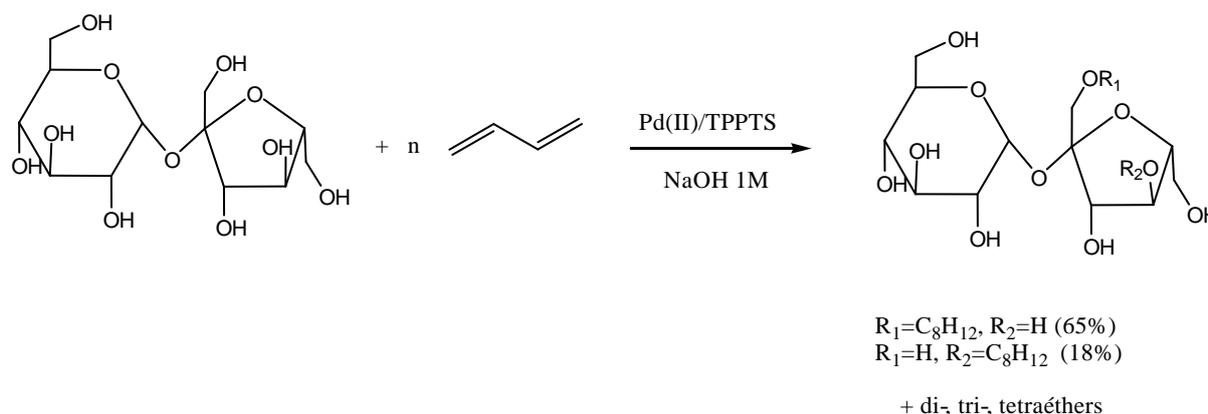


Figure 16: Télomérisation du butadiène avec le saccharose selon Pennequin et coll.⁴⁹

La nécessité de trouver un compromis entre le taux de conversion du saccharose et la sélectivité en mono-télomère obtenu a été mise en évidence. Par exemple, le taux de conversion du saccharose est de 65% en 5 heures en milieu aqueux, et 36% de mono-télomère est obtenu (Tableau 4).

Tableau 4: Télomérisation du butadiène avec le saccharose selon Pennequin et coll.⁴⁹

Solvant	Temps (min)	Taux de conversion du saccharose (%)	Sélectivité en mono-télomère	Degré de substitution moyen par unité de sucre
H ₂ O	300	65	36	1.8
NaOH 1M	150	100	1	3.2
NaOH 1M	23	85	43	1.6
Isopropanol	30	73	66	1.4

Les systèmes de solvant (eau, isopropanol/eau, ajout de soude) ont été comparés, et les conditions optimales pour obtenir le mono-télomère ont été obtenues pour une durée de réaction de 30 minutes dans l'isopropanol. Le choix minutieux des conditions opératoires démontre ici toute son importance. Pennequin et coll. peuvent ainsi obtenir des molécules amphiphiles ayant un degré de substitution choisi.

Pour conclure sur ce type de réaction, les molécules amphiphiles synthétisées par télomérisation ont leur place dans des applications de détergence étant donné leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, ainsi que dans les cosmétiques car ils possèdent de bonnes propriétés de compatibilité avec la peau⁴⁹. Cependant, comme dans le cas de l'estérification, des mélanges d'espèces amphiphiles sont obtenus et même si les industriels peuvent les utiliser ainsi, les groupes de recherche tendent aujourd'hui vers le développement d'une synthèse plus sélective. De plus, à notre connaissance, les exemples décrits dans la littérature conduisent uniquement à des molécules amphiphiles avec une chaîne à huit carbones. Il semblerait que ce composé soit le plus étudié, à la fois pour ses propriétés tensioactives et pour son habilité à extraire les protéines membranaires⁵³.

1.6. Synthèse par N-acylation

La réaction de N-acylation consiste à faire réagir une amine primaire ou secondaire avec un chlorure d'acyle (R-COCl) pour donner des amides substitués (Figure 17). Cette réaction peut aussi se réaliser avec un anhydride d'acide ou avec un acide carboxylique.



Figure 17: Réaction générale de la réaction de N-acylation via un chlorure d'acyle

Gorbach et coll.⁵⁴ ont synthétisé par N-acylation de nouveaux composés amphiphiles ayant pour têtes polaires des chitooligosaccharides. Ils ont étudié l'influence du nombre de motifs répétitifs de la tête polaire ainsi que de la longueur de la chaîne hydrophobe sur la conservation des propriétés bioactives des chitooligosaccharides. La réaction a été effectuée dans des conditions équimolaires entre l'oligosaccharide et l'agent acylant dans un mélange d'eau et de solvant organique (pyridine, DMF ou éthanol). L'isolation des produits a été réalisée par extraction dans le 1-butanol, puis ils ont été purifiés par précipitation dans du méthanol ou de l'acétone. Trois agents acylants ont été utilisés : (a) l'acide tétradécanoïque en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC), (b) des chlorures d'acyle ; (c) l'ester N-hydroxysuccinimide d'acide tétradécanoïque. Ces différentes méthodes d'acylation conduisent à des rendements variables : (a) jusqu'à 20% pour les composés 5 et 9 ; (b) de 11 à 38% pour les composés 1, 2, 3, 4, 8 et 10 ; (c) de 30 à 50 % pour les composés 2, 3, 5, 6 et 11 (Figure 18).

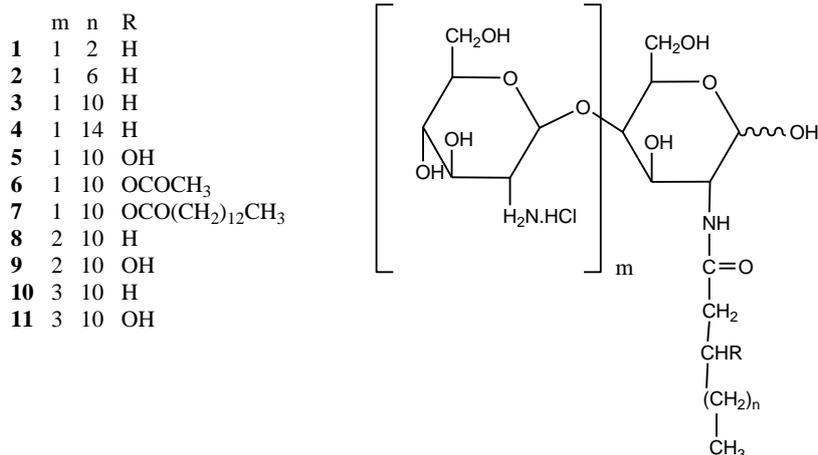


Figure 18 : Molécules amphiphiles synthétisées par *N*-acylation⁵⁴

Ainsi, la méthode utilisant l'ester d'acide gras semble être la plus efficace. La caractérisation des produits par RMN ¹³C suggère la substitution préférentielle du groupement amine de l'extrémité réductrice sous forme d'un seul isomère. Selon les auteurs, cette régiosélectivité serait due à la diminution de l'encombrement stérique à l'extrémité réductrice du chito-oligosaccharide, ou bien à la présence proche d'un groupement hydroxyle libre qui augmenterait alors la réactivité de la fonction amine. Cette voie de synthèse permet donc l'obtention de molécules amphiphiles dérivées de chito-oligosaccharides ayant à la fois des groupements amine libres et d'un dérivé d'acide gras sur l'extrémité réductrice. Ces composés sont solubles dans l'eau, non toxiques et interagissent activement avec les membranes des cellules du système immunitaire. Ils ont des applications prometteuses dans le domaine de la médecine, notamment en tant qu'agents antitumoraux.

Dès le début des années 1980, Hildreth⁵⁵ a synthétisé des *N*-alkyl-*N*-méthylglucamides avec différentes longueurs de chaînes allant de 8 à 10 carbones (Figure 19).

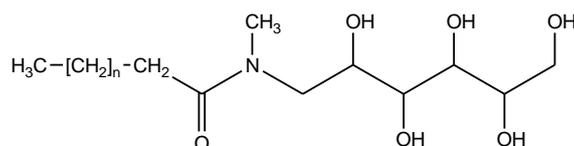


Figure 19: Structure chimique du *N*-alkyl-*N*-méthylglucamide synthétisé par Hildreth⁵⁵ ($n = 5, 6$ ou 7)

La réaction a été effectuée dans des conditions équimolaires entre le *N*-méthyl-D-glucamine et l'acide carboxylique correspondant à la longueur de chaîne souhaitée (acide octanoïque, acide nonanoïque ou acide décanoïque). La *N*-méthyl-D-glucamine a été tout d'abord solubilisée à reflux dans le méthanol, puis elle a été ajoutée à une solution contenant l'acide carboxylique. Après trois filtrations et deux recristallisations dans le méthanol, les composés ont été obtenus avec des rendements élevés (80 à 90%). Ainsi, Hildreth a pu obtenir des molécules amphiphiles avec une longueur de chaîne modulable, qui ont par ailleurs démontré d'excellentes propriétés de solubilisation des membranes biologiques.

Au travers de ces différents exemples, il a été montré que la *N*-acylation présente l'avantage d'être une méthode de synthèse régiosélective sur les amines primaires ou secondaires. De plus, les composés synthétisés sont stables en milieu aqueux grâce à la présence de la fonction amide. Ainsi, l'obtention de composés de structure définie et biocompatibles permet de nombreuses applications dans le domaine biomédical.

1.7. Synthèse par amination réductrice

1.7.1. *Introduction*

D'une manière générale, la réaction d'un sucre réducteur avec une amine aliphatique conduit à la formation de *N*-alkylglycosylamines (Figure 20).

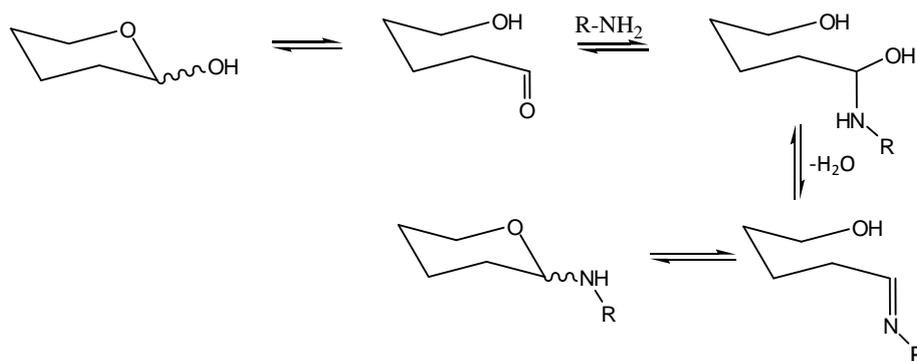


Figure 20: Réaction générale de formation des *N*-alkylglycosylamines (Adaptée⁵⁶)

Dès 1887, Sorokin⁵⁷ a préparé selon cette réaction des *N*-arylglycosylamines en mélangeant des amines et des saccharides dans l'éthanol à reflux. Mitts et Hixon⁵⁸ ont appliqué cette méthode pour préparer de la *N*-hexadécyl-D-glucosylamine et *N*-octadécyl-D-glucosylamine. Les composés ont été obtenus avec des rendements satisfaisants (70% et 83% respectivement).

En 1955, Erickson⁵⁹ essaya d'améliorer le procédé de Sorokin⁵⁷ et décrivit la préparation de molécules amphiphiles dans des conditions plus douces. Dans ce but, la réaction a été réalisée dans un milieu hydroalcoolique à température ambiante avec un long temps de réaction (15 jours). Différents saccharides (D-fructose, D-galactose, L-sorbose, maltose, lactose) et deux longueurs de chaînes alkylamine (12 et 18 carbones) ont été étudiés. Par exemple, la synthèse de la *N*-dodécyl-D-glucosylamine a consisté à faire réagir un mélange de dodécylamine et de D-glucose (rapport molaire 2/1), en solution dans de l'éthanol et de l'eau (10/7), pendant 15 jours à température ambiante. Après filtration, et deux recristallisations dans l'éthanol, un rendement de 93% de poudre blanche a été obtenu. Ce même saccharide (D-glucose) a été mélangé à de l'octadécylamine (rapport molaire 1/1) dans de l'alcool isopropylique et de l'eau (2/1 (v/v)) pendant deux jours à 25°C. Le précipité jaune clair formé par la réaction a été lavé avec le solvant réactionnel et après séchage 100% de produit attendu a été obtenu. Après deux recristallisations dans l'éthanol, l'analyse élémentaire a confirmé la pureté du produit obtenu.

Toujours en se basant sur les travaux de Sorokin⁵⁷, Pigman et coll.⁶⁰ ont quant à eux modifié le solvant de synthèse en utilisant du méthanol à reflux à la place de l'éthanol. Ils ont ainsi obtenu des *N*-alkyl-D-glucosylamines avec des chaînes butyl, hexyl, octyl, décyl, dodécyl et octadécyl. Selon les auteurs, les rendements étaient satisfaisants (seul celui pour le *N*-butyl-D-glucosylamine est donné : 94%) et les composés ont été moins décolorés que par la méthode de Sorokin⁵⁷.

De plus, Lockhoff et coll.⁶¹ ont réalisé la synthèse de *N*-alkyl-D-glycosylamines avec une chaîne hydrophobe linéaire à 12, 14 et 18 carbones greffée sur différents saccharides : D-glucose (Figure 21), D-mannose, D-galactose.

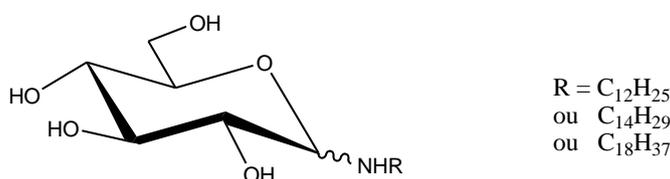


Figure 21: Structure des *N*-alkyl-D-glycosylamines synthétisés par Lockhoff et coll.⁶¹

La réaction a été réalisée dans de l'éthanol à 70°C. Le précipité formé par refroidissement a été lavé par du n-hexane et les rendements obtenus ont été supérieurs à 80%. Dans ces conditions opératoires, les *N*-alkyl-D-glycosylamines ont donc été synthétisées avec des rendements élevés, sans aucune coloration.

Par ailleurs, Pigman et coll.⁶⁰ ont rapporté que la *N*-dodécyl-D-glucosylamine est complètement hydrolysée au bout de 48 heures par de l'acide chlorhydrique 0.5N à 30°C. Erickson⁵⁹ l'a confirmé et a de plus démontré que la réaction pouvait s'inverser au bout de plusieurs jours dans une solution alcoolique d'acide chlorhydrique 0.4N à température ambiante, conduisant de nouveau à la *N*-dodécyl-D-glucosylamine. D'autre part, en s'appuyant sur la coloration et l'aspect des composés, les auteurs ont montré que la stabilité dans le temps des produits formés semblaient être influencée par la longueur de chaîne. En effet, la *N*-dodécyl-D-glucosylamine était d'aspect identique au bout de deux ans à 0°C et

devenait légèrement brune au bout de deux ans à température ambiante ; alors que la *N*-octadécyl-D-glucosylamine ressemblait à un goudron foncé à odeur de caramel après quelques mois à 25°C.

En raison de leur hydrolyse relativement facile en milieu aqueux, les *N*-alkyl-D-glycosylamines sont donc difficilement employées sous cette forme pour des applications de type tensioactives nécessitant une utilisation en milieu aqueux (par exemple pour des applications dans le domaine des cosmétiques). C'est pourquoi, plusieurs équipes de recherches ont mis au point une voie de synthèse impliquant une étape supplémentaire de réduction des *N*-alkyl-D-glycosylamines afin d'obtenir des composés plus stables (Figure 22).

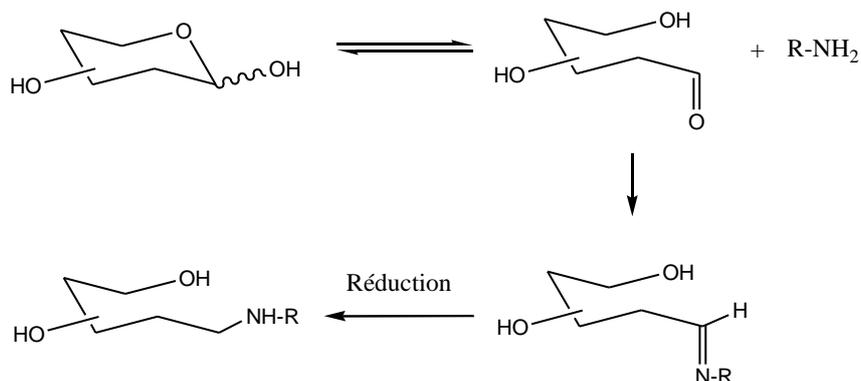


Figure 22: Schéma réactionnel général de l'obtention de *N*-alkylamino-désoxyglycitol par amination réductrice

La réduction peut être réalisée par hydrogénation catalytique à l'aide de catalyseurs métalliques tels que le platine, le nickel, le palladium, ou par l'utilisation de nombreux hydrures mixtes tels LiAlH_4 , NaBH_4 , NaBH_3CN pour réduire les imines.

1.7.2. Réduction par hydrogénation catalytique

En 2004, Liu et coll.⁶² ont synthétisé la *N*-octylamino-désoxyglucitol en utilisant une réduction par hydrogénation catalytique avec un complexe de palladium (Pd)/ oxyde de magnésium (MgO) supporté par une résine mélamine-formaldéhyde (MEF) (Figure 23). L'influence des additifs, solvants, température, pression d'hydrogène, quantité de palladium dans le catalyseur, et quantité de catalyseur par rapport au mélange réactionnel a été étudiée.

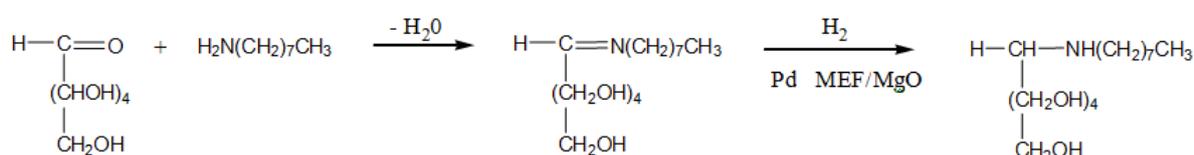


Figure 23: Schéma réactionnel d'obtention de la *N*-octylamino-désoxyglucitol selon Liu et coll.⁶²

Le rendement le plus élevé (58%) fut obtenu grâce au protocole suivant : le D-glucose et la *n*-octylamine (rapport molaire : 0.8/1 par rapport au sucre), la triéthylamine (1mL), l'éthanol (60ml) et le complexe Pd.MEF/MgO (3.55%) ont été introduits dans un réacteur rempli d'hydrogène (P = 1.5 mPa) puis chauffés à 60°C pendant 6 heures. Après refroidissement à température ambiante et dépressurisation, la solution est filtrée. Après 24 heures, la *N*-octylamino-désoxyglucitol a précipité dans le filtrat. Le catalyseur Pd.MEF/MgO est donc un catalyseur qui permet d'obtenir le composé dans des conditions douces.

Afin d'améliorer le rendement, Gallas et coll.⁶³ ont mis au point la synthèse de *N*-alkylpolyhydroxyalkylamines en utilisant une réduction par hydrogénation catalytique avec le Nickel de Raney en tant que catalyseur, à partir de monoalkylamine et de sucres réducteurs variés (par exemple : glucose, galactose, mannose, lactose) avec un rapport molaire alkylamine/sucre allant de 1/1 à 2/1. Selon les auteurs, cette méthode est utilisée

préférentiellement avec des glucoses ou des lactoses. Tout d'abord, l'alkylamine de départ a été mélangée quelques minutes dans l'eau, l'alcool ou dans un mélange hydroalcoolique, avec le nickel de Raney (5 à 15 % en masse par rapport au sucre de départ). Puis, le mélange a été pressurisé à une température de 25°C à 60°C, sous pression d'hydrogène de 50 à 90 bars. Sous agitation, une solution contenant le sucre de départ a été ajoutée au mélange sous pression et après réaction, le composé amphiphile a été obtenu avec un rendement (98%).

La société Stépan Europe⁶⁴ a déposé un brevet concernant la synthèse de *N*-alkylamino-1-désoxylactitol (Figure 24) dans l'éthanol absolu, sous pression d'hydrogène dans un autoclave.

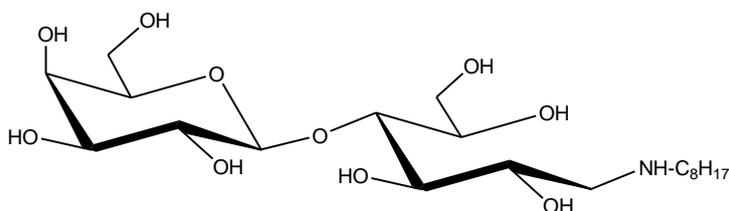


Figure 24: Structure de la *N*-octylamino-1-désoxylactitol ⁶⁴

Par exemple, le *N*-octyl-lactosylamine et le catalyseur palladium sur charbon (rapport massique 10/1) ont été mis en solution dans de l'éthanol absolu. La solution est agitée sous pression d'hydrogène (30 bars), 12 heures à température ambiante et 8 heures à 50°C. Le produit a été filtré sur célite, le solvant résiduel évaporé, et le produit lyophilisé. Un mélange de *N*-octyl-lactosylamine et de *N*-octylamino-1-désoxylactitol a été obtenu (rendement massique : 80%). Ainsi, ils ont montré que la réduction par hydrogénation catalytique conduit à un mélange entre les composés réduits et non réduits. C'est pourquoi, selon leurs résultats, l'utilisation de l'agent réducteur NaBH₄ est à privilégier pour obtenir des composés qui ne sont pas sous forme de mélange.

1.7.3. Réduction par les hydrures mixtes

NaBH₄ est un agent réducteur connu pour réduire les imines et il est largement utilisé lors de la réaction d'amination réductrice. L'efficacité du NaBH₄ est dépendante du solvant réactionnel et de l'acidité du milieu⁶⁵. La réduction se réalise la plupart du temps en milieu alcoolique ou hydroalcoolique. Par exemple, le méthanol favorise la formation de l'imine par rapport au THF ou au 1,2-dichloroéthane. De plus, il a été montré que la réactivité des imines est augmentée avec l'addition d'un acide. Cependant, l'acidité du milieu catalyse la décomposition du NaBH₄ (Figure 25).



Figure 25: Décomposition du NaBH₄ en milieu aqueux

Cette méthode a permis à Garelli-Calvet et coll.⁶⁶, Lattes et coll.⁶⁷ et Blanzat et coll.⁶⁸ de synthétiser une série de structures amphiphiles (*N*-alkylamino-1-désoxylactitol) à partir de lactose non protégé. Pour cela, une solution hydroalcoolique de lactose et d'alkylamine (rapport molaire par rapport au sucre : 1.7/1), a été agitée 24 heures à température ambiante puis 30 minutes à 60°C. Après évaporation du solvant, le résidu a été repris dans l'éthanol puis ré-évaporé en présence de toluène afin d'éliminer les traces d'eau résiduelle. Ensuite, le produit a été purifié par recristallisation dans l'éthanol et lyophilisation. La *N*-alkyl-lactosylamine ainsi obtenue a été réduite par NaBH₄ en milieu aqueux. Plusieurs étapes de purification (traitement par le charbon actif, reprise dans le méthanol, lyophilisation) ont été nécessaires pour obtenir la *N*-alkylamino-1-désoxylactitol. Les molécules amphiphiles ont été synthétisées avec différentes longueurs de chaînes alkylamine et avec des rendements allant de 55 à 80% (Figure 26). Toutefois, selon Rico-Lattes et coll.⁶⁷ l'amine secondaire est susceptible d'évoluer dans le temps vers des produits toxiques comme les *N*-nitrosamines, ce qui limite leur utilisation en tant que détergent ou pour des applications cosmétiques.

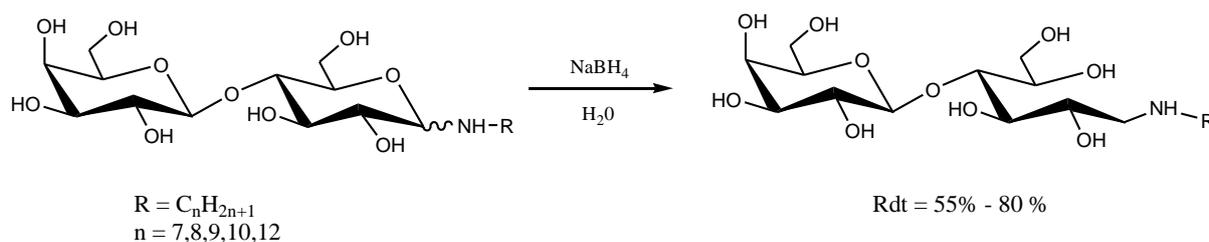


Figure 26: Synthèse de *N*-alkylamino-1-désoxylactitols selon Lattes et coll.⁶⁷

Le cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$) a été largement utilisé pour la réaction d'amination réductrice grâce à sa sélectivité remarquable. Contrairement au $NaBH_4$, cet agent réducteur est stable en milieu acide ($pH = 3$) et est sélectif en fonction du pH du milieu réactionnel⁶⁹. Par exemple, il va pouvoir réduire sélectivement les imines en amines à un $pH = 6-7$, alors qu'à un $pH = 3-4$, il va réduire les aldéhydes et les cétones. De plus, il permet d'effectuer une synthèse « one-pot » au cours de laquelle les réactifs restent dans le même solvant réactionnel. Cependant, le $NaBH_3CN$ ⁷⁰ engendre la formation de sous-produits très toxiques comme le cyanure d'hydrogène (HCN) et le cyanure de sodium (NaCN). A notre connaissance, aucune publication ne fait état de la synthèse par réaction d'amination réductrice avec $NaBH_3CN$ entre une alkylamine et un saccharide pour obtenir une molécule amphiphile monocaténaire. C'est pourquoi, un exemple de synthèse d'un composé amphiphile bicaténaire sera présenté. Yoon et coll.⁷¹ ont réalisé la synthèse en « one-pot » d'une aminocéramide (bicaténaire) en milieu hydroalcoolique sous flux d'argon. La réaction a duré 30 minutes à $100^\circ C$, et après refroidissement une solution aqueuse de $NaBH_3CN$ a été ajoutée. Le mélange est incubé 16 heures à $90^\circ C$, puis le produit obtenu a été séché sous azote et a subi plusieurs étapes de purification (colonne à gel de silice, colonne C18, séché sous azote, centrifugé et analysé par chromatographie sur couche mince haute performance). Malgré l'efficacité de cette synthèse, le nombre d'étapes de purification nécessaire reste un inconvénient majeur.

Plusieurs groupes de recherche plébiscitent l'utilisation du triacétoxyborohydride de sodium $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ en remplacement de l'agent réducteur NaBH_3CN , afin d'éviter le risque de formation de résidu de cyanide dans le produit synthétisé^{72,73}. La réaction peut être réalisée en « one-pot » en introduisant l'agent réducteur dans un mélange contenant l'alkylamine et le sucre. En effet, la réduction des ions iminium est plus rapide que celle des aldéhydes. L'acide acétique peut être utilisé pour catalyser la formation d'imines et ainsi d'ion iminium. Par exemple, Dalpathado et coll.⁷³ ont effectué la modification d'oligosaccharides par la réaction d'amination réductrice et comparé l'utilisation de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ et NaBH_3CN (Figure 27).

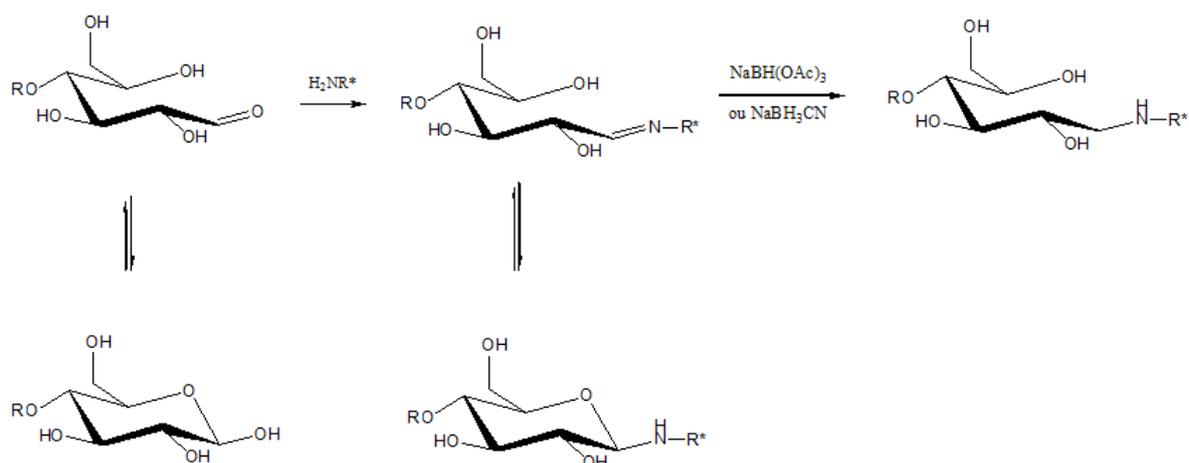


Figure 27: Amination réductrice d'oligosaccharides tirée de Dalpathado et coll.⁷³

La synthèse « one-pot » a été réalisée dans le DMSO et catalysée par l'acide acétique. Après 2.5 heures à 60°C et plusieurs étapes de purification par chromatographie, le rendement a été trouvé équivalent pour les deux agents réducteurs. Les espèces amphiphiles ont été caractérisées par spectrométrie de masse. Quel que soit l'agent réducteur utilisé, la réaction a été montrée complète et aucun réactif n'a été trouvé dans le spectre de masse. Un exemple

de spectre de masse de la molécule amphiphile maltopentaose/DEAEAB (4-amino-N-[2-(diéthylamino)éthyl] benzamide monohydrochloride) est présenté ci-dessous (Figure 28).

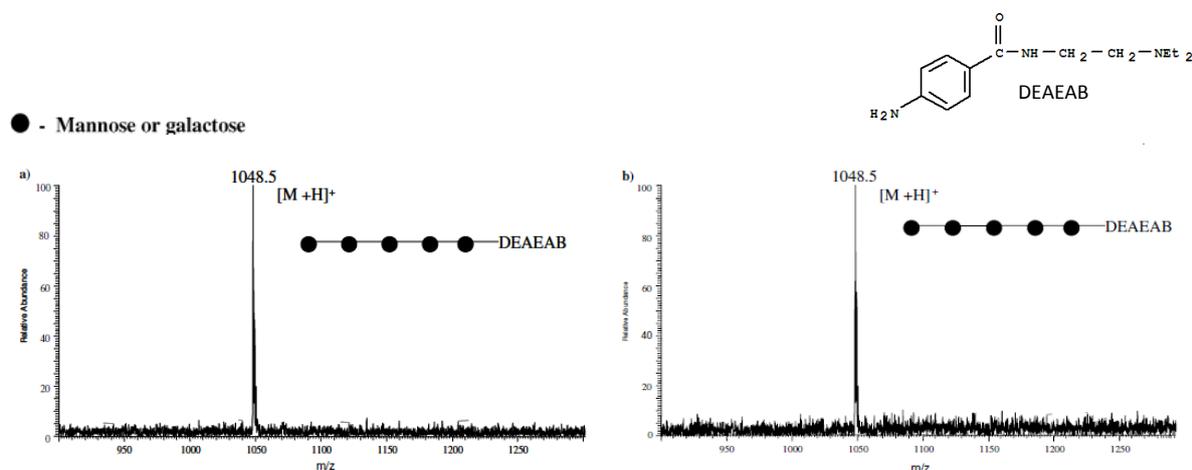


Figure 28: Spectres ESI-MS du DEAEAB/maltopentaose réduits par (a) NaBH_3CN et (b) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ⁷³

Pour conclure, la littérature fait état de nombreuses recherches utilisant la réaction d'amination réductrice comme voie de synthèse permettant l'obtention de molécules amphiphiles. Cette voie de synthèse est efficace et permet de synthétiser l'espèce amphiphile souhaitée sans protection préalable du saccharide. Cependant, dans la plupart des cas, des étapes de purification plus ou moins longues sont à effectuer afin d'éliminer les sous-produits. La réduction par hydrogénation catalytique et la réduction par les hydrures mixtes conduisent à des molécules amphiphiles avec des rendements satisfaisants. Le catalyseur de palladium et le Nickel de Raney sont efficaces pour la réduction par hydrogénation catalytique. Trois réducteurs ont fait leur preuve pour la réduction par voie chimique : NaBH_4 , NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. NaBH_4 est efficace mais il n'est pas sélectif. NaBH_3CN ⁷⁴ présente différentes sélectivités en fonction de la valeur du pH mais son point faible est sa haute toxicité et la production possible de produits secondaires toxiques qu'il est difficile de purifier. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ est un réducteur sélectif et moins toxique que NaBH_3CN . Ces deux derniers ont l'avantage de pouvoir être utilisés en synthèse monotopie. En fonction

du mode opératoire et des réactifs que l'on désire utiliser, il est ainsi possible d'effectuer une réaction d'amination réductrice par différents procédés.

I.8. Conclusion

Cette étude bibliographique nous a permis de nous rendre compte des nombreuses possibilités de voies de synthèses chimiques qui existent pour obtenir des molécules amphiphiles de type monocaténaire : l'O-glycosylation, l'estérification, l'acétalisation, l'éthérification, la N-acylation, et l'amination réductrice. Les protocoles diffèrent notamment par le solvant utilisé, le temps de réaction, le nombre d'équivalent molaire entre les réactifs de départ, et le nombre d'étapes de purification. La modulation de ces conditions opératoires permet d'accéder à des composés amphiphiles ayant une chaîne hydrophobe greffée au saccharide par une ou par plusieurs positions. Il est parfois nécessaire de protéger le sucre de départ pour obtenir le composé amphiphile mono-greffé. La N-acylation et la réaction d'amination réductrice étant régiosélectives, elles permettent de s'affranchir de ces étapes de protection et de déprotection. En outre, on remarque dans la littérature un intérêt prononcé pour les molécules amphiphiles ayant une chaîne hydrophobe liée au saccharide par sa position anomère, mettant à profit la forme aldéhyde du saccharide pour effectuer le greffage régiosélectivement.

Après avoir synthétisé les molécules amphiphiles, l'étape suivante est l'évaluation de leurs propriétés physico-chimiques et notamment l'étude de leur capacité à s'auto-associer en milieu aqueux.

II. Propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles monocaténares en solution

Les nombreuses possibilités de nature des deux parties, polaire et apolaire, constituant les espèces amphiphiles permettent la formulation de produits très diversifiés à haute valeur ajoutée dans des domaines variés (textile, engrais, cosmétiques, agro-alimentaire, galénique...). Le marché des tensioactifs a atteint les 24 milliards de dollars en 2009⁷⁵. Parmi ces tensioactifs, un grand nombre possède une tête saccharidique. De ce fait, il est important de comprendre le mode d'auto-association de ces molécules amphiphiles, en mettant en relation les propriétés des structures à l'échelle macroscopique avec celles à l'échelle nanoscopique.

II.1. Généralités sur les phénomènes d'auto-association moléculaire en solution

En milieu aqueux, les molécules amphiphiles s'organisent grâce au processus d'auto-association. Lorsque des molécules amphiphiles sont placées dans l'eau, elles en perturbent l'organisation. La partie hydrophile va être capable de s'intégrer dans le réseau de liaisons hydrogène et d'établir des interactions attractives avec l'eau en formant une couche d'hydratation autour de la tête polaire. Contrairement à la partie hydrophobe qui va, quant à elle, s'entourer d'un réseau très structuré (de faible entropie) ou « cage de solvation » formé par les molécules d'eau (Figure 29). L'eau est alors éloignée de son équilibre énergétique et tendra naturellement à minimiser la perturbation jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre plus favorable soit atteint : c'est l'effet hydrophobe⁷⁶.

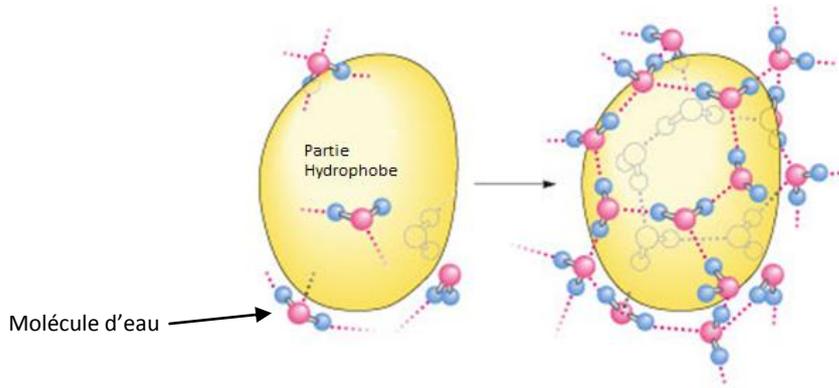


Figure 29: Formation d'une cage de solvation par les molécules d'eau autour d'une partie hydrophobe⁷⁶

Les molécules amphiphiles étant animées d'un mouvement Brownien, les parties hydrophobes sont amenées à se rencontrer et leur attirance respective va leur permettre de joindre leur « cage de solvation », diminuant ainsi le nombre de molécules d'eau impliquées dans ces réseaux. Ce phénomène s'accompagne donc d'un gain d'entropie pour les molécules d'eau qui va être plus important que la diminution de l'entropie due à l'auto-association des molécules amphiphiles. Ainsi l'eau atteint un nouvel équilibre où sa surface de contact avec le matériel hydrophobe est la plus petite possible.

En fonction des caractéristiques moléculaires des espèces amphiphiles, les objets formés par auto-association ont des structures caractéristiques de forme et de taille définies. Pour prédire quel type d'assemblage est le plus à même de se former en solution, Israelachvili et coll.⁷⁷ ont utilisé les paramètres géométriques de la structure amphiphile en les reliant à la courbure de l'interface. Ce paramètre d'empilement P , est défini comme $P = v/a_0.l_c$. Le volume v est celui de la partie hydrophobe qui est propre à chaque structure amphiphile car il dépend de la longueur de la chaîne, de leur nombre, et de la présence ou non de ramification. L'aire effective a_0 est l'aire occupée par la tête polaire lorsque l'équilibre entre les effets hydrophobes qui conduisent à l'assemblage des structures amphiphiles et l'hydratation maximale des têtes polaires entraîne une énergie libre minimale. La longueur critique de la chaîne l_c est inférieure à la longueur maximale qui

correspond à la zone de fluidité de la chaîne. Ainsi, grâce au calcul du paramètre d'empilement, la prédiction des objets formés en solution est possible. La Figure 30 indique la relation entre la forme des molécules amphiphiles et les morphologies formées par les agrégats en solution.

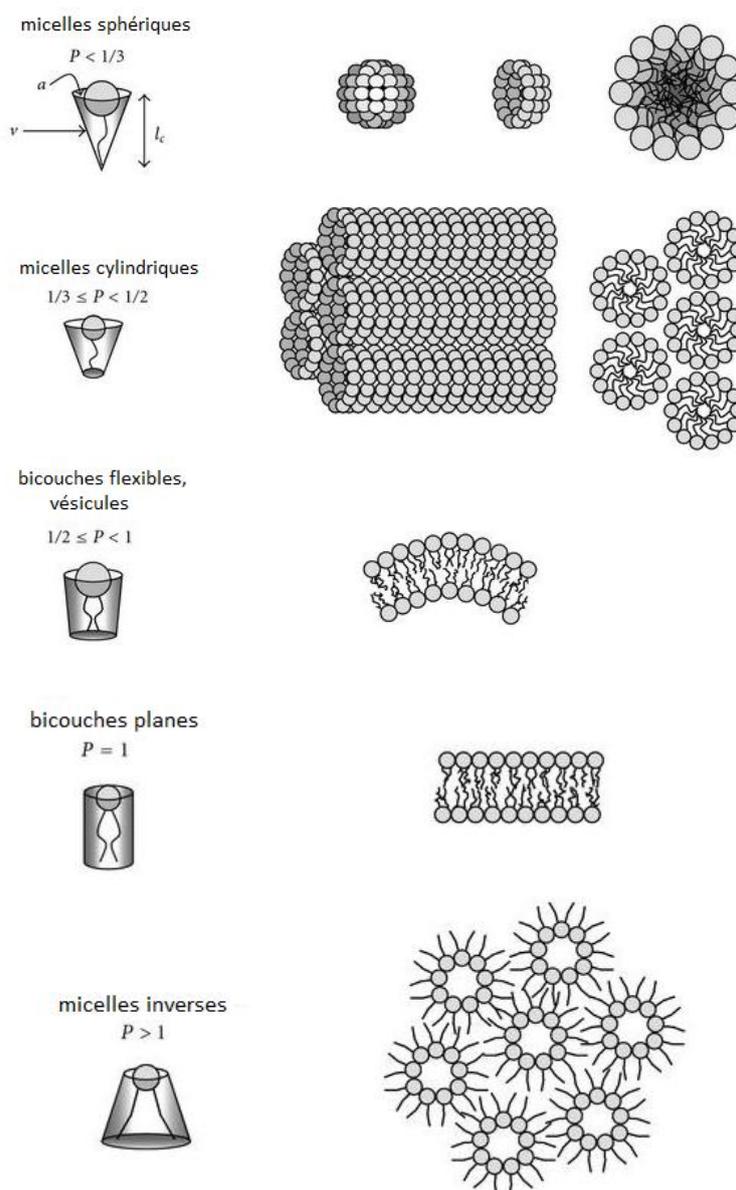


Figure 30: Relation entre le paramètre d'empilement d'une molécule amphiphile et l'organisation des objets formés par auto-association⁷⁸

Pour $P < 0.3$, des micelles sphériques sont obtenues pour des molécules amphiphiles qui sont de structure conique, possédant une chaîne hydrophobe et une tête polaire volumineuse. Lorsque $0.3 < P < 0.5$, les molécules amphiphiles ont alors une tête polaire plus petite et les micelles deviennent cylindriques.

Dans le cas où la molécule présente deux chaînes hydrophobes, les objets formés en solution sont le plus souvent des bicouches et le paramètre d'empilement est alors proche de l'unité. Des bicouches planes sont obtenues si la tête polaire est petite ou des bicouches flexibles (vésicules) si la tête polaire est plus importante. Enfin, lorsque la tête polaire est petite et que les deux chaînes hydrophobes sont très volumineuses, des micelles inverses se forment en solution pour $P > 1$.

Dans le cas de micelles, qui sont des objets dynamiques, les molécules amphiphiles peuvent s'échanger librement et rapidement entre les assemblages et la solution aqueuse. Les assemblages se forment en solution à partir d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique CMC ou concentration d'agrégation critique CAC. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la CMC ou CAC des molécules amphiphiles dans l'eau : tensiométrie, spectrofluorimétrie, diffusion de la lumière, mesure de coefficient de diffusion par résonance magnétique nucléaire. La tensiométrie est la méthode la plus répandue. Le principe consiste à mesurer l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en molécules amphiphiles en solution (Figure 31).

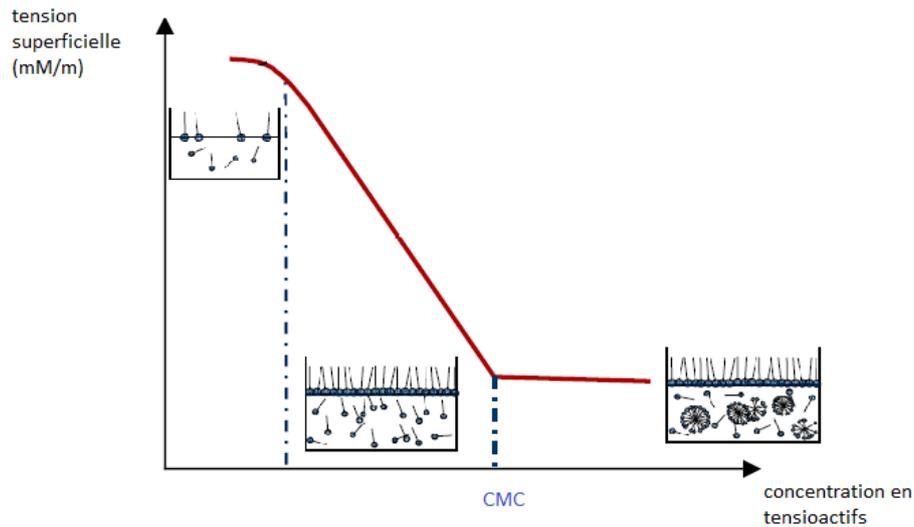


Figure 31: Courbe de tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactif

Tout d'abord, à faible concentration dans l'eau les structures amphiphiles s'adsorbent à l'interface air-eau pour former un film monomoléculaire. Cela entraîne une diminution de la tension superficielle du liquide proportionnellement à la concentration en structures amphiphiles selon la loi de Gibbs^{79,80,81}. Au-delà de la CMC ou CAC, les structures amphiphiles saturant la surface du liquide et la tension superficielle reste constante. Les structures amphiphiles additionnées par la suite vont alors s'auto-assembler en objets de différentes morphologies, pouvant rester en équilibre constant avec les structures amphiphiles libres en solution et à l'interface. En plus de la concentration, la température ainsi que le pH et les sels peuvent influencer sur la taille et la forme des assemblages formés par auto-organisation dans l'eau et donc sur la valeur de la CMC ou CAC.

II.2. Propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles monocaténares

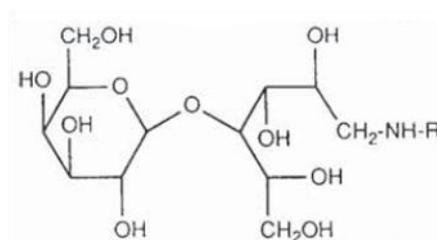
Dans la littérature, plusieurs études mettent en évidence les propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles monocaténares.

Par exemple, Hill et coll.¹³ ont étudié l'évolution de la tension de surface d'alkylpolyglycosides synthétisés par O-glycosilation, en fonction de la longueur de la chaîne alkyle et du nombre de motifs saccharidiques. Ils ont montré que plus la longueur des chaînes alkyles augmentait, plus la CMC diminuait. Selon les auteurs, la longueur des chaînes alkyles a une plus grande influence sur les valeurs de la CMC que le nombre de motifs saccharidiques. En outre, les diagrammes de phase de ces molécules ont été déterminés en milieu aqueux et ont démontrés être dépendants de la longueur de la chaîne hydrophobe et du nombre de motifs de répétition de la tête hydrophile.

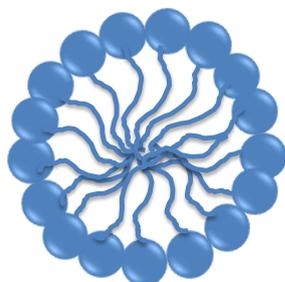
Par ailleurs, Lattes et coll.^{56,64,67,82} ont étudié les propriétés physico-chimiques de molécules amphiphiles monocaténares ayant une tête lactose et une chaîne alkylamine de longueur variable. La concentration micellaire critique des dérivés C₈, C₉, C₁₀ et C₁₂ a été déterminée par des mesures de tension de surface ainsi que le nombre d'agrégation des micelles selon la relation expérimentale suivante : $N = -74.6 + 13.6 n_c$ (avec n_c le nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrophobe). Tout comme Hill et coll.¹³, ils ont trouvé que lorsque la longueur de la chaîne hydrophobe augmentait, la CMC diminuait de façon importante (par un facteur de 25 en passant de C₈H₁₇ à C₁₂H₂₅ et le nombre d'agrégation augmentait parallèlement d'un facteur 2.6).

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des *N*-alkylamino-1-désoxylactitols⁶⁷

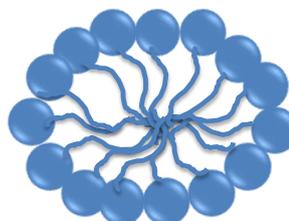
R	CMC (mol/L)	Nombre d'agrégation
C ₈ H ₁₇	1,5.10 ⁻²	34
C ₉ H ₁₉	5,6.10 ⁻³	47
C ₁₀ H ₂₁	2,6.10 ⁻³	62
C ₁₂ H ₂₅	6.10 ⁻⁴	88



De plus, les analyses et modélisations des assemblages par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) ont apporté des informations quant à la forme des objets présents en solution. En effet, il a été montré que les micelles obtenues étaient ellipsoïdales (Figure 32).



Micelle sphérique



Micelle ellipsoïdale

Figure 32: Représentation schématique d'une micelle sphérique et d'une micelle oblate

Plusieurs équipes ont mis en évidence l'influence de la liaison entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe sur le comportement en solution des molécules amphiphiles^{83,84}. Par exemple, Dupuy et coll.⁸⁴ ont réalisé une étude comparative entre trois composés amphiphiles possédant une chaîne hydrophobe à douze atomes de carbone et différentes liaisons les reliant à la tête polaire (Figure 33).

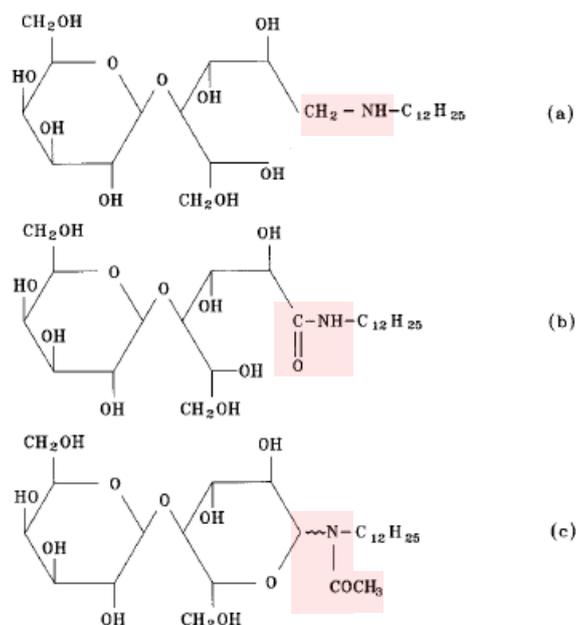


Figure 33: Structure chimique des trois composés amphiphiles (a) *N*-dodécylamino-1-désoxylactitol (b) *N*-dodécyl-lactobionamide (c) *N*-acétyl-*N*-dodécyl-lactosylamine étudiés par Dupuy et coll.⁸⁴

La différence d'encombrement stérique entre ces trois molécules amphiphiles existant à la jonction entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe conduirait à la formation de micelles ellipsoïdales de type oblate dans le cas du *N*-dodécylamino-1-désoxylactitol (Figure 33a) et du *N*-dodécyl-lactobionamide (Figure 33b) présentant une liaison à faible encombrement stérique. En revanche, dans le cas du *N*-acétyl-*N*-dodécyl-lactosylamine (Figure 33c), la liaison est plus volumineuse et la tête polaire est constituée de deux sucres à cycles fermés, ce qui entraînerait la formation de micelles sphériques.

II.3. Propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles en mélange avec des phospholipides

Les propriétés auto-associatives des molécules amphiphiles ont aussi été étudiées sous forme de mélange avec des phospholipides, qui sont des molécules modèles en biologie et biochimie.

Par exemple, Krasteva et coll.⁸⁵ ont étudié le comportement d'un mélange équimolaire du phospholipide 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) et de deux amphiphiles, le docosyl- β -D-glucoside (C20-Glu) et l'hexadécyl- β -D-maltoside (C16-Mal) en solution aqueuse. Le but était d'évaluer la capacité des molécules amphiphiles de stabiliser et d'empêcher l'agrégation des vésicules formées par la DPPC. Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et aux grands angles (WAXS) ont été réalisées afin d'examiner l'influence de l'ajout de ces molécules amphiphiles sur l'organisation des molécules dans la bicouche de DPPC. Ces composés amphiphiles n'ont pas été retenus comme de bons candidats pour empêcher l'agrégation des vésicules de DPPC étant donné que, d'après les auteurs, les molécules de C20-Glu et de C16-Mal seraient complètement intercalées au sein de la bicouche DPPC (Figure 34).

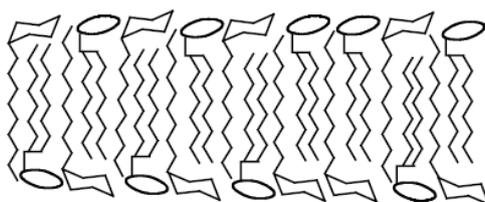


Figure 34: Schéma représentatif de l'intercalation des molécules de DPPC et de C20-Glu au sein de la bicouche⁸⁵

D'autre part, Dahbi et coll.⁸⁶ ont souhaité déterminer la structure précise d'un mélange formé par un composé amphiphile de type *n*-décyl- β -D-glucopyranoside (DG) avec la *L*- α -dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC). Cette étude avait pour but d'améliorer la compréhension des organisations intermédiaires lors des transitions micelle-vésicule⁸⁷, et d'observer la variation de l'épaisseur de la bicouche, de la flexibilité, et du rayon de courbure. Des mélanges de DLPC/DG avec 17 ratios molaires différents compris entre 0 et 0.7 ont été examinés. Les analyses SAXS ont permis de mettre en évidence que les deux constituants du mélange étaient intercalés au sein de la bicouche et que la distance de répétition entre les bicouches variait proportionnellement au ratio molaire DLPC/DG. Pour le

ratio molaire DLPC/DG égal à 0, la distance est de 61 Å, alors que pour $R = 0.7$, elle est de 59 Å.

Il existe dans la littérature quelques études sur les mélanges entre les molécules amphiphiles monocaténares et les phospholipides. Cependant, la littérature est plus riche en travaux concernant des mélanges entre des phospholipides avec des composés tels que des alkylamines⁸⁸, lidocaïne⁸⁹, acide salicylique⁹⁰, ou encore avec des sucres⁹¹⁻⁹³. Les études en mélange avec les molécules amphiphiles monocaténares sont donc encore à développer.

II.4. Conclusion

Cette partie a mis en évidence différentes possibilités d'assemblages formés par auto-association de molécules amphiphiles en milieu aqueux. Cette capacité auto-associative permet d'envisager des applications dans le domaine du transport de principes actifs. De plus, des mélanges de molécules amphiphiles peuvent être envisagés et ainsi modifier la structure globale des assemblages formés et combiner leurs propriétés.

III. Applications associées à la bioactivité des molécules amphiphiles monocaténares

Cette partie est consacrée à la présentation d'applications associées à la bioactivité des molécules amphiphiles monocaténares. Il a été choisi de décrire ici quelques exemples présentés dans la littérature, qui vont permettre d'appréhender des applications dans le domaine végétal et animal.

III.1. Dans le domaine végétal

De nos jours, la production de plantes saines avec un rendement optimal est devenue une priorité au niveau de l'agriculture mondiale. En effet, l'augmentation de la population implique des besoins alimentaires de plus en plus importants. De ce fait, de nombreux articles et brevets portent sur l'amélioration des rendements de plantation, ainsi que sur la lutte contre les maladies virales pouvant les détruire. Les deux paragraphes suivants présenteront deux exemples représentatifs des efforts de recherche dans ces domaines.

III.1.1. Lutte contre les maladies virales des plantes

Les plantes sont sujettes à des maladies virales pouvant être transmises par la sève de la plante ou bien par des agents externes comme les pucerons, les aphides ou les nématodes⁹⁴. Les techniques de lutte existantes consistent en l'élimination complète des plantes malades ou de façon moins radicale à l'application d'un traitement contre les agents externes responsables de la maladie. Il existe plusieurs substances actives physiologiquement sur les maladies virales : les antimétabolites, certaines protéines, certains polysaccharides, et les tanins qui sont quant à eux inefficaces contre certains des agents responsables de la maladie (tels que les aphides). Il est donc nécessaire d'obtenir des substances qui soient à la fois actives sur une grande variété de maladies virales des plantes, non-phytotoxiques et non-dangereuses pour l'homme et les animaux.

Peu d'exemples mettent en avant l'utilisation de molécules amphiphiles pour la lutte contre les maladies virales des plantes. Tokuda et coll.⁹⁴ ont décrit la synthèse de soixante-trois composés censés répondre au cahier des charges ci-dessus. Le composé actif correspond à la formule générale suivante :

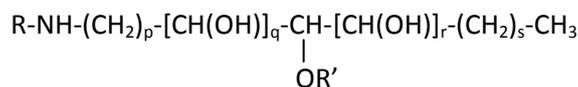


Figure 35: Formule chimique générale du composé actif contre les maladies virales des plantes, objet du brevet de Tokuda et coll. R : groupe alkyle de 3 à 18 carbones ; R' : H ou glycopyranosyle ; p,q,r : 1 ou 2 ; p+q = 3 ; s : 0 ou 1 ; r+s = 1 ou 2

L'accès à des composés synthétisés à partir de neuf sucres différents (glucitol, mannitol, galactitol, rhamnitol, ribitol, xylitol, maltitol, lactitol, cellobitol), et de plusieurs longueurs de chaînes (trois à dix-huit carbones), a permis aux inventeurs de bénéficier d'une large gamme de composés pour effectuer les tests biologiques. Trois tests biologiques ont été successivement effectués avec comme agent pathogène le virus de la mosaïque du tabac (VMT) ou le virus de la mosaïque du concombre (VMC). Ce choix est intéressant car ces deux virus sont particulièrement répandus dans le monde^{94,95}.

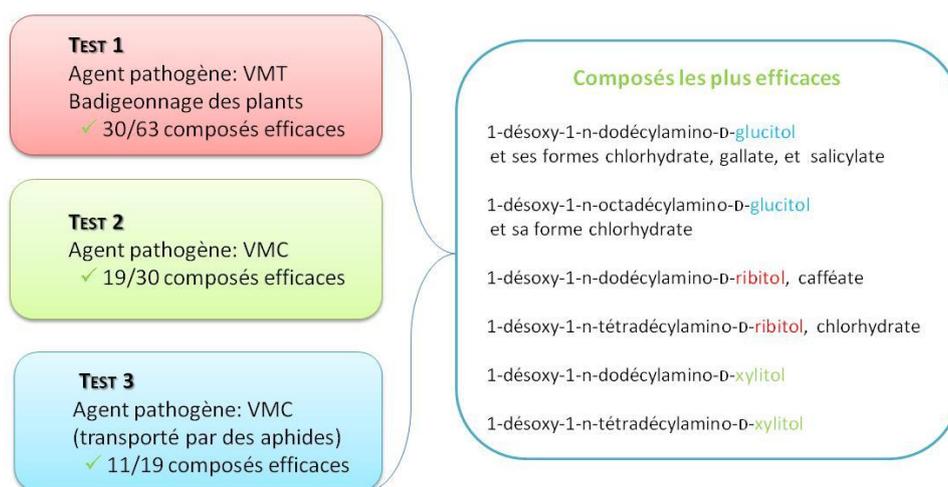


Figure 36: Schéma bilan des tests biologiques effectués par Tokuda et coll.

Certains composés sont efficaces non seulement sur les maladies virales des plantes apportées par la sève mais aussi sur les maladies virales apportées par des vecteurs de type aphides, sans aucune action phytotoxique sur les plantes à protéger. Ces composés possèdent donc de réelles capacités à lutter contre les maladies virales des plantes. Toutefois, certains inconvénients majeurs ont été relevés quant aux protocoles de test mis en place par les auteurs. D'une part, la vaporisation des plants (tests 2 et 3) implique un rejet partiel dans l'atmosphère du composé actif. Même s'il n'est pas phytotoxique, il n'a pas subi d'autres tests de toxicité. D'autre part, l'application du composé actif est réalisée soit *ante* ou bien juste après l'inoculation du virus. Cela écarte du traitement les plants qui ne sont pas immédiatement pris en charge. Enfin, le choix de ne tester que les composés qui ont validé le test 1, puis 2 peut sembler restrictif. Un composé actif non-efficace sur le VMT l'est peut-être sur le VMC.

L'utilisation de molécules amphiphiles dans la lutte contre deux maladies virales des plantes a donc démontré son efficacité dans ce travail. Aucune explication n'y est cependant avancée sur le mécanisme d'action des composés amphiphiles contre les deux virus. On peut imaginer qu'ils agissent comme des antiviraux classiques en perturbant chimiquement la réplication du virus. De nombreux défis restent encore à relever dans ce domaine étant donné la large variété de virus et de plantes.

III.1.2. Utilisation de Lipo-chitooligosaccharides pour améliorer la croissance des plantes

Les plantes sont des organismes vivants qui se développent grâce à un apport d'énergie (rayonnement solaire) et de matière fournie par le sol et l'atmosphère. Parmi ces besoins nutritifs, l'élément azote joue un rôle fondamental lors de la croissance des plantes. Toutefois, les végétaux ne sont pas capables d'assimiler l'azote (N₂) contenu dans l'atmosphère. C'est pourquoi une symbiose va se mettre en place entre la plante et des bactéries fixatrices d'azote⁹⁶. Cela va induire la formation de nodosités racinaires dont le développement est contrôlé par des échanges de signaux moléculaires entre les deux

symbiotes. Les facteurs de nodulation (Nod) lipo-chitooligosaccharidiques (LCO), sécrétés par les bactéries rhizobia, appartiennent à ces molécules « signal »⁹⁷⁻⁹⁹ (Figure 37).

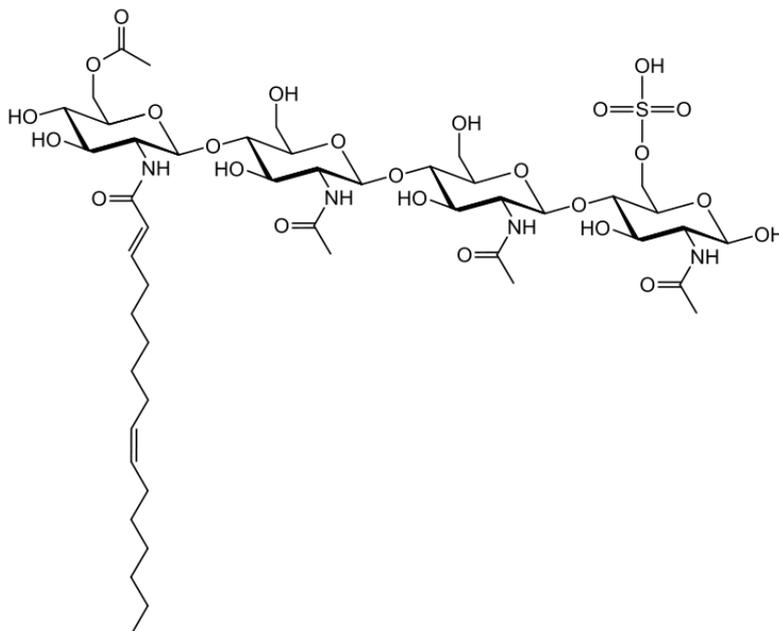


Figure 37: Exemple de la structure du facteur Nod sécrétés par la bactérie rizobia (*Sinorhizobium meliloti*)⁹⁷

La présence de substituants sur le squelette oligosaccharidique influe sur l'activité biologique de ses molécules¹⁰⁰⁻¹⁰². La plupart des facteurs Nod possèdent un squelette β-1,4-*N*-acétyl-*D*-glucosamine, *N*-acylé à l'extrémité non-réductrice par un acide gras ou par un acide gras polyinsaturé. La synthèse de ces facteurs est délicate¹⁰³ mais elle permet d'accéder à une molécule d'intérêt biologique et ainsi de tenter d'élucider le mode de fonctionnement des facteurs Nod¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Quelques exemples significatifs sur leur efficacité sont décrits ci-dessous.

Afin d'améliorer la croissance et le rendement des plantes, il a été envisagé d'appliquer les facteurs Nod directement à la graine ou dans le sol avant plantation¹⁰⁸. En 2008, la société EMD Crop BioSciences Inc. déposa un brevet concernant le traitement de soja et de maïs (feuilles et graines) par des LCO en présence de polysaccharides tels que la chitine et le chitosane¹⁰⁸. Lors de cette étude à grande échelle, ils ont montré que

l'utilisation couplée de LCO et de chitosane augmentait les rendements des céréales avec une efficacité encore améliorée quand l'application avait lieu sur la graine (par rapport à l'application de LCO seuls). Cependant, Ferguson et coll.⁹⁶ ont mis en évidence la possible dégradation des LCO par les chitinases des plantes. Cela implique donc que les LCO échangent les signaux moléculaires avec les plantes ou les graines et initient la réponse bénéfique avant d'être dégradés par les chitinases. Bien qu'aucune preuve de mécanisme ne soit apportée à ce jour, D'Haeze et coll.⁹⁷ pensent que des substituants spécifiques doivent protéger les facteurs Nod de l'hydrolyse par les enzymes de la plante hôte leur laissant le temps agir avant d'être dégradés.

D'autre part, il a été possible d'utiliser les LCO pour augmenter la photosynthèse, et/ou la croissance, et/ou le rendement des cultures, en les vaporisant par spray sur les feuilles des plantes¹⁰⁹ dans une large gamme de concentration allant de 10^{-5} à 10^{-14} M. La photosynthèse et le rendement sont améliorés pour de nombreuses cultures telles que le soja, le maïs, les pommiers, ou encore les vignes. D'autres publications font état de l'action similaire des LCO pour des concentrations de l'ordre du picomolaire ou bien du nanomolaire^{97,110}.

Ces exemples ont mis en avant des propriétés biologiques intéressantes des molécules amphiphiles contre les maladies virales des plantes et favorisant l'amélioration du rendement des cultures. Cependant, même si le mécanisme d'action a fait l'objet de nombreuses études, il n'est pas encore parfaitement élucidé à ce jour.

III.2. Dans le domaine animal

Grâce à leur structure modulable et à leur propriété auto-associative, les molécules amphiphiles offrent un large panel d'applications dans le domaine animal. Ils peuvent servir de molécules de transport, avoir une action curative ou encore servir de modèle pour mieux comprendre les processus physiologiques de l'organisme.

III.2.1. Les molécules amphiphiles dans la vectorisation de principes actifs

La vectorisation d'un principe actif de nature chimique ou biologique s'effectue grâce à un vecteur qui va acheminer le principe actif jusqu'au site malade. Ce ciblage nécessite que le vecteur franchisse des barrières chimiques et biologiques de manière intacte sans altérer les organes sains ou l'équilibre physiologique de l'individu. Un des défis majeurs de la vectorisation est de réussir à augmenter la spécificité d'action de l'agent thérapeutique et ainsi de réduire les effets indésirables causés par les principes actifs les plus toxiques¹¹¹⁻¹¹³.

Les molécules amphiphiles peuvent avoir un rôle important lors du ciblage thérapeutique. En effet, de nombreux travaux de recherche s'intéressent à la compréhension de phénomènes physiologiques et biochimiques induit par l'interaction spécifique entre les protéines présentes à la surface des cellules et les saccharides¹¹⁴ (Figure 38).

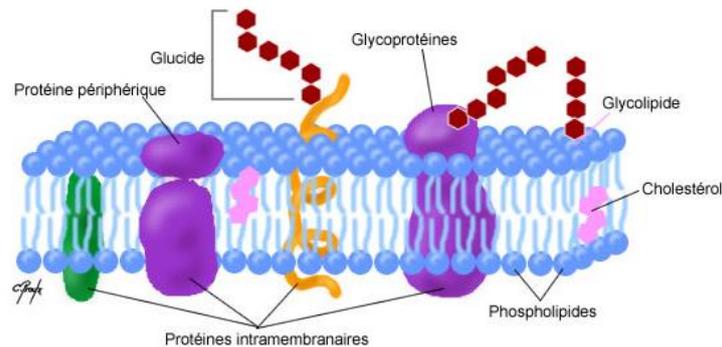


Figure 38: Schéma de la membrane plasmique¹¹⁵

Il a été démontré que l'affinité pour la protéine est plus importante avec une molécule multivalente¹¹⁶ de type oligosaccharide plutôt qu'avec un monosaccharide. Il est ainsi nécessaire de synthétiser des structures complexes, comprenant plusieurs sites d'ancrage possibles (Figure 39).

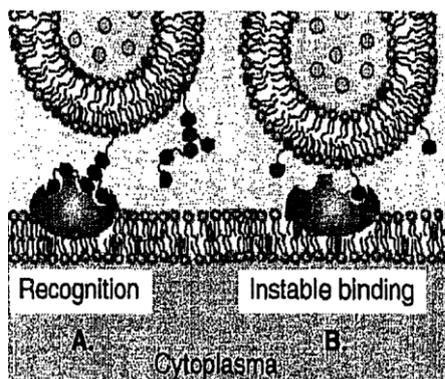


Figure 39: Interaction entre un système glycoconjugué délivrant un principe actif et un récepteur saccharidique situé à la surface de la cellule. (A) Le composé amphiphile est reconnu par la protéine. (B) Le site d'ancrage est insuffisant pour avoir une liaison stable entre le composé amphiphile et la protéine¹¹⁶

A ma connaissance, aucune molécule amphiphile monocaténaire n'est utilisée comme seul constituant d'un vecteur. Cependant, par sa nature il peut prendre part à une structure plus complexe en apportant une valeur ajoutée de reconnaissance biologique au système.

Par exemple, Soussan et coll.¹¹¹ ont récemment développé un procédé industriel impliquant la délivrance cutanée d'un anti-inflammatoire qui, associé à un composé amphiphile (*N*-dodécylamino-1-désoxylactitol), forme une molécule amphiphile catanionique (Figure 40).

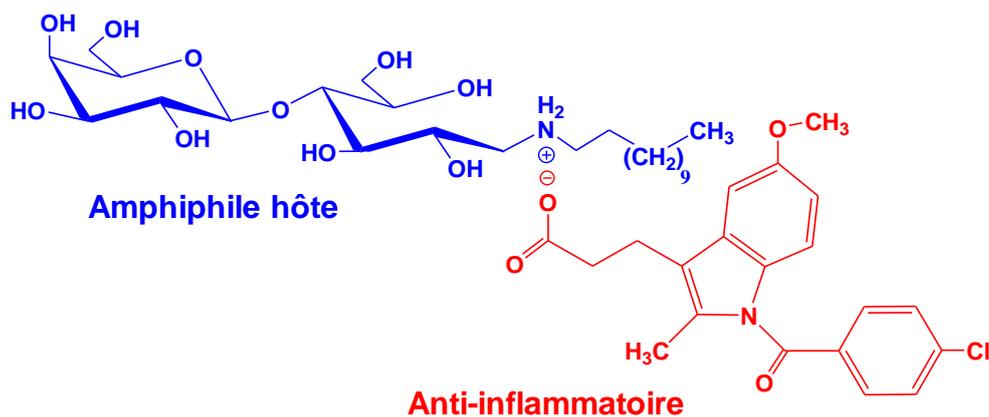


Figure 40: Structure d'une molécule amphiphile cationique formée par l'association d'un anti-inflammatoire et d'un composé amphiphile¹¹¹

D'après les auteurs, ce système cationique s'auto-associe spontanément en milieu aqueux sous forme de vésicules complexes, entraînant une augmentation de l'activité anti-inflammatoire du principe actif tout en permettant un relargage contrôlé et prolongé par voie cutanée. L'avantage de ces systèmes est de pouvoir augmenter l'efficacité de son principe actif par le choix judicieux de son auto-association avec une espèce amphiphile sous forme cationique.

D'autres systèmes permettent de combiner la délivrance de principes actifs hydrophobes, faisant partie intégrante de la membrane de vésicules cationiques, et de principes actifs hydrophiles, encapsulés dans la cavité aqueuse interne. Par exemple, le composé amphiphile *N*-hexadécylamino-1-désoxylactitol a été utilisé comme brique constitutive d'une molécule d'un système amphiphile tricaténaire cationique, qui s'auto-associe en vésicules pouvant être utilisées pour l'encapsulation de principe actif¹¹⁷.

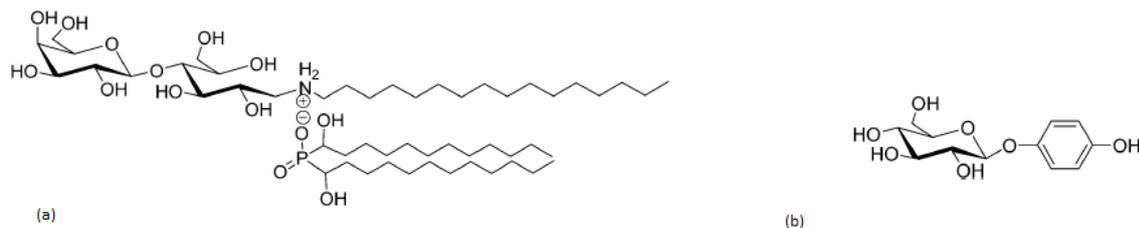


Figure 41: Représentation de la molécule d'un système amphiphile tricaténaire cationique constituant la membrane vésiculaire (a); et de la molécule d'arbutin encapsulée dans la cavité interne (b)

La tête polaire de la molécule amphiphile permet d'augmenter l'hydrophilie du système cationique. Il a été montré que les vésicules formées en milieu aqueux ou en milieu tampon peuvent encapsuler 8% d'arbutin (principe actif fluorescent) et retenir ce principe actif pendant au moins 30 heures au sein de leur cavité interne. Ces vecteurs ont un grand potentiel en vectorisation, même si la compréhension de l'interaction entre ces vecteurs et la membrane lipidique semble encore complexe¹¹⁸.

III.2.2. Action antifongique, antimicrobienne et amélioration de la réponse immunitaire

Muhizi et coll.^{119,120} ont mis en évidence l'activité antifongique et antimicrobienne de certains *N*-alkyl-β-D-glucosylamines sur les organismes (Figure 42).

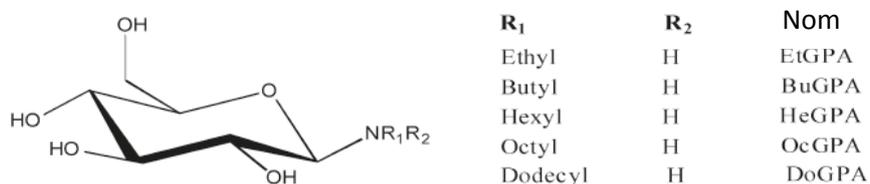


Figure 42: Structure des *N*-alkyl-β-D-glucosylamines actifs contre les bactéries *Listeria innocua* et *Salmonella typhimurium*, et contre les champignons *Fusarium proliferatum*, *Coriolus versicolor* et *Poria placenta*¹²⁰

Ces molécules amphiphiles ont montré une activité importante contre les bactéries *Listeria innocua* et la *Salmonella typhimurium*, ainsi que contre les champignons *Fusarium proliferatum*, *Coriolus versicolor* et *Poria placenta*. Cette activité augmente avec la concentration en *N*-alkyl- β -D-glucosylamines ainsi qu'avec la longueur de la chaîne alkyle (Tableau 6).

Tableau 6: Inhibition de la croissance de *Poria placenta* après 9 jours d'incubation avec différentes concentrations en molécules amphiphiles¹¹⁹

mol/mL 10 ⁻³	Percentage of inhibition \pm SEM				
	EtGPA	BuGPA	HeGPA	OcGPA	DoGPA
0.0025	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	93.7 \pm 0.4
0.0075	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
0.025	15.3 \pm 1.4	78.4 \pm 3.5	96.1 \pm 2.0	98.0 \pm 1.4	100.0 \pm 0.0
0.05	26.3 \pm 4.1	95.7 \pm 1.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
0.075	58.8 \pm 4.4	100.0 \pm 0.0	–	–	–

Le maximum d'efficacité est atteint avec le DoGPA, ayant une chaîne hydrophobe à douze atomes de carbone. D'après les auteurs, il semblerait donc que ce soit la molécule la plus hydrophobe qui est la plus efficace contre les champignons et les bactéries.

D'autre part, il a été montré que des molécules amphiphiles dérivées de chitooligosaccharides possédaient des propriétés immunostimulantes et antitumorales⁵⁴. Parmi ces dérivés, le composé le plus actif est un lipo-chitooligosaccharide possédant une chaîne hydrophobe à 14 carbones (Figure 43).

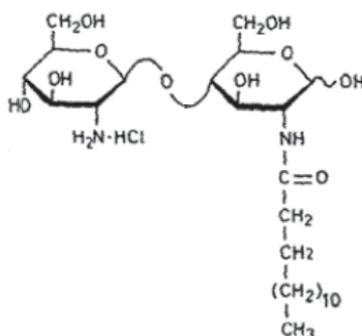


Figure 43: Exemple du composé amphiphile synthétisé par Gorbach et coll.⁵⁴ possédant des propriétés immunostimulantes et antitumorales

Les injections péritonéale et intraveineuse de ce composé chez les souris de lignée CBA (modèle de souris mâle fréquemment utilisé) augmentent leur durée de vie moyenne de 188 %, stimule l'activité des interleukine-1 (déclencheurs de la réponse immunitaire) et induit la nécrose de tumeurs (cellules de carcinome d'Ehrlich) *in vitro*.

Par ailleurs, un composé amphiphile monosaccharidique (Figure 44) a montré des propriétés intéressantes en immunologie¹²¹.

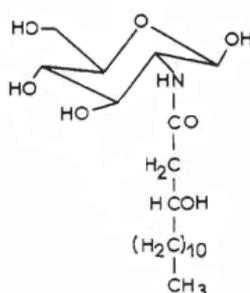


Figure 44: Composé amphiphile synthétisé et utilisé pour les tests immunologiques par Charon et coll.¹²¹

Ce composé est significativement actif pour stimuler *in vitro* le système du complément (qui intervient dans la défense contre les microbes, par l'intermédiaire de protéines circulantes et membranaires qui viennent en aide à l'action des anticorps) du porc et de l'homme. De

plus, le composé amphiphile synthétisé favorise la mitogénécité (division cellulaire) des cellules de la rate chez la souris.

En outre, plusieurs dérivés *N*-octanoyl-(NOG), *N*-decanoyl-(NDG), *N*-lauroyl-(NLG), *N*-myristoyl-(NMG), *N*-oleyl-(NOLG) et *N*-stearoyl-(NSG) *D*-glucosamine ont été synthétisés et leur bioactivité comparée à celle d'un stimulant du système immunitaire¹²² constituant des bactéries gram négatif : le lipopolysaccharide endotoxique (LPS). Il a été montré (chez la souris) que les molécules amphiphiles synthétisées avaient un effet adjuvant comparable voire supérieur à celui des LPS lors de la réponse immunitaire de γ -globulines humaines (appartenant à la famille des anticorps) et des globules rouges de mouton (SRBC). De plus, certains de ces composés amphiphiles ont montré un effet protecteur contre des irradiations appliquées chez la souris. Bien que les LPS soient les plus efficaces, le *N*-myristoyl-*D*-glucosamine (NMG) et le *N*-décanoyl-*D*-glucosamine (NDG) apportent une protection significative (Figure 45).

Traitement	Pourcentage de survivants après irradiation					
	Jour 1	Jour 6	Jour 12	Jour 18	Jour 24	Jour 30
LPS	100	90	80	80	80	80
NDG	100	90	60	40	40	40
NLG	100	90	30	10	10	10
NMG	100	90	40	40	40	40
Control	100	80	0			

Figure 45: Survie des souris femelles irradiées deux jours après injection des molécules amphiphiles¹²²

Il est à noter que lors de ces tests, les doses ont été administrées aux souris avant irradiation, et ont été différentes dans le cas de LPS (10 μ g) et des autres molécules amphiphiles synthétisées (50 μ g). A la lecture de cet article, on peut se demander s'il ne serait pas judicieux d'effectuer d'autres mesures à des concentrations variées ainsi que des essais d'administration du traitement après radiations.

Ainsi, certaines espèces amphiphiles monocaténares possèdent des propriétés immunologiques comparables aux composés présents à l'état naturel chez l'animal. L'avantage des molécules amphiphiles de synthèse est la connaissance exacte de leur structure permettant d'étudier plus facilement leur mode d'action. L'application des molécules amphiphiles doit être choisie précautionneusement. En effet, Guidetti et coll.¹²³ ont mis en évidence l'activité antivirale des *N*-alkylamino-1-désoxylactitols en dessous de la concentration micellaire critique et leur toxicité au dessus de la concentration micellaire critique.

III.2.3. Les molécules amphiphiles de synthèse en tant que substituants de molécules amphiphiles naturelles

Afin d'étudier le mode d'action des protéines membranaires, et plus particulièrement celles participant à la reconnaissance cellulaire, il est nécessaire de les extraire de leur milieu. Les protéines peuvent ainsi être solubilisées par des molécules amphiphiles spécifiques¹²⁴. Plusieurs équipes de recherche ont synthétisé des amphiphiles permettant de remplacer ceux existants sur le marché en améliorant leur efficacité. Ces composés synthétisés ne doivent pas dénaturer la protéine membranaire, sont facilement éliminables par dialyse, et leur synthèse doit être efficace et conduire à des produits purs.

Garelli-Calvet et coll.⁶⁶ ont comparé l'efficacité de la digitonine commerciale (glycoside qui solubilise les membranes) et de molécules amphiphiles synthétisées, pour l'extraction de récepteurs opiacés du cerveau de la grenouille *Rana ridibunda*. Parmi une série de *N*-alkylamino-1-désoxylactitols avec des chaînes hydrophobes allant de huit à douze carbones, le *N*-nonylamino-1-désoxylactitol a montré des propriétés de solubilisation similaires à celle de la digitonine (Figure 46).

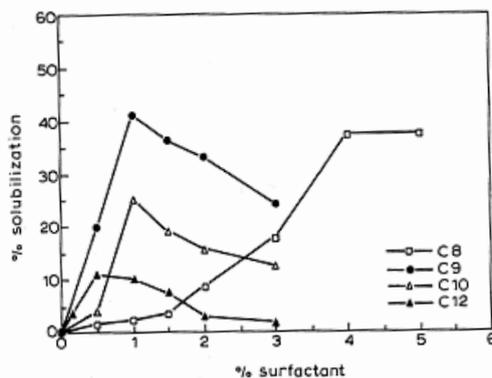


Figure 46: Taux de solubilisation des récepteurs opiacés en fonction de la proportion de *N*-alkylamino-1-désoxylactitol utilisée⁶⁶

A une concentration de 1% (m/v), le taux de solubilisation par les composés C₉ et C₁₀ est maximum avec 41% et 25% respectivement. En comparaison, le taux de solubilisation de la digitonine est compris entre 33% et 50 % en fonction de sa pureté. La molécule amphiphile synthétisée C₉ est donc une candidate idéale pour le remplacement de la digitonine. En outre, Hildreth⁵⁵ a synthétisé des analogues des *N*-alkyl- β -D-glucosides (chaîne hydrophobe à 7, 8 ou 9 carbones) et étudié leur efficacité lors de la solubilisation des membranes plasmiques. Tout comme Garelli-Calvet et coll.⁶⁶, Hildreth a mis en évidence l'effet de la longueur de la chaîne hydrophobe mais contrairement à eux, il a montré que plus la longueur de la chaîne hydrophobe est grande, plus la solubilisation de la membrane est importante.

D'autre part, il est important de pouvoir synthétiser des molécules amphiphiles semblables à celles présentes au sein des organismes pour étudier et comparer leur mécanisme d'action¹²⁵. Par exemple, afin d'évaluer si les sphingolipides perturbent l'inhibition ou la stimulation de l'agrégation de neutrophiles au sein des cellules (qui ont un rôle important lors de la phagocytose des cellules étrangères ou infectées), Fiore et coll.¹²⁶ ont synthétisé cinq analogues de sphingolipides (Figure 47).

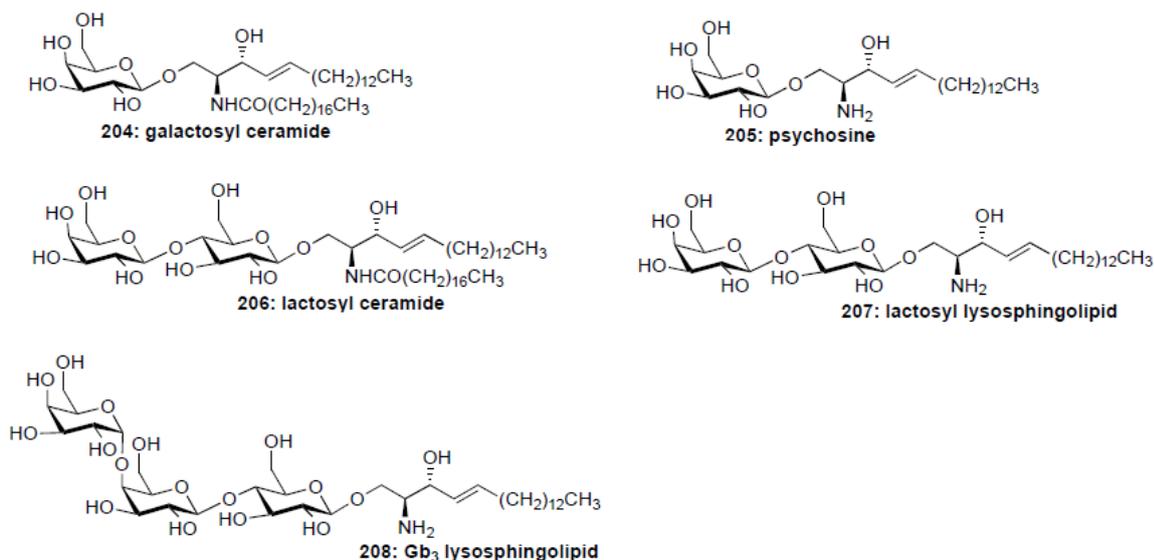


Figure 47: Structures chimiques de sphingolipides synthétisés¹²⁶

Les résultats des expériences réalisées avec ces cinq composés ont montré que les sphingolipides synthétisés, lorsqu'ils étaient ajoutés à des cellules intactes, permettaient aux neutrophiles d'exercer leur fonction. D'après les auteurs, ce résultat est important car il permet d'avancer que les sphingolipides présents dans les membranes plasmiques ne perturbent pas l'action des neutrophiles et donc ne défavorisent pas la réponse immunitaire.

D'autres voies applicatives sont possibles pour le marquage *in vivo*¹¹³. Par exemple, un composé amphiphile à base de *N*-succinyl-chitosane et un autre à base de *N*-succinyl-chitosane lactosaminé (Figure 48) ont été marqués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine permettant de les localiser rapidement après injection et durant 48 heures au sein de souris.

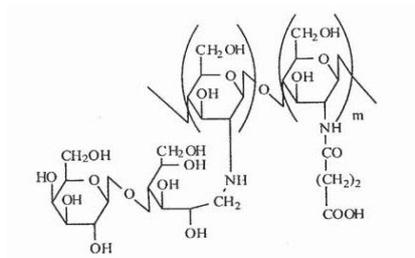


Figure 48: Structure du *N*-succinyl-chitosane lactosaminé¹¹³

Le composé lactosaminé a montré une action prolongée par rapport au composé *N*-succinyl chitosane seul, qui est un paramètre important dans le cahier des charges d'un marqueur *in vivo*.

III.3. Conclusion

Les molécules amphiphiles de synthèse peuvent donc présenter d'excellentes propriétés biologiques dans le domaine végétal et animal. Les molécules amphiphiles entrent en jeu lors de la vectorisation des principes actifs, et elles peuvent aussi agir directement sur des agents pathogènes de type champignons ou bactéries. Ce sont également des composés appropriés pour jouer le rôle de modèles de molécules amphiphiles naturelles, permettant ainsi d'améliorer la compréhension des phénomènes physiologiques.

Conclusion

Cette étude bibliographique permet d'avoir une vision globale (et non exhaustive) sur la synthèse, les propriétés d'auto-association et les applications associées à la bioactivité des molécules amphiphiles de type monocaténaire décrites dans la littérature.

La première partie consacrée aux voies de synthèse de ces molécules amphiphiles met en évidence les nombreuses possibilités de site d'ancrage entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe et les difficultés pour obtenir des composés purs avec un faible nombre d'étapes.

La deuxième partie apporte des éléments de compréhension quant aux possibilités d'auto-association des molécules amphiphiles en milieu aqueux qui vont permettre l'accès à des applications variées.

Les applications liées à la bioactivité des molécules amphiphiles ont ensuite été décrites dans la troisième partie avec des exemples d'applications dans le domaine végétal et animal.

Cette étude bibliographique montre que l'étude du comportement et du rôle des molécules amphiphiles est complexe et reste un important domaine de recherche à explorer afin d'accéder à leurs nombreuses applications potentielles.

Références bibliographiques

1. Kittl, R.; Withers, S. G. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research* **2010**, *345* (10), 1272-1279.
2. Toshima, K.; Tatsuta, K. Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural products synthesis. *Chemical Reviews* **1993**, *93* (4), 1503-1531.
3. Sinay, P. Recent advances in glycosylation reactions. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63* (519).
4. Boons, G. J. Recent developments in chemical oligosaccharide synthesis. *Contemp. Org. Synth.* **1996**, *3* (3), 173-200.
5. Nicolaou, K. C.; Mitchell, H. J. Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40* (9), 1576-1624.
6. Fischer, E. Ueber die Glucoside der Alkohole. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26* (3), 2400-2412.
7. Garegg, P. J. Synthesis and reaction of glycosides. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Volume 59 ed.; Academic Press: 2004; pp 69-134.
8. Persson, C. M.; Claesson, P. M.; Johansson, I. Interfacial Behavior of n-Octyl + β -D-Glucopyranoside Compared to That of a Technical Mixture Consisting of Octyl Glucosides. *Langmuir* **2000**, *16* (26), 10227-10235.
9. Izumi, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S. TMSCl as a Mild and Effective Source of Acidic Catalysis in Fischer Glycosidation and Use of Propargyl Glycoside for Anomeric Protection. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66* (1), 211-214.
10. Balzer, D. Specialist Surfactant: Alkylpolyglucosides. Chapman & Hall ed.; 1997; p 169.
11. Savelli, G.; Focher, B.; Bunton, C. A. Effects of head group structure on the properties of surfactants. *Colloids and Surfaces* **1990**, *48*, 29-34.
12. Castro, M. J. L.; Kovensky, J.; Fernandez, C. Ecologically safe alkyl glucoside-based gemini surfactants. *Arkivoc* **2005**, (12), 253-267.
13. Hill, K.; Von Rybinski, W. Alkyl polyglycosides - Properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37* (10), 1328.
14. Gervay-Hague, J.; Du, W.; Kulkarni, S. S.; Schombs, M. One-pot synthesis of unprotected α/β -O-glycolipids. WO2008124729A1, Oct 16, 2008.

15. Du, W.; Gervay-Hague, J. Efficient Synthesis of α -Galactosyl Ceramide Analogues Using Glycosyl Iodide Donors. *Organic Letters* **2005**, *7* (10), 2063-2065.
16. OECD Guidelines for the testing of chemical. *OECD Guidelines for the testing of chemicals*, **1993**.
17. Kerverdo, S.; Brancq, B. Tensioactifs basés sur des sucres. *L'actualité Chimique*, **2008**.
18. PLOU, F. J.; CRUCES, M. A.; BERNABE, M.; MARTIN-LOMAS, M.; PARRA, J. L.; BALLESTEROS, A. Enzymatic Synthesis of Partially Acylated Sucrosea. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1995**, *750* (1), 332-337.
19. Sin, Y. M.; Cho, K. W.; Lee, T. H. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnology Letters* **1998**, *20* (1), 91-94.
20. Spiliotis, N.; Voustas, E.; Magoulas, K.; Tassios, D. Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. *Separ. Purif. Technol.* **2000**, *1* (9), 229-236.
21. Liu, TX.; Gong, L.; Xin, J. The synthesis of sucrose ester and selection of its catalyst. *J. Mol. Catal. A : Chemical* **1999**, *147*, 37-40.
22. Piccicuto, S.; Blecker, C.; Brohée, J. C.; Mbampara, A.; Lognay, G.; Deroanne, C.; Paquot, M.; Marlier, M. Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2001**, *5* (4), 209-219.
23. Farone, W.; Serfass, RW. Sugar-ester manufacturing process. US Patent 5756716, 1998.
24. Matsumoto, S.; Hatakawa, Y.; Nakajima, A. Method for producing powdery HLB sugar fatty acid ester. US Patent 5144022, 1992.
25. Kea, S.; Charles, W. Separation and purification of sugar esters. GB Patent 2163425, 1986.
26. Philippe, M. Process for preparing monoesters predominantly in the 6 position of D-maltose, their use in cosmetic, buccal, dental, pharmaceutical, and food compositions. FR Patent 5550225, 1996.
27. Philippe, M. Chemical preparation of fatty acid mono-ester(s) of D-Fructose. FR Patent 2696467, 1994.
28. Kuang, D.; Obaje, OJ.; Kjassim, A. Nuclear magnetic resonance characterization of reaction products of interesterification of periacetylated D-glucopyranose and fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 43-47.

29. Queneau, Y.; Chambert, S.; Besset, C.; Cheaib, R. Recent progress in the synthesis of carbohydrate-based amphiphilic materials: the examples of sucrose and isomaltulose. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (12), 1999-2009.
30. Queneau, Y.; Fitremann, J.; Trombotto, S. The chemistry of unprotected sucrose: the selectivity issue. *Comptes Rendus Chimie* **2004**, *7* (2), 177-188.
31. Gulati, R.; Saxena, R. K.; Gupta, R.; Yadav, R. P.; Davidson, W. S. Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry* **1999**, *35* (5), 459-464.
32. Kim, J. E.; Han, J. J.; Yoon, J. H.; Rhee, J. S. Effect of salt hydrate pair on lipase-catalyzed regioselective monoacylation of sucrose. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57* (1), 121-125.
33. Garti, N.; Aserin, A.; Fanun, M. Non-ionic sucrose esters microemulsions for food application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *164*, 27-38.
34. Naoe, K.; Nishino, M.; Ohsa, T.; Kawagoe, M.; Imai, M. Protein extraction using sugar ester reverse micelles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74* (3), 221-226.
35. Redecker, C.; Altrup, U.; Hoppe, D.; Hense, T.; Kreier, A.; Rabe, A.; Düsing, R.; Speckmann, E.J. Effects of valproate derivatives II. Antiepileptic efficacy in relation to chemical structures of valproate sugar esters. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 267-281.
36. Rihakova, Z.; Filip, V.; Smidrkal, J.; Plockova, M. Antimicrobial effect of saccharide esters with lauric acid. *Czech. J. Food Sci.* **2000**, *18*, 263-265.
37. Pestman, M. Carbohydrate-derived surfactants containing an N-acylated amine functionality. 1996.
38. Vandeputte, J. Agro-tensioactifs. *Industries & Agro-Ressources*, **2009**.
39. Su, K. L.; Baumann, W. J.; Madson, T. H.; Schmid, H. H. O. Long-chain cyclic acetals of glycerol: metabolism of the stereomeric 1,3-dioxanes and 1,3-dioxalanes in myelinating rat brain. *Journal of lipid research* **1974**, *15*, 39-43.
40. Fanton, E.; Fayet, C.; Gelas, J. Long-chain acetals derived from sucrose as a new class of surfactants. *Carbohydrate Research* **1997**, *298* (1-2), 85-92.
41. Faivre, V.; Rosilio, V. Interest of glycolipids in drug delivery: from physicochemical properties to drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, 1031-1048.
42. March, J. *Advanced in Organic Chemistry*; 3rd ed.; 1985.

43. Muzart, J.; Hénin, F.; Estrine, B.; Bouquillon, S. Procédés de préparation de composés tensio-actifs à partir de polyols. FR 0116363, 2001.
44. Palkovits, R.; Nieddu, I.; Kruithof, C.; Weckhuysen, B. Palladium-Based Telomerization of 1,3-Butadiene with Glycerol Using Methoxy-Functionalized Triphenylphosphine Ligands. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (29), 8995-9005.
45. Zakharkin, L. I.; Guseva, V. V.; Sulaimankulova, D. D.; Korneva, G. M. Synthesis of 6-(Z-2,7-octadienyl)/alpha/-D-galactopyranose. *Zh. Org. Khim.* **1988**, *24* (1), 119-121.
46. Gruber, B.; Weese, K. J.; Hoagland, S. M.; Mueller, S. P.; Hill, K.; Behr, A. Octadienyl ethers and a process for making octadienyl ethers. WO 90/13531, 1990.
47. Hill, K.; Axt, D.; Weese, K. J. Telomerization process of a conjugated alkadiene with a polyol. 5198598, 1993.
48. Hill, K.; Gruber, B.; Weese, K. J. Palladium catalyzed telomerization of butadiene with sucrose: A highly efficient approach to novel sucrose ethers. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (26), 4541-4542.
49. Pennequin, I.; Meyer, J.; Suisse, I.; Mortreux, A. A further application of TPPTS in catalysis: Efficient sucrose-butadiene telomerization using palladium catalysts in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1997**, *120* (1-3), 139-142.
50. Desvergnès-Breuil, V.; Pinel, C.; Gallezot, P. Green approach to substituted carbohydrates: telomerisation of butadiene with sucrose. *Green Chem.* **2001**, *3* (4), 175-177.
51. Estrine, B.; Bouquillon, S.; Hénin, F.; Muzart, J. Telomerization of Butadiene with L-Arabinose and D-Xylose in DMF: Selective Formation of their Mono-octadienyl Glycosides. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004* (13), 2914-2922.
52. Mesnager, J.; Quettier, C.; Lambin, A.; Rataboul, F.; Perrard, A.; Pinel, C. Telomerization of butadiene with starch in water: role of the surfactants. *Green Chem.* **2010**, *12* (3), 475-482.
53. Greffe, L.; Bessueille, L.; Bulone, V.; Brumer, H. Synthesis, preliminary characterization, and application of novel surfactants based on highly branched xyloglucan oligosaccharides. *Glycobiology* **2005**, *15* (4), 437.
54. Gorbach, V. I.; Krasikova, I. N.; Luk'yanov, P. A.; Loenko, Y. N.; Solov'eva, T. F.; Ovodov, Y. S.; Deev, V. V.; Pimenov, A. A. New glycolipids (chito-oligosaccharide derivatives) possessing immunostimulating and antitumor activities. *Carbohydrate Research* **1994**, *260* (1), 73-82.

55. Hildreth, J. E. K. N-d-Gluco-N-methylalkanamide compounds, a new class of non-ionic detergents for membrane biochemistry. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 363-366.
56. Latge, P.; Rico, I.; Garelli, R.; Lattes, A. Synthesis of Long-Chain N-Alkylactylamines from Unprotected Lactose A New Series of Nonionic Surfactants. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1991**, *12* (3-4), 227-237.
57. Sorokin, W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 783.
58. Mitts, E.; Hixon, R. M. The reaction of glucose with some amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 483-486.
59. Erickson, J. G. Reactions of long chain amines. V. Reactions with sugars. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2839-2843.
60. Pigman, W.; Cleveland, E. A.; Couch, D. H.; Cleveland, J. H. Reactions of Carbohydrates with Nitrogenous Substances .1. Mutarotations of Some Glycosylamines. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (5), 1976-1979.
61. Lockhoff, O.; Stadler, P. Syntheses of glycosylamides as glycolipid analogs. *Carbohydrate Research* **1998**, *314* (1-2), 13-24.
62. Liu, P.; Zhu, W. Preparation of N-n-Octyl-D-glucamine by the catalytic hydrogenation with palladium complex of MgO-supported melamine-fomaldehyde polymer. *Polymers for advanced technologies* **2004**, *15*, 214-217.
63. Gallas, A.; Hanauer, J. F.; Seitz, H.; Weinelt, F. Manufacture of N-alkylpolyhydroxyalkylamines from monoalkylamines and reducing sugars. US Patent 6365778, Sep 7, 2000.
64. Latge, P.; Rico, I.; Lattes, A.; Godefroy, L. Preparation of N-alkylactylamines as surfactants. Oct 31, 1991.
65. Tripathi, R. P.; Verma, S. S.; Pandey, J.; Tiwari, V. K. ChemInform Abstract: Recent Development on Catalytic Reductive Amination and Applications. *ChemInform* **2009**, *40* (15), no.
66. Garelli-Calvet, R.; Latge, P.; Rico, I.; Lattes, A.; Puget, A. A new surfactant series, the N-alkylamino-1-deoxylactitols: application for extraction of 'op' opiate receptors from frog brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1109* (1), 55-58.
67. Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Synthesis of new sugar-based surfactants having biological applications: key role of their self-association. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, *123-124*, 37-48.

68. Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Prome, D.; Prome, J. C.; Lattes, A. New cationic glycolipids. 1. Synthesis, characterization, and biological activity of double-chain and gemini cationic analogues of galactosylceramide (gal beta(1)cer). *Langmuir* **1999**, *15* (19), 6163-6169.
69. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (12), 2897.
70. Sigma Aldrich . Safety data sheet for sodium cyanoborohydride. 2011.
Ref Type: Catalog
71. Yoon, S. J.; Ikeda, S.; Sadilek, M.; Hakomori, S. i.; Ishida, H.; Kiso, M. Self-recognition of N-linked glycans with multivalent GlcNAc, determined as ceramide mimetic conjugate. *Glycobiology* **2007**, *17* (9), 1007-1014.
72. Chehade, K. A. H.; Andres, D. A.; Morimoto, H.; Spielmann, H. P. Design and Synthesis of a Transferable Farnesyl Pyrophosphate Analogue to Ras by Protein Farnesyltransferase. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (10), 3027-3033.
73. Dalpathado, D. S.; Jiang, H.; Kater, M. A.; Desaire, H. Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *381* (6), 1130-1137.
74. AbdelMagid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (11), 3849-3862.
75. Acmite Market Intelligence *World Surfactant Market*; 2009.
76. Garrett, HR.; Grisham, M. C. Water, pH, and Ionic Equilibria. In *Biochemistry*, 2nd, 2 ed.; 1999.
77. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, *470* (2), 185-201.
78. Balazs, D. A.; Godbey, WT. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery* **2011**, 2011.
79. Hjelmeland, L. M.; Chrambach, A. [16] Solubilization of functional membrane proteins. In *Methods in Enzymology Part C: Enzyme Purification and Related Techniques*, Volume 104 ed.; William, B. J., Ed.; Academic Press: 1984; pp 305-318.
80. Tadros, T.; Editor. *Surfactants Proceedings of a Meeting Held*; Academic Press: 1984.

81. Miller, C. A.; Neogi, P. *Surfactant Science Series, Vol. 17: Interfacial Phenomena: Equilibrium and Dynamic Effects*; Marcel Dekker, Inc.: 1985.
82. Dupuy, C.; Auvray, X.; Petipas, C.; Anthore, R. Small angle X-ray and neutron scattering study of the micellization of (N-alkylamino)-1-deoxylactitols in water. *Langmuir* **1996**, *12* (13), 3162-3172.
83. Auvray, X.; Petipas, C.; Dupuy, C.; Louvet, S.; Anthore, R.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Small-angle X-ray diffraction study of the thermotropic and lyotropic phases of five alkyl cyclic and acyclic disaccharides: Influence of the linkage between the hydrophilic and hydrophobic moieties. *European Physical Journal* **2001**, *4* (4), 489-504.
84. Dupuy, C.; Auvray, X.; Petipas, C.; Anthore, R.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Influence of structure of polar head on the micellization of lactose-based surfactants. Small-angle X-ray and neutron scattering study. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 91-98.
85. Krasteva, N.; Funari, SS.; Brezesinski, G. Mixtures of phospholipids and glycolipids in aqueous dispersions. Unpublished Work, 2012.
86. Dahbi, L.; Arbel-Haddad, M.; Lesieur, P.; Bourgaux, C.; Ollivon, M. A long ripple phase in DLPC-decylglucoside mixture evidenced by synchrotron SAXS coupled to DSC. *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *139* (1), 43-53.
87. Ollivon, M.; Lesieur, S.; Grabielle-Madelmont, C.; Paternostre, M. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, *1508* (1-2), 34-50.
88. Sakai, K.; Tomizawa, H.; Tsuchiya, K.; Ishida, N.; Sakai, H.; Abe, M. Characterizing the structural transition of cationic DPPC liposomes from the approach of TEM, SAXS and AFM measurements. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2008**, *67* (1), 73-78.
89. Takeda, K.; Sano, Y.; Ichikawa, S.; Hirata, Y.; Matsuki, H.; Kaneshina, S. Effect of a Local Anesthetic Lidocaine Hydrochloride on the Bilayer Structure of Phospholipids. *Journal of Oleo Science* **2009**, *58* (7), 369-377.
90. Panicker, L.; Mishra, K. P. Salicylic acid-induced effects in the mixed-lipid (dipalmitoyl phosphatidylcholine-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine) model membrane. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *290* (1), 250-258.
91. Oszlanczi, A.; Bota, A.; Czabai, G.; Klumpp, E. Structural and calorimetric studies of the effect of different aminoglycosides on DPPC liposomes. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, *69* (1), 116-121.

92. Lenne, T.; Garvey, C. J.; Koster, K. L.; Bryant, G. Kinetics of the lamellar gel-fluid transition in phosphatidylcholine membranes in the presence of sugars. *Chemistry and Physics of Lipids* **2010**, *163* (2), 236-242.
93. Kiselev, M. A.; Lesieur, P.; Kiselev, A. M.; Ollivon, M. Ice formation in model biological membranes in the presence of cryoprotectors. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **2000**, *448* (1-2), 255-260.
94. Tokuda, T.; Ikeda, S.; Kubota, Y. Control of plant virus diseases. US4269855, 1982.
95. Davis, R. *La lutte intégrée contre les ennemis des cultures, outil de lutte contre le dépérissement du kava*; 06.
96. Ferguson, B. J.; Mathesius, U. Signaling Interactions During Nodule Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **2003**, *22* (1), 47-72.
97. D'Haese, W.; Holsters, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **2002**, *12* (6), 79-105.
98. Díaz, C. L.; Spink, H. P.; Kijne, J. W. Heterologous Rhizobial Lipochitin Oligosaccharides and Chitin Oligomers Induce Cortical Cell Divisions in Red Clover Roots, Transformed with the Pea Lectin Gene. *The American Phytopathological Society* **2000**, *13* (3), 268-276.
99. Goedhart, J.; Bono, J. J.; Gadella, T. W. J. Rapid Colorimetric Quantification of Lipo-chitooligosaccharides from Mesorhizobium loti and Sinorhizobium meliloti. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2002**, *15* (9), 859-865.
100. Savoure, A.; Kondorosi, E. Analysis of the role of Rhizobium meliloti Nod factors involved in Medicago root nodule organogenesis. 1994.
101. Denarie, J.; Debelle, F.; Prome, J. C. Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65* (1), 503-535.
102. Staehelin, C.; Schultze, M.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. Lipo-chitooligosaccharide Nodulation Signals from Rhizobium meliloti Induce Their Rapid Degradation by the Host Plant Alfalfa. *Plant Physiol.* **1995**, *108* (4), 1607-1614.
103. Nicolaou, K. C.; BOCKOVICH, N. J.; Carcanage, D. R.; HUMMEL, C. W.; EVEN, L. F. Total Synthesis of the NodRm-IV Factors, the Rhizobium Nodulation Signals. *ChemInform* **1993**, *24* (7).
104. Gadella Jr, T. W.; Vereb Jr, G.; Hadri, A. E.; Rohrig, H.; Schmidt, J.; John, M.; Schell, J.; Bisseling, T. Microspectroscopic imaging of nodulation factor-binding sites on

- living *Vicia sativa* roots using a novel bioactive fluorescent nodulation factor. *Biophysical Journal* **1997**, 72 (5), 1986-1996.
105. Heidstra, R.; Geurts, R.; Franssen, H.; Spaink, H. P.; van, K.; Bisseling, T. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **1994**, 105 (3), 787-797.
106. Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Prome, J. C.; Denarie, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **1990**, 344 (6268), 781-784.
107. Spaink, H. P.; Sheeley, D. M.; van, B.; Glushka, J.; York, W. S.; Tak, T.; Geiger, O.; Kennedy, E. P.; Reinhold, V. N.; Lugtenberg, B. J. J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **1991**, 354 (6349), 125-130.
108. Smith, R.; Osburn, R. Lipo-Chitooligosaccharide combination compositions for enhanced plant growth and yield. US WO 2008/085958, 2008.
109. Smith, D.; Prithiviraj, B.; Zhou, X.; Souleimanov, A. Use of lipo-chitooligosaccharides for increasing photosynthesis in plants and corresponding methods and compositions. WO 01/26465 A1, 2000.
110. Dénarié, J.; Cullimore, J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **1993**, 74 (6), 951-954.
111. Soussan, E.; Cassel, S.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I. Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48 (2), 274-288.
112. Hildebrand, G. E.; Harnisch, S. Advanced Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. In *Modern Biopharmaceuticals*, Wiley-VCH Verlag GmbH: 2005; pp 1360-1391.
113. Blanchfield, J. Lipid, Sugar and Liposaccharide Based Delivery Systems 2. *Current Medicinal Chemistry* **2004**.
114. Monsigny, M.; Roche, A. C.; Midoux, P.; Mayer, R. Glycoconjugates as carriers for specific delivery of therapeutic drugs and genes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 14 (1), 1-24.
115. Simon, M. Les membranes cellulaires. *cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/les-membranes-cellulaires* **2012**.

116. Blanzat, M.; Turrin, C. O.; Aubertin, A. M.; Couturier-Vidal, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Dendritic cationic assemblies: In vitro anti-HIV activity of phosphorus-containing dendrimers bearing Gal beta(1)Cer analogues. *ChemBiochem* **2005**, *6* (12), 2207-2213.
117. Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. Sugar-derived tricationic surfactant: Synthesis, self-assembly properties, and hydrophilic probe encapsulation by vesicles. *Langmuir* **2008**, *24* (6), 2326-2330.
118. Beaune, G.; Soussan, E.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I.; Cabuil, V.; Menager, C. Interaction between cationic vesicles and giant magnetic vesicles. *Comptes Rendus Chimie* **2009**, *12* (1-2), 38-44.
119. Muhizi, T.; Coma, V.; Grelier, S. Synthesis and evaluation of N-alkyl-[beta]-D-glucosylamines on the growth of two wood fungi, *Coriolus versicolor* and *Poria placenta*. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (14), 2369-2375.
120. Muhizi, T.; Grelier, S.; Coma, V. Synthesis of N-alkyl-D-glucosylamines and their antimicrobial activity against *Fusarium proliferatum*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria innocua*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (23), 11092-11099.
121. Charon, D.; Chaby, R.; Malinvaud, A.; Mondange, M.; Szabo, L. Chemical synthesis and immunological activities of glycolipids structurally related to lipid A. *Biochemistry* **1985**, *24* (11), 2736-2742.
122. Roeder, D. J.; Lei, M. G.; Morrison, D. C. Endotoxic-lipopolysaccharide-specific binding proteins on lymphoid cells of various animal species: association with endotoxin susceptibility. *Infect. Immun.* **1989**, *57* (4), 1054-1058.
123. Guidetti, B.; Andre-Bares, C.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Soluble analogs of GalCer and suramin as potential inhibitors of HIV-1 infection: Key role of self-association. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1996**, *5* (1), 234-242.
124. Helenius, A.; McCaslin, D. R.; Fries, E.; Tanford, C. Properties of detergents. In *Methods in Enzymology Biomembranes Part G*, Volume 56 ed.; Sidney Fleischer, Lester Packer, Eds.; Academic Press: 1979; pp 734-749.
125. Gouin, S. G.; Pilgrim, W.; Porter, R. K.; Murphy, P. V. Synthesis of a glycolipid for studying mechanisms of mitochondrial uncoupling proteins. *Carbohydrate Research* **2005**, *340* (8), 1547-1552.
126. Fiore, S.; Nicolaou, K. C.; Caulfield, T.; Kataoka, H.; Serhan, C. N. Evaluation of synthetic sphingosine, lysosphingolipids and glycosphingolipids as inhibitors of functional responses of human neutrophils. *Biochem. J.* **1990**, *266*, 25-31.

CHAPITRE II

CHAPITRE II :

Synthèse et caractérisation

de molécules amphiphiles monocaténares

dérivées de

D-glucose et de N-acétyl-D-glucosamine

Sommaire

Introduction	78
I. Stratégie de synthèse	80
II. Accès aux molécules amphiphiles dérivées de D-glucose	87
II.1. Synthèse du <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12).....	87
II.1.1. Préparation du <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC12+).....	87
II.1.2. Préparation du <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12).....	92
II.2. Synthèse des composés <i>N</i> -hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et <i>N</i> -hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16)	100
II.2.1. Protocole de synthèse	100
II.2.2. Caractérisations structurales des <i>N</i> -hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol et <i>N</i> -hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate et neutre	101
II.3. Conclusion sur la synthèse des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose en C6, C12 et C16	109
III. Accès aux molécules amphiphiles dérivées de N-acétyl-D-glucosamine.....	111
III.1. Application de la méthode d'amination réductrice décrite par Tokuda et coll. au couple <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine/ dodécylamine	111
III.2. Réaction d'amination réductrice entre la <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine et les alkylamines en C6, C12, et C16 sans traitement en milieu acide.....	117
III.3. Bilan	120
Conclusion	122
Partie expérimentale	124
Références bibliographiques	135

Introduction

Ce chapitre sera consacré à la synthèse et à la caractérisation structurale de molécules amphiphiles monocaténares modèles dérivées de D-glucose et de N-acétyl-D-glucosamine, deux monosaccharides réducteurs représentés sur la Figure 1.

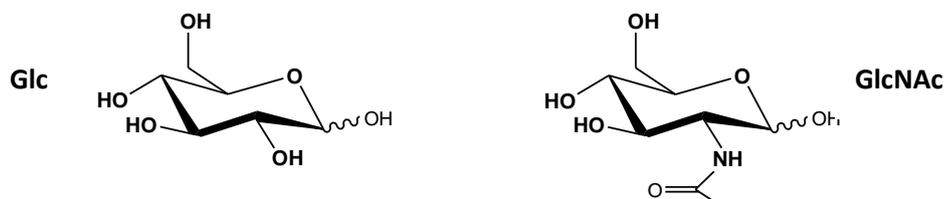


Figure 1: Structures chimiques du D-glucose (Glc) et de la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc)

La littérature rapporte la synthèse de nombreuses molécules amphiphiles à partir de ces précurseurs saccharidiques^{1,2}. La présence de plusieurs groupes hydroxyles sur le saccharide ainsi que celle éventuelle de groupements spécifiques (amine, acide carboxylique) et l'existence de la fonction aldéhyde au niveau de la position anomère pour les sucres dits réducteurs, multiplie les possibilités de greffage d'une chaîne hydrophobe par des voies de synthèse nécessitant dans certains cas des étapes de protection et de déprotection (Chapitre I, II.). Dans nos travaux, les molécules amphiphiles seront synthétisées par une réaction d'amination réductrice d'une alkylamine sur le monosaccharide (Figure 2). La fonction aldéhyde au niveau de la position anomère du monosaccharide sera ainsi utilisée pour le greffage régiosélectif de la chaîne hydrophobe. Différentes alkylamines seront utilisées dont la chaîne contiendra 6, 12 ou 16 atomes de carbones. Cette méthode de synthèse ne nécessitant pas de réaction de protection/déprotection, permettra de greffer régiosélectivement l'alkylamine sur le carbone anomère du saccharide (Chapitre I, II.7.).



	$R_1 \backslash R$	C_6H_{13}	$C_{12}H_{25}$	$C_{16}H_{33}$
Dérivés de Glc	OH	GlcC6	GlcC12	GlcC16
Dérivés de GlcNAc	NHCOCH ₃	GlcNAcC6	GlcNAcC12	GlcNAcC16

Figure 2: Synthèse des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose (GlcCX) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAcCX). La chaîne hydrophobe est une alkylamine possédant X atomes de carbone (6, 12 ou 16).

Ce chapitre sera divisé en trois parties. La première partie sera consacrée à la présentation de la stratégie de synthèse en deux étapes utilisée pour obtenir les molécules amphiphiles. La deuxième partie décrira quant à elle la synthèse des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose, et possédant une chaîne alkylamine à 6, 12 ou 16 atomes de carbone. Une méthode de purification par traitement en milieu acide sera présentée. La troisième partie concernera l'accès aux molécules amphiphiles dérivées de la N-acétyl-D-glucosamine selon une méthode de synthèse analogue. En premier lieu, le traitement en milieu acide sera utilisé sur le composé ayant une chaîne alkylamine à 12 atomes de carbone. En second lieu, la synthèse des composés dérivés de N-acétyl-D-glucosamine, et possédant une chaîne alkylamine à 6, 12 ou 16 atomes de carbone, sera réalisée sans utilisation du traitement en milieu acide.

I. Stratégie de synthèse

En solution aqueuse, les monosaccharides réducteurs tels que le D-glucose, sont présents sous plusieurs formes tautomères : l'une est la forme linéaire avec la présence d'une fonction aldéhyde, et les deux autres sont des formes cycliques composées de deux anomères α et β . Par exemple, en solution aqueuse, le glucose est présent sous forme linéaire (< 0.1 %) et sous forme cyclique (environ 35% sous forme α et environ 65 % sous forme β). Le passage d'une forme anomère à une autre (β -D-glucopyranose \Leftrightarrow D-glucose linéaire \Leftrightarrow α -D-glucopyranose) par ouverture du D-glucose puis héli-acétalisation intramoléculaire est appelé « mutarotation » (Figure 3).

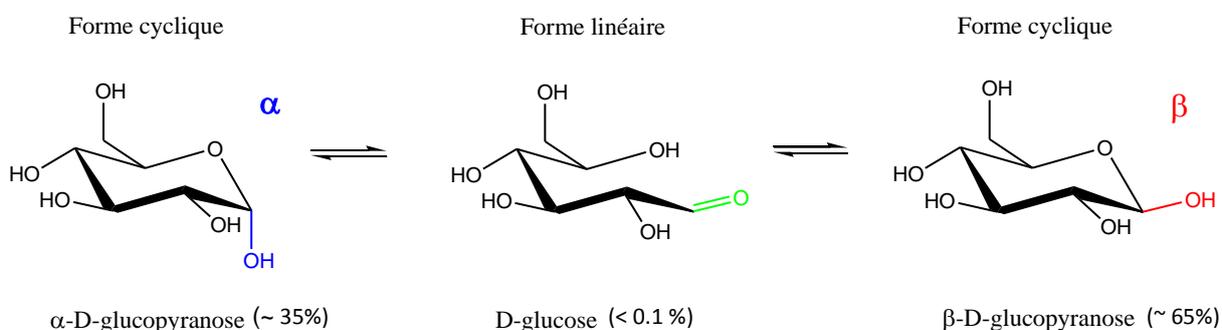


Figure 3 : Réaction de mutarotation du D-glucose en solution aqueuse

En présence d'un réactif chimique de la fonction aldéhyde, le déplacement de l'équilibre est rapide et permet d'avoir un mélange qui se comporte en apparence comme s'il n'était composé que de la forme ouverte (linéaire)³. La voie de synthèse par amination réductrice que nous avons considéré dans ce travail a consisté à tirer profit de la réactivité spécifique du groupe aldéhyde présent sur la forme linéaire du monosaccharide vis-à-vis du caractère nucléophile de la fonction amine présente en bout de la chaîne hydrophobe. Ainsi le greffage de la chaîne alkylamine sera régiosélectif au niveau du carbone anomère du monosaccharide.

Le mécanisme de synthèse d'un glycolipide par amination réductrice a été abondamment décrit dans la littérature^{4,5}. La réaction peut être décrite par deux étapes. Dans une première étape, lorsque l'alkylamine est mise en solution avec le monosaccharide, le doublet électronique libre de l'azote de la fonction amine va attaquer le carbone électrophile de la fonction aldéhyde, et permettre la formation d'un produit intermédiaire de type aminoalcool. Ce produit va se déshydrater spontanément pour former une imine, appelée aussi « base de Schiff », qui est en équilibre avec le composé cyclique correspondant, de la famille des *N*-alkylglycosylamines (Figure 4).

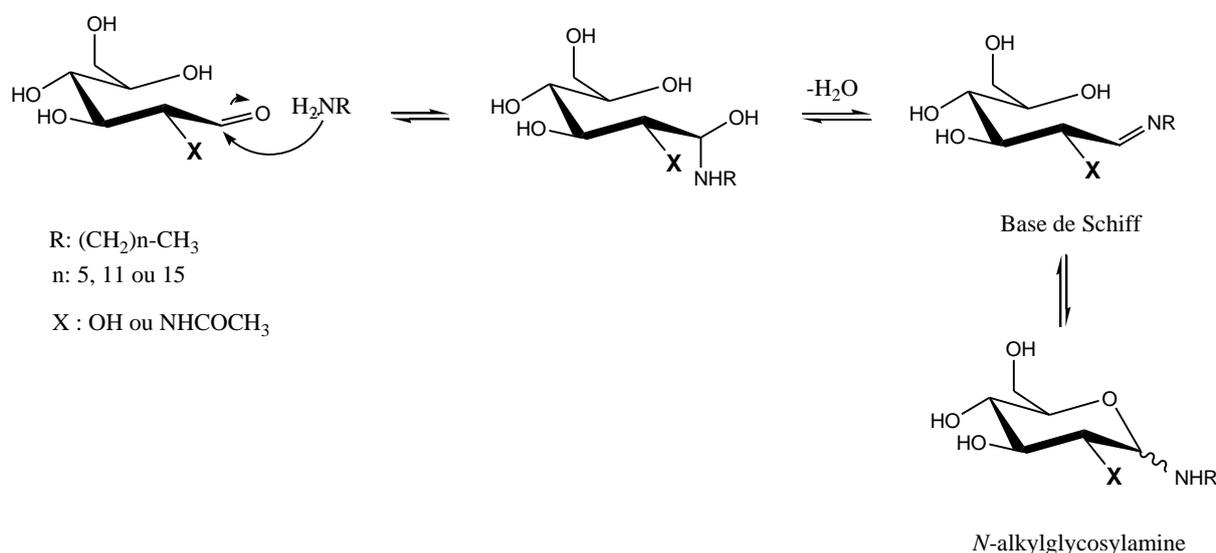


Figure 4: Première étape du mécanisme de synthèse d'une molécule amphiphile par amination réductrice : obtention des dérivés *N*-alkylglycosylamines (adapté de^{4,5}).

Or, les *N*-alkylglycosylamines peuvent facilement s'hydrolyser en milieu aqueux. En effet, le composé cyclique formé peut s'ouvrir pour redonner l'intermédiaire imine qui, en présence d'eau, peut évoluer vers le produit d'hydrolyse. C'est pourquoi, dans une deuxième étape, la réduction des *N*-alkylglucosylamines par un agent réducteur, comme le borohydrure de sodium (NaBH_4), va permettre d'accéder aux dérivés *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols, qui sont des composés stables en milieu aqueux (Figure 5). La réaction en deux étapes est nécessaire étant donné que l'agent réducteur NaBH_4 n'est pas sélectif de la fonction imine et que la fonction aldéhyde du monosaccharide peut également être réduite⁶.

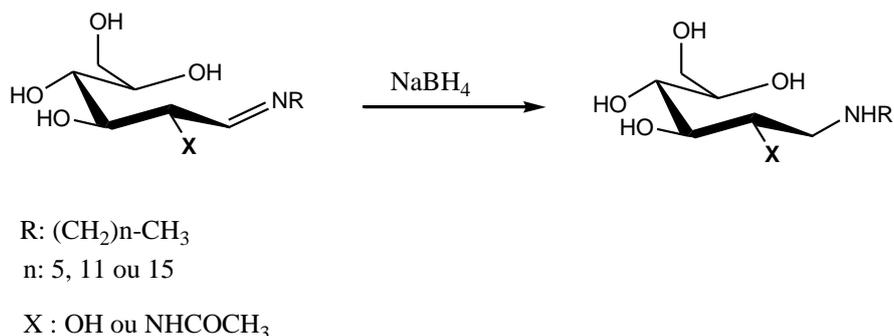


Figure 5: Deuxième étape du mécanisme de synthèse d'une molécule amphiphile par amination réductrice : obtention des dérivés N-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols

Dans la littérature, trois publications font état de la synthèse de N-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols par une réaction d'amination réductrice à partir du D-glucose^{7,7-9}. Notons qu'aucune ne fait état de la synthèse de N-alkyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitols à partir de la N-acétyl-D-glucosamine.

Dans la première publication qui date de 1982, Tokuda et coll.⁷ ont décrit la mise au point d'un protocole de synthèse de N-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols. Ils décrivent en particulier la synthèse de molécules amphiphiles avec une tête polaire D-glucose et une chaîne hydrophobe alkylamine dont la longueur varie de 3 à 18 atomes de carbone. Par exemple, pour synthétiser le N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol, la solubilisation du D-glucose et de la dodécylamine (rapport molaire dodécylamine/D-glucose 1 : 1) dans du méthanol a été réalisée par chauffage à reflux jusqu'à dissolution complète du monosaccharide. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur, le borohydrure de sodium (NaBH_4 , rapport molaire $\text{NaBH}_4/\text{D-glucose}$ 2 : 1) a été ajouté à la solution, qui a ensuite été chauffée à reflux pendant 30 minutes. Le solvant a été évaporé et une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) a été ajoutée au résidu puis évaporée. Afin d'éliminer complètement les résidus de bore, cette opération a été répétée trois fois, puis le produit obtenu sous forme chlorhydrate a été recristallisé dans le méthanol. Ce produit a ensuite été mis en solution dans l'eau puis une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 30 % (v/v) a été ajoutée et un dépôt de cristaux fut formé. Après filtration et lavage à l'eau, les cristaux ont été recristallisés dans le méthanol. Le rendement molaire final de 52% a été obtenu pour le N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol et la présence de ce composé fut

confirmée par analyse élémentaire. Les rendements obtenus pour les molécules amphiphiles ayant des longueurs de chaîne différentes ne sont pas donnés dans ces travaux.

La deuxième publication parut en 1995. Van Doren et coll.⁸ ont synthétisé des *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols avec une tête polaire D-glucose et une chaîne hydrophobe alkylamine dont la longueur varie de 1 à 16 atomes de carbone (1, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16), en utilisant un protocole proche de celui de Tokuda et coll.⁷. Cependant, les auteurs ont réalisé la synthèse entre le D-glucose et l'alkylamine (rapport molaire alkylamine/ D-glucose 1 :1) à température ambiante pendant 24h et non pas à reflux. De plus, l'agent réducteur NaBH₄ a été ajouté en quantité équimolaire par rapport au D-glucose et la solution n'a pas été chauffée à reflux. Le mélange fut acidifié par addition de HCl concentré pour atteindre un pH de 2-3 afin d'hydrolyser les résidus de bore. Le précipité obtenu a été filtré et lavé avec de l'eau glacée et de l'éthanol froid. Après séchage, le produit fut mis en solution dans le méthanol avec un léger excès d'hydroxyde de sodium et cette solution fut chauffée à reflux jusqu'à obtenir une solution claire. Le précipité formé au refroidissement a été filtré et lavé à l'eau et à l'éthanol froid. Après recristallisation dans l'éthanol, des rendements molaires de 60 à 90% ont été obtenus. Même si les rendements obtenus sont supérieurs à ceux de Tokuda et coll.⁷ pour le composé ayant une chaîne à 12 atomes de carbone, aucune caractérisation des produits obtenus n'a pas été décrite.

La troisième publication a été publiée en 2009 par Ramsch et coll.⁹. Ils ont réalisé la synthèse du *N*-octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol en utilisant un protocole proche de celui de Van Doren et coll.⁸. Cependant, la température et le temps de chauffage dans le méthanol ont été modifiés. Après agitation pendant 24 heures à température ambiante, la solution fut chauffée pendant 30 minutes à 60°C. Le réducteur NaBH₄ a été ajouté en plus grande quantité (rapport molaire NaBH₄/D-glucose 2 : 1) et cette solution fut agitée pendant 24 heures à température ambiante puis chauffée pendant trente minutes à 60°C. La suite du protocole est similaire à celui de Van Doren et coll.⁸. Après deux recristallisations dans l'éthanol, le *N*-octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol fut obtenu avec un rendement molaire de 30%. Le produit a été caractérisé par RMN ¹H et ¹³C et par analyse élémentaire.

Les trois méthodes de synthèses précédemment décrites ont été résumées dans le Tableau 1 ci-dessous afin de mettre en évidence les différences observées entre les

paramètres expérimentaux, les techniques de caractérisation et les rendements de réactions.

Tableau 1: Comparaisons des trois méthodes de synthèses de *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols décrites par Tokuda et coll.⁷, Van Doren et coll.⁸ et Ramsch et coll.⁹. (Les équivalences molaires sont par rapport au monosaccharide)

Synthèse décrite par :	Tokuda et coll. ⁷	Van Doren et coll. ⁸	Ramsch et coll. ⁹
Produits de départ	dodécylamine (1.1 éq.mol.)	D-glucose alkylamine (1.1 éq.mol.)	octylamine (1.1 éq.mol.)
Chauffage dans le méthanol	2 h à reflux	24 h à T _{amb}	24 h à T _{amb} et 30 min à 60°C
Réduction avec NaBH ₄	1:2 éq.mol. T _{amb} + 30 min à reflux	1:1 éq.mol. T _{amb}	1:2 éq.mol. T _{amb} + 30 min à 60°C
Purification	Lavages avec HCl 10% dans méthanol et recristallisation	Ajout de HCl concentré jusqu'à pH 2-3 Précipité lavé à l'eau et à l'éthanol froid	
Mise en solution	NaOH 30% (v/v) dans H ₂ O	Méthanol et excès de NaOH	
Précipité	Lavé à l'eau	Lavé à l'eau et à l'éthanol froid	
Recristallisation	Méthanol	Ethanol	
Rendements molaires	52 %	60-90 %	30%
Caractérisation	Analyse élémentaire Point de fusion	Aucune	RMN ¹ H et ¹³ C Analyse élémentaire

Ces trois voies de synthèse sont intéressantes car elles ont permis d'obtenir les *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols attendus. La voie de synthèse décrite par Tokuda et coll.⁷ semble efficace car le *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol a été obtenu avec un rendement molaire satisfaisant (52%) et le composé a pu être caractérisé par analyse élémentaire. Concernant les travaux de Van Doren et coll.⁸, même si les composés ont été obtenus avec un rendement très satisfaisant (60-90%) aucune caractérisation n'a été présentée (ces

composés étant dans leur cas considérés comme des intermédiaires dans la synthèse d'autres produits). Ramsch et coll.⁹ ont quant à eux réalisé la caractérisation du N-octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (rendement molaire égal à 30 %), par RMN ¹H et RMN ¹³C et analyse élémentaire.

D'après l'étude de ces trois publications, nous avons choisi de synthétiser et de purifier les molécules amphiphiles dérivées du D-glucose envisagés dans cette thèse par la méthode de Tokuda et coll.⁷. Ensuite, cette méthode sera adaptée aux molécules amphiphiles dérivées de GlcNAc. Tout comme Ramsch et coll.⁹, nous caractériserons les molécules amphiphiles obtenues par RMN ¹H et RMN ¹³C et analyse élémentaire. De plus, nous disposerons d'une technique complémentaire d'analyse par spectrométrie de masse.

Le schéma réactionnel présenté dans la Figure 6 illustre la voie de synthèse envisagée. Dans un premier temps, la réaction permettant le greffage de l'alkylamine sur le monosaccharide est effectuée dans le méthanol à chaud (T = 65°C) et la réduction sera réalisée en présence de l'agent réducteur NaBH₄. Après évaporation des solvants et séchage du produit sous pression réduite, un brut réactionnel sera obtenu (Figure 6a). Le traitement de ce dernier en milieu acide permettra d'obtenir la forme chlorhydrate de ce composé (Figure 6b), puis celui-ci sera neutralisé pour conduire à la molécule amphiphile purifiée (Figure 6c).

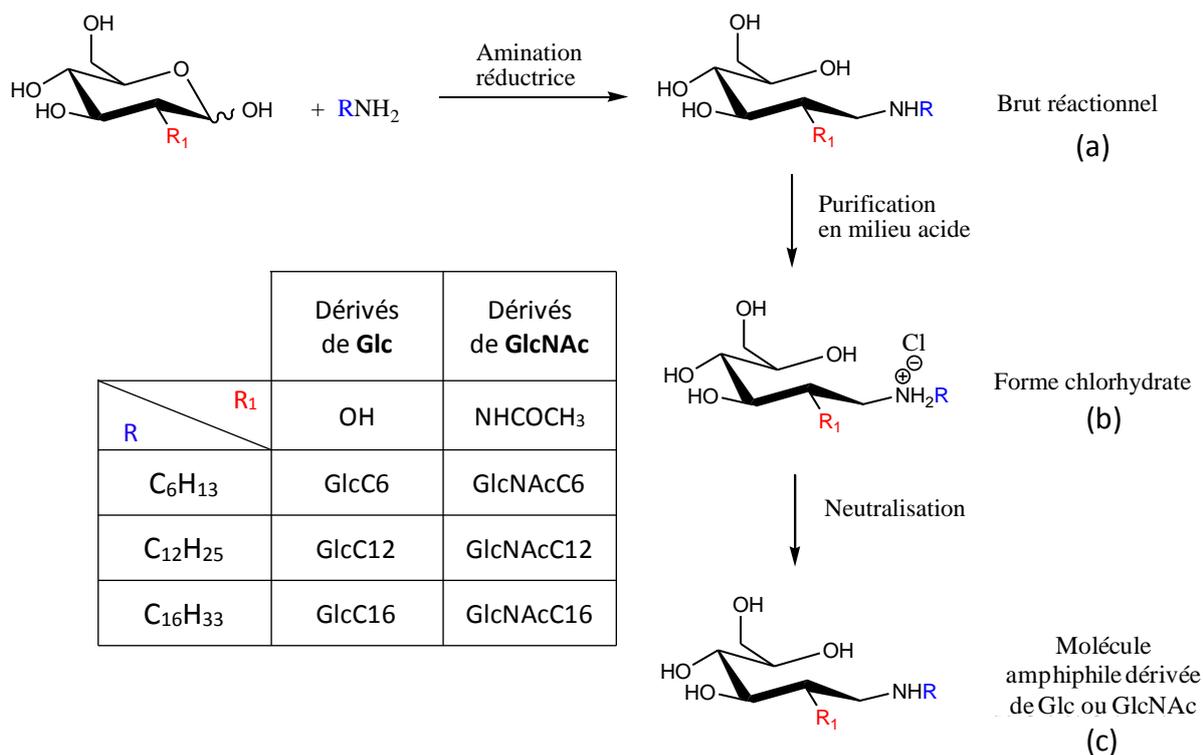


Figure 6: Stratégie de synthèse en deux étapes des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose (GlcCX) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAcCX). La chaîne hydrophobe est une alkylamine possédant 6, 12 ou 16 atomes de carbone

II. Accès aux molécules amphiphiles dérivées de D-glucose

II.1. Synthèse du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)

La voie de synthèse qui a été utilisée dans cette étude est analogue à celle décrite par Tokuda et coll.⁷. Les résultats obtenus sont discutés en deux parties. L'une présente l'accès au composé N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC12+) et l'autre partie présente l'accès au composé N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12) sous forme neutre.

II.1.1. Préparation du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC12+)

Le N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate a été synthétisé à partir du D-glucose et de la dodécylamine selon le schéma réactionnel décrit dans la Figure 7.

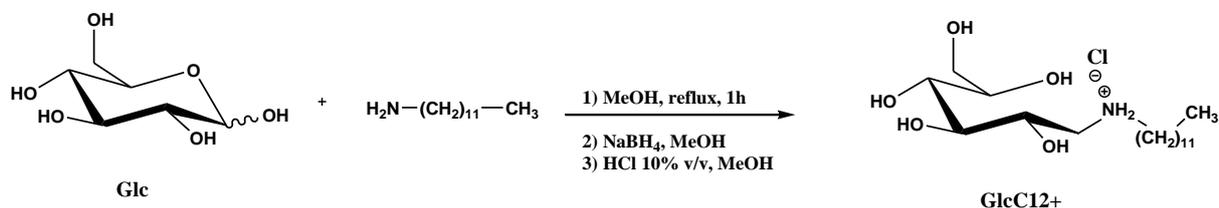


Figure 7 : Schéma réactionnel de la synthèse du composé N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous sa forme chlorhydrate (GlcC12+) à partir du D-glucose

Dans cette synthèse, le D-glucose et la dodécylamine ont été chauffés à reflux dans le méthanol pendant 1 heure. La dodécylamine a été ajoutée en excès (1.1 éq. mol. par rapport au monosaccharide) afin de s'assurer du greffage total du monosaccharide. La solution a ensuite été refroidie jusqu'à température ambiante et l'agent réducteur NaBH₄ a été ajouté en excès (1 :2 éq. mol. par rapport au monosaccharide). Après la complète addition de NaBH₄, la solution fut chauffée à reflux pendant 30 minutes. Ensuite, le solvant a été évaporé et une solution méthanolique d'HCl à 10% (v/v) fut ajoutée au résidu, afin d'éliminer complètement les résidus de bore. Cette opération a été répétée trois fois, puis le

produit obtenu a été recristallisé dans le méthanol et séché sous vide. Le composé GlcC12+ a été isolé sous forme de poudre avec un rendement molaire de 92%.

Le composé ainsi obtenu a été analysé par spectroscopie RMN ^1H dans CD_3OD . Le spectre RMN ^1H correspondant (Figure 8) met en évidence la présence de la chaîne alkyle en C12, caractérisée par deux multiplets à 1.3 et 1.7 ppm, attribués respectivement aux protons $\text{H}2'$ et $\text{H}3'$ jusqu'à $\text{H}11'$, ainsi que par un triplet à 0.9 ppm correspondant aux trois protons $\text{H}12'$ du groupement méthyle présent à l'extrémité de la chaîne alkyle. Le spectre montre également la présence de deux multiplets à 3.2 et 3.0 ppm correspondant respectivement aux protons $\text{H}1$ du sucre et $\text{H}1'$ de la chaîne alkyle en α du groupe NH . On peut remarquer qu'aucun signal à 2.9 ppm caractéristique du proton $\text{H}1'$ en α de la fonction amine de la dodécylamine n'est observé dans ce spectre, permettant de conclure qu'aucune trace de dodécylamine résiduelle n'est présente dans l'échantillon analysé. (cf spectre RMN ^1H de la dodécylamine donné en Annexe 1).

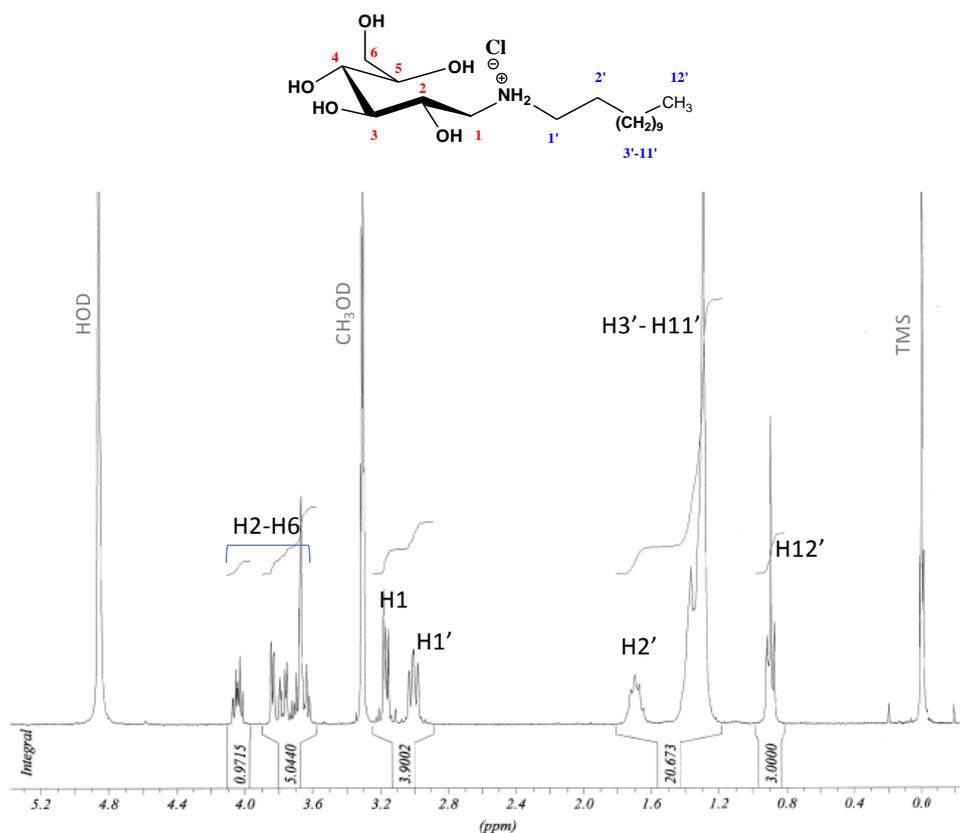


Figure 8: Spectre RMN ^1H à 300 MHz du composé GlcC12+ dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm ; $\delta_{\text{HOD}} = 4.85$ ppm)

L'attribution précise des différents signaux présents dans ce spectre a été possible en considérant les résultats d'analyses par spectroscopie RMN 2D ^1H - ^1H COSY (Figure 9). Outre l'attribution des différents signaux correspondant aux protons de la chaîne alkyle, cette technique a été particulièrement utile pour déterminer les différents signaux caractéristiques des protons de la partie sucre, notamment entre 4.1 et 3.6 ppm, comme le montre plus précisément la figure 9b.

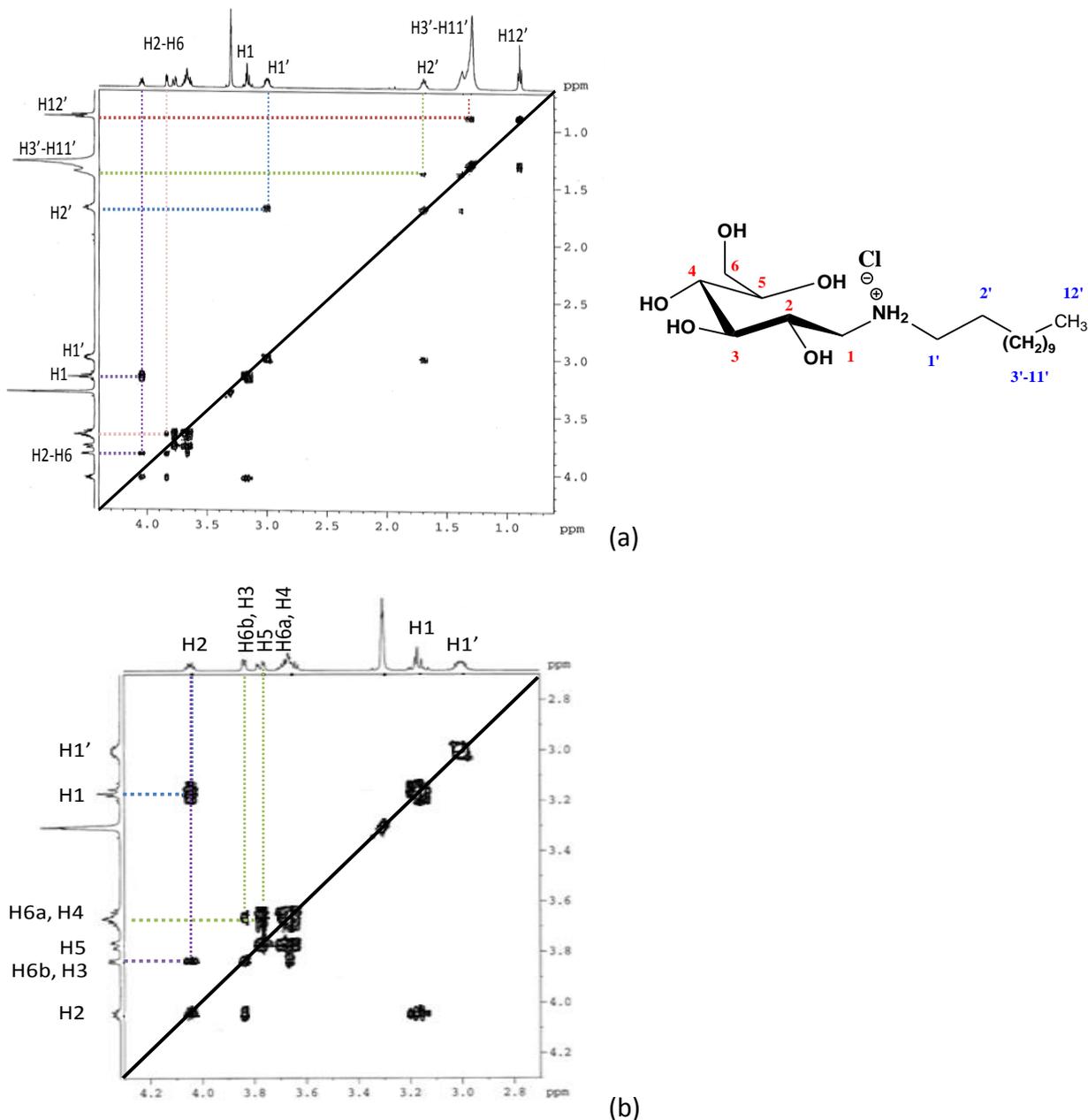


Figure 9: (a) Spectre RMN 2D ^1H – ^1H COSY à 500 MHz du composé Glc12+ dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm). (b) agrandissement du spectre dans la région de 2.8 à 4.2 ppm.

Les informations relatives à la caractérisation structurale du composé GlcC12+ ainsi obtenues par les analyses de RMN ^1H et 2D ^1H - ^1H COSY ont été corroborées avec les analyses de RMN ^{13}C et DEPT 135, respectivement détaillées dans les figures 10a et 10b.

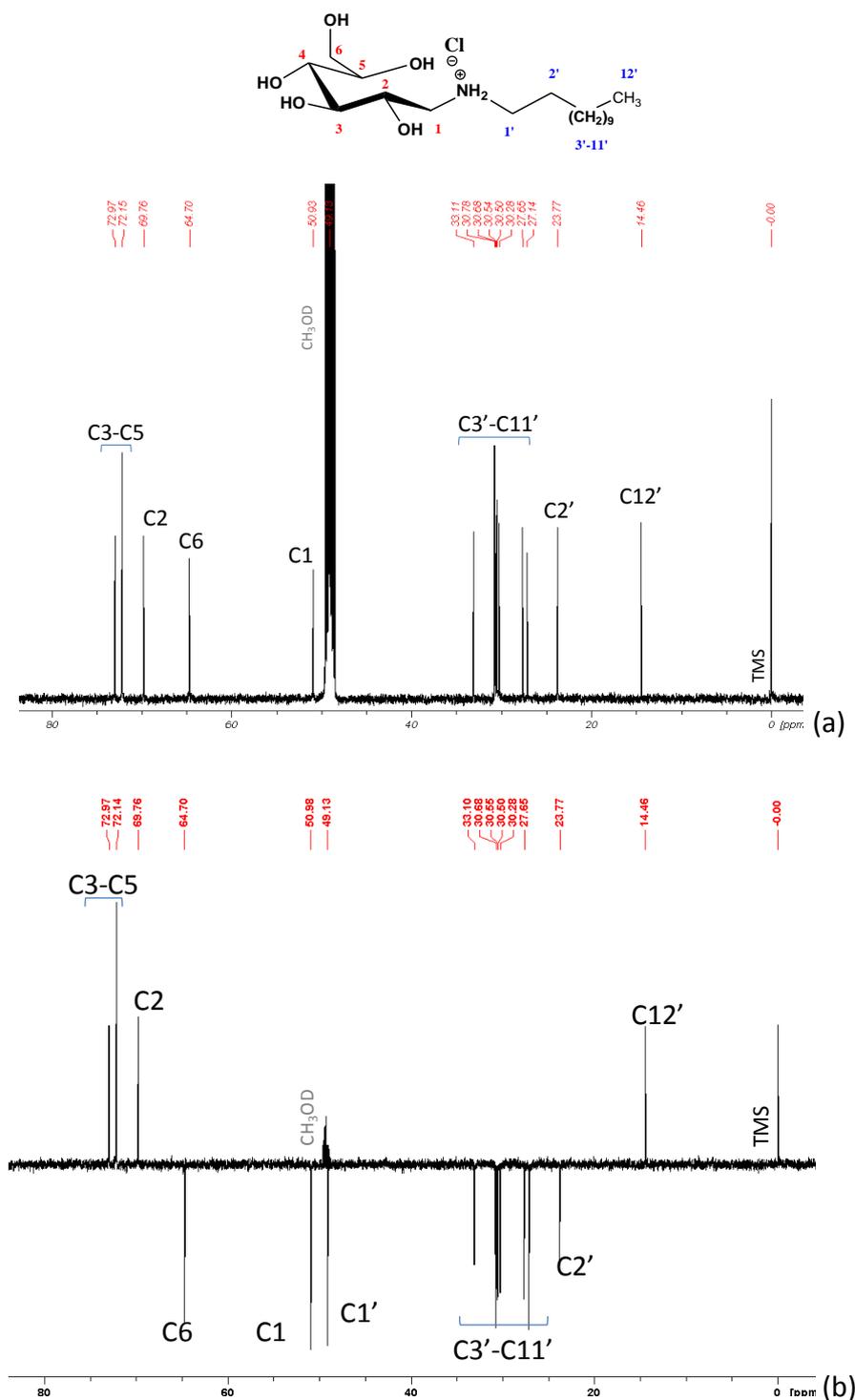


Figure 10: Spectres RMN ^{13}C (a) et DEPT 135 (b) à 75 MHz du composé GlcC12+ dans CD $_3$ OD ($\delta = 49.3$ ppm)

Ainsi, sur les spectres de RMN ^{13}C et DEPT 135, on peut distinguer trois grandes régions de signaux: la première région entre 80 et 60 ppm correspond aux signaux des carbones C2 à C6 du sucre ; la deuxième région autour de 50 ppm correspond aux signaux des deux carbones C1 et C1' liés à l'atome d'azote et enfin, la troisième région entre 35 et 10 ppm correspond aux signaux des carbones C2' à C12' de la chaîne alkyle. En ce qui concerne plus précisément le signal du carbone C1' à 49.1 ppm, on peut remarquer qu'il est masqué en RMN ^{13}C par le signal dû au solvant CD_3OD à 49.3 ppm (figure 10a). Sa position a pu être clairement mise en évidence à l'aide du spectre DEPT 135 (figure 10b) et son attribution par des analyses de corrélation proton/carbone (RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC) présentées dans la figure 11. Ces analyses de RMN 2D ^1H - ^{13}C ont également permis d'attribuer précisément les différents signaux de la partie sucre ainsi que d'autres signaux caractéristiques de la chaîne alkyle.

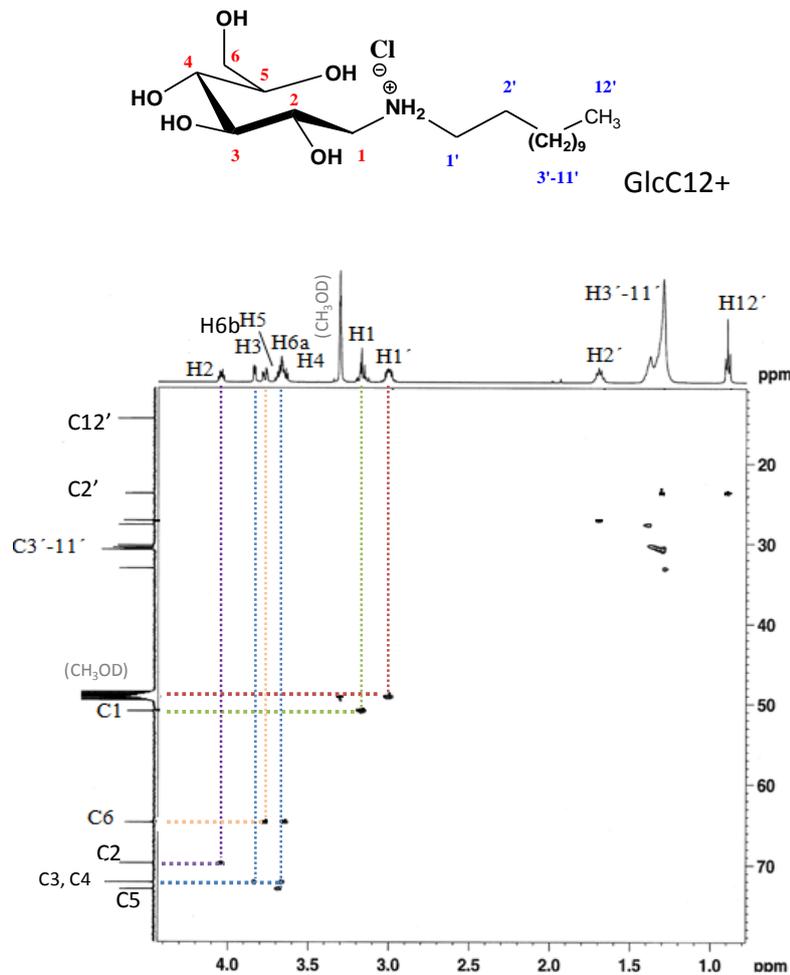


Figure 11: Spectre RMN 2D ^1H – ^{13}C HSQC à 500 MHz du composé GlcC12+ dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm)

L'analyse du composé par spectrométrie de masse ESI montre la présence d'un seul pic à 350.3 m/z correspondant à l'ion $[(\text{GlcC12}) + \text{H}]^+$ (Figure 12). Ce résultat confirme non seulement la structure attendue du composé, mais met également en évidence qu'aucune impureté organique n'est présente dans cet échantillon.

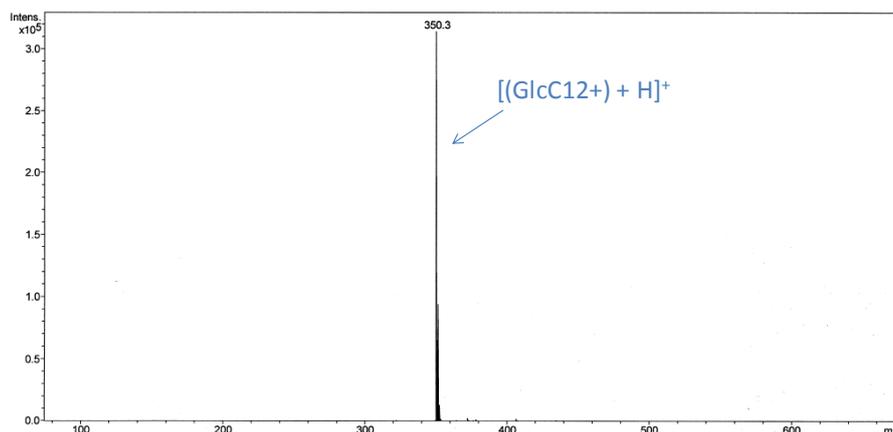


Figure 12: Spectre de masse ESI en mode positif du GlcC12+ (M = 349.5 g/mol)

Les différentes analyses réalisées par spectroscopie de RMN et spectrométrie de masse ont ainsi permis de caractériser précisément la structure du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate. Ce produit a été obtenu avec un très bon rendement par amination réductrice du D-glucose avec la dodécylamine suivie d'un traitement en milieu hydroalcoolique acide selon la méthode décrite par Tokuda et coll.⁷.

II.1.2. Préparation du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)

La deuxième partie de la voie de synthèse du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol s'intéresse à la neutralisation basique de sa forme chlorhydrate précédemment préparée (GlcC12+), comme illustré par le schéma réactionnel de la figure 13.

Pour cela, le protocole à consister à additionner un léger excès d'hydroxyde de sodium à une solution aqueuse du composé GlcC12+, à température ambiante. Cet ajout

entraîne la précipitation quasi instantanée du composé. Le précipité ainsi formé a été recueilli après une étape de filtration couplée à des lavages à l'eau. Finalement, le composé GlcC12 a été obtenu sous forme de poudre après recristallisation dans le méthanol, avec un rendement molaire de 75 %. Le rendement molaire d'obtention du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sur l'ensemble de la synthèse est ainsi de 70%.

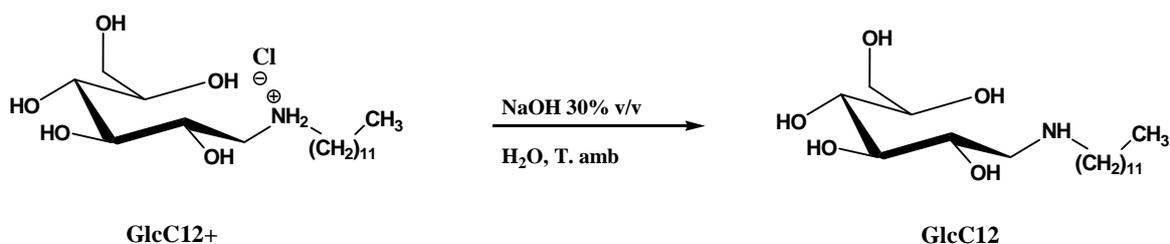


Figure 13: Schéma réactionnel de la synthèse du composé GlcC12 par neutralisation basique de sa forme chlorhydrate (GlcC12+)

Le composé GlcC12 a été analysé par spectroscopie RMN ^1H (Figure 14). Comme on pouvait s'y attendre, le spectre obtenu présente d'un point de vue général de fortes similitudes avec le spectre RMN ^1H de sa forme chlorhydrate GlcC12+ (Figure 9). On retrouve en effet les trois régions de signaux, correspondant aux protons H2 à H6 du sucre entre 4.0 et 3.6 ppm, aux deux protons en α du groupe NH entre 3.2 et 2.7 ppm et enfin aux protons H2' à H12' de la chaîne alkyle entre 1.5 et 0.9 ppm.

Cependant, une analyse plus fine permet de mettre en évidence des différences de déplacements chimiques pour les protons proches voisins du groupe NH, en particulier pour les protons en α (H1 et H1') et dans une moindre mesure pour ceux en β (H2 et H2'). Ceci est clairement illustré par les données du tableau 2. On peut ainsi observer que le passage de la forme chlorhydrate (GlcC12+) à la forme neutre (GlcC12) du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol s'accompagne d'un déplacement vers les champs forts (blindage), respectivement de 0.41 et 0.36 ppm pour les protons H1 et H1'. Alors que dans le cas des protons H2 et H2', ce déplacement vers les champs forts est déjà moins significatif avec des valeurs respectives de 0.17 et 0.19 ppm. Cette variation observée est certainement liée à la différence de densité électronique de l'atome d'azote entre la forme chlorhydrate (GlcC12+) caractérisée par un

atome d'azote en déficit d'électron et la forme neutre (Glc12) caractérisée par un atome d'azote possédant un doublet d'électrons libre).

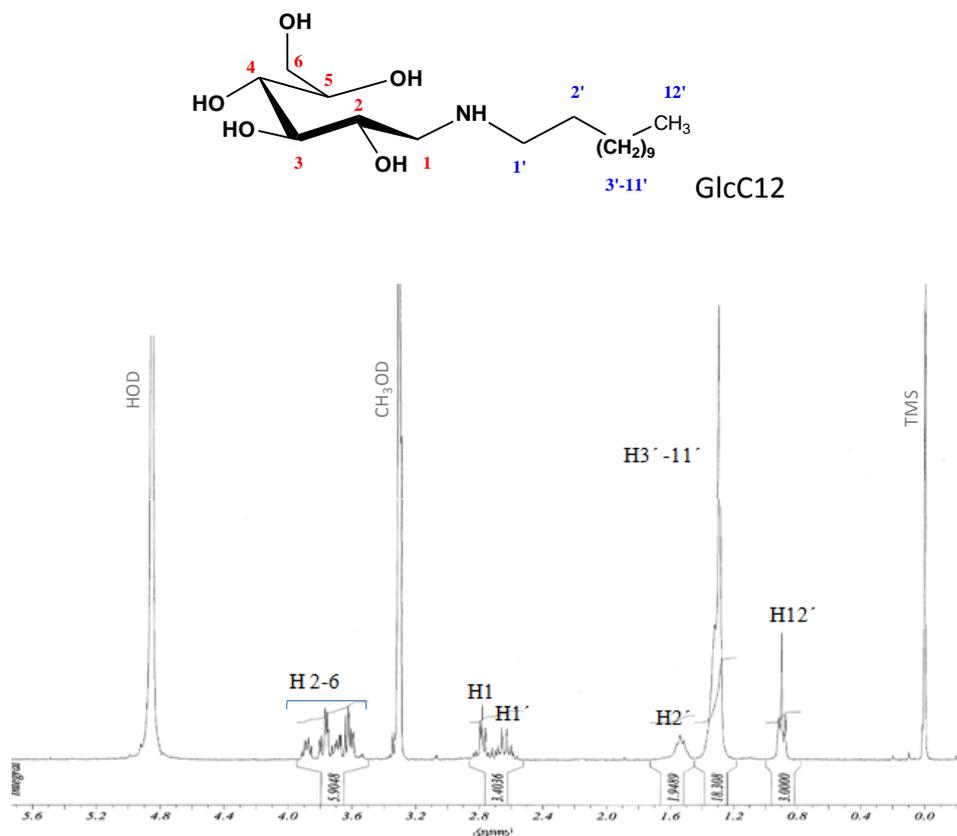


Figure 14: Spectre RMN ^1H à 300 MHz du composé Glc12 dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm)

Tableau 2: Déplacements chimiques des protons H1, H2, H1' et H2' du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcNC12+) et neutre (GlcNC12).

Protons	δ_{Glc12^+} (ppm)	δ_{Glc12} (ppm)	$\Delta [\delta_{\text{Glc12}^+} - \delta_{\text{Glc12}}]$ (ppm)
H1	3.16	2.75	+ 0.41
H1'	3.01	2.65	+ 0.36
H2	4.05	3.88	+ 0.17
H2'	1.71	1.52	+ 0.19

Notons que, comme dans le cas du composé Glc12+ (cf paragraphe II.1.1), l'attribution des différents signaux du spectre RMN ^1H du composé Glc12, à savoir les protons de la partie saccharide et la chaîne alkyle, a pu être possible par l'analyse du spectre RMN 2D COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, détaillé dans la Figure 15.

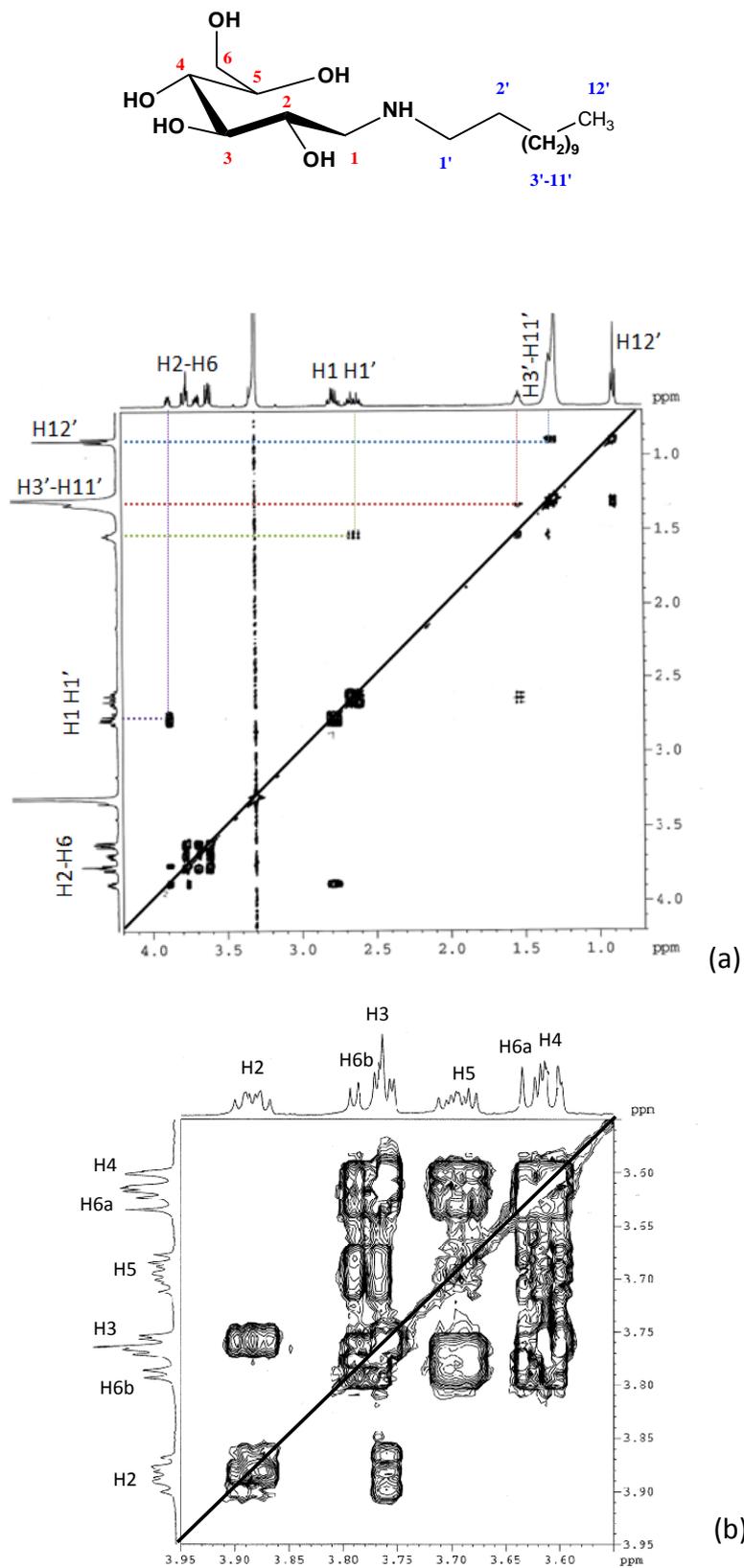
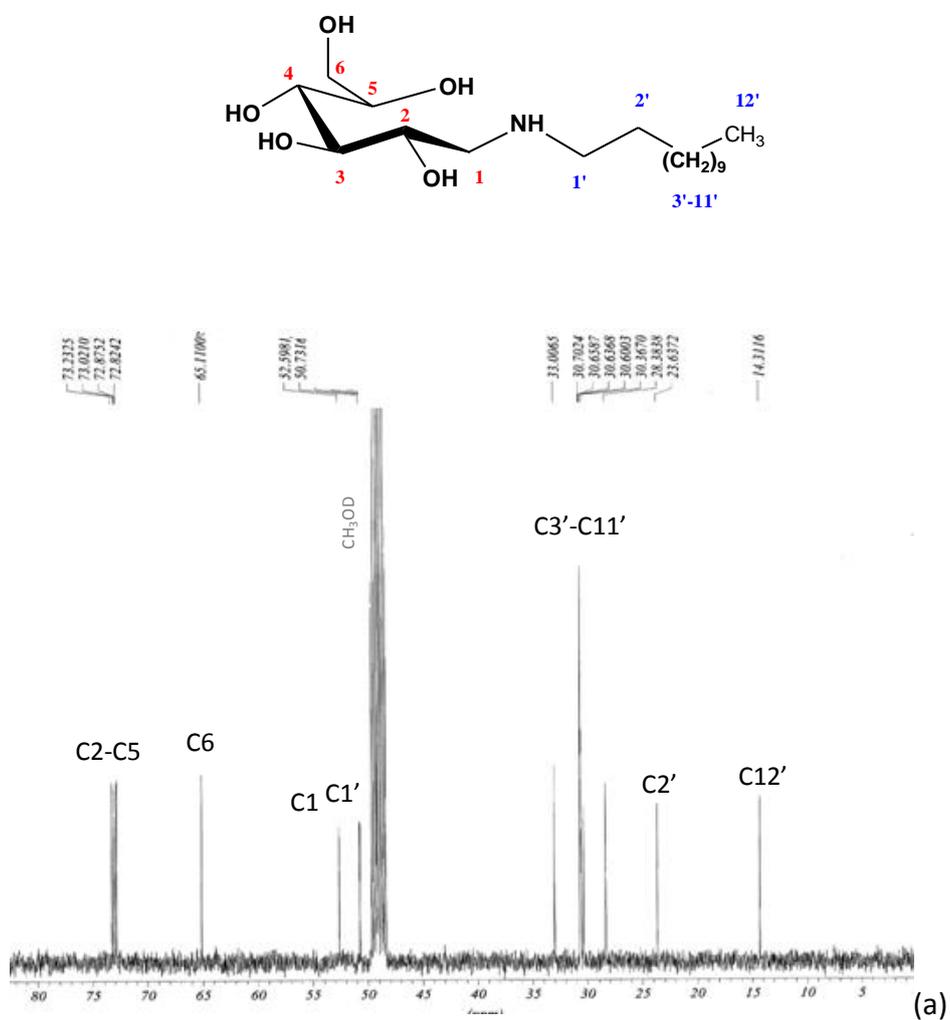


Figure 15: (a) Spectre RMN 2D $^1\text{H} - ^1\text{H}$ à 500 MHz du composé GlcC12 dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm), (b) agrandissement du spectre dans la région de 3.40 à 3.95 ppm.

En ce qui concerne l'analyse du composé GlcC12 par spectroscopies RMN ^{13}C et DEPT135, les spectres obtenus (Figure 16) présentent également de fortes similitudes avec ceux de sa forme chlorhydrate (GlcC12+) donné dans la Figure 11.



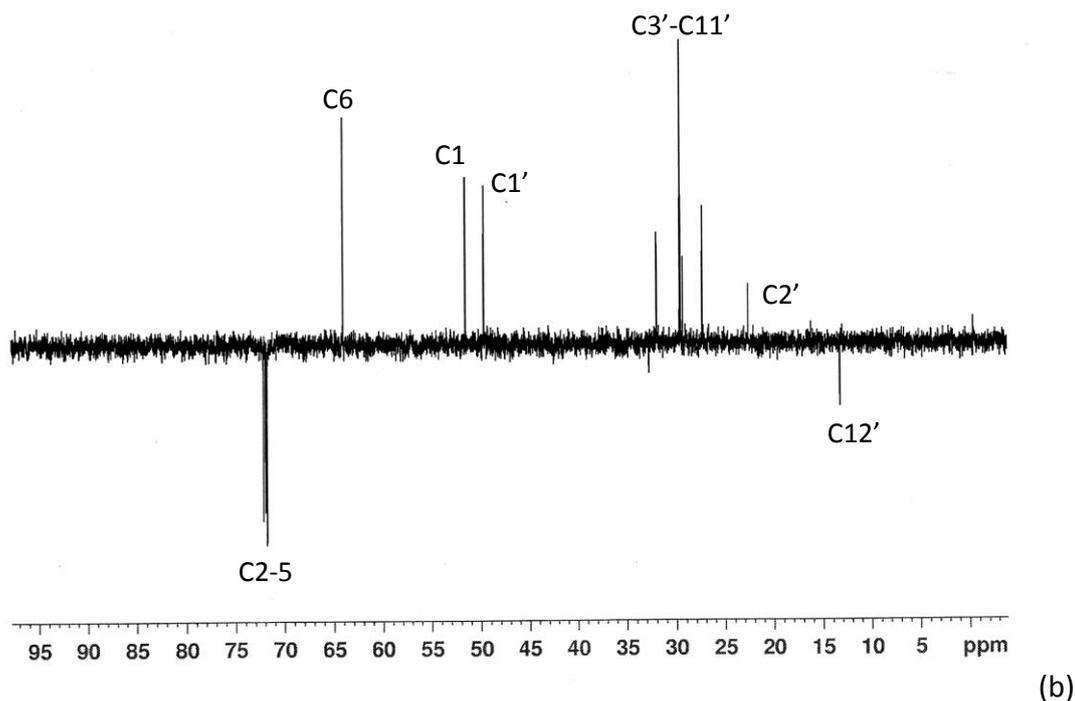


Figure 16: Spectres RMN ^{13}C (a) et DEPT 135 (b) à 75 MHz du composé GlcC12 dans CD_3OD ($\delta = 49.3$ ppm)

On retrouve en effet sur ces deux spectres RMN ^{13}C la distinction des signaux en trois régions : (i) entre 80 et 60 ppm, les signaux caractéristiques des carbones de la partie sucre (C1 à C6), (ii) vers 50 ppm, les signaux des deux carbones C1 et C1' en α du groupe NH, et enfin (iii) entre 35 et 10 ppm, les signaux des autres carbones de la chaîne alkyle (C2' à C12').

Toutefois, alors que sur le spectre RMN ^{13}C du composé GlcC12+, le carbone C1' est masqué par le signal du solvant ($\delta = 49.3$ ppm), il est parfaitement visible à 50.7 ppm sur le spectre RMN ^{13}C du composé GlcC12. En outre, une analyse approfondie du spectre RMN ^{13}C du GlcC12 a permis de mettre en évidence des différences de déplacements chimiques pour les carbones qui sont proches voisins du NH, comme cela a déjà été montré pour les protons. Ceci est illustré par les données du tableau 3, à la fois pour les carbones en α du NH (C1 et C1') et pour les carbones en β du NH (C2 et C2').

On peut ainsi observer que le passage de la forme chlorhydrate (GlcC12+) à la forme neutre (GlcC12) du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol s'accompagne d'un déplacement vers les champs faibles (déblindage), respectivement de 1.7 et 1.0 ppm pour les carbones C1 et C1'.

Dans le cas des carbones C2 et C2' en β du NH, le déplacement est beaucoup moins significatif (0.2 ppm) pour le carbone C2' que pour le carbone C2 (3.0 ppm) qui est plus influencé par le passage de la forme chlorhydrate à la forme neutre.

Tableau 3: Déplacements chimiques des carbones C1, C2, C1' et C2' du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC12+) et neutre (GlcC12).

Carbones	δ_{GlcC12^+} (ppm)	δ_{GlcC12} (ppm)	$\Delta [\delta_{\text{GlcC12}^+} - \delta_{\text{GlcC12}}]$ (ppm)
C1	50.9	52.6	- 1.7
C1'	49.7	50.7	- 1.0
C2	69.8	72.8	- 3.0
C2'	23.8	23.6	+ 0.2

La caractérisation du composé GlcC12 par spectrométrie de masse ESI (Figure 17) a permis de confirmer la structure attendue. Le spectre obtenu est en effet caractérisé par un pic principal à 350.3 m/z correspondant à l'ion $[\text{GlcC12}+\text{H}]^+$ et un autre pic à 372.3 m/z attribué à l'ion $[\text{GlcC12}+\text{Na}]^+$. Notons qu'aucun signal caractéristique d'impuretés de nature organique n'est observé dans ce spectre.

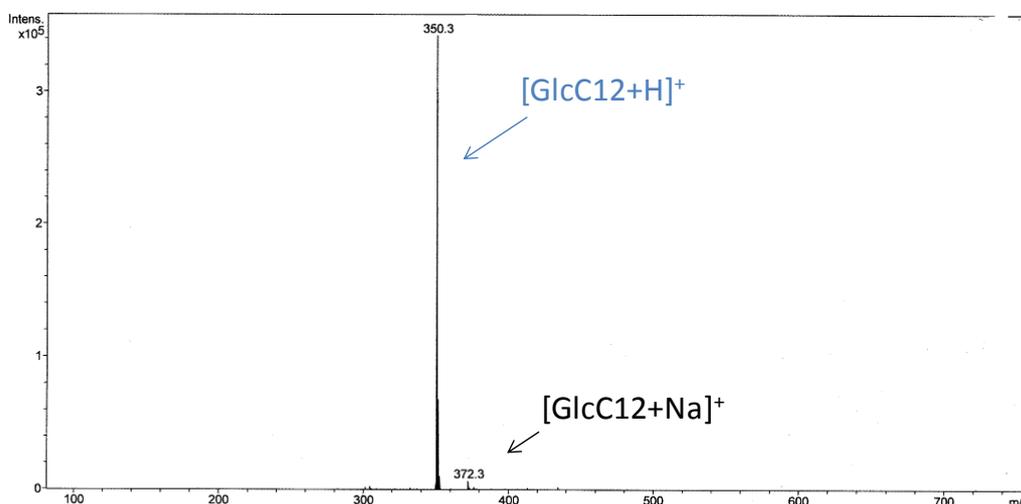


Figure 17: Spectre de masse ESI en mode positif du GlcC12 ($M = 349.5$ g/mol)

L'obtention de la molécule amphiphile GlcC12, après neutralisation du GlcC12+, a donc été confirmée par les différentes analyses effectuées par spectroscopies RMN ^1H et ^{13}C et spectrométrie de masse. Dans la suite de cette étude, nous allons appliquer cette méthode de synthèse pour la préparation des analogues en C6 et C16 du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol, respectivement le *N*-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et le *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16).

II.2. Synthèse des composés N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16)

II.2.1. Protocole de synthèse

Dans une première étape, les formes chlorhydrates des N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6+) et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16+) ont été préparées par la méthode d'amination réductrice suivie d'un traitement en milieu hydroalcoolique acide. Pour cela, le D-glucose a été chauffé dans le méthanol à reflux en présence d'une quantité stœchiométrique d'alkylamine correspondante (hexylamine ou hexadécylamine) pendant au moins 1h jusqu'à la solubilisation complète du sucre. La réduction a été ensuite effectuée par ajout à la solution d'un excès de NaBH₄ comme agent réducteur. Puis les bruts réactionnels ont été traités à trois reprises par une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v), suivi d'une co-évaporation. Après recristallisation dans le méthanol, les composés GlcC6+ et GlcC16+ ont été isolés avec des rendements molaires respectifs de 88 et 91 % comparables au rendement obtenu pour le composé GlcC12+.

Dans une deuxième étape, les composés N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16) ont été respectivement synthétisés par traitement de leur dérivés chlorhydrate GlcC6+ et GlcC12+ par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Les composés obtenus par précipitation dans le milieu réactionnel ont été purifiés par recristallisation dans le méthanol. Les rendements molaires obtenus pour cette réaction sont de 68% pour le composé GlcC6+ et 73% pour le composé GlcC12+. Sur l'ensemble de la synthèse, les composés N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16) ont été préparés à partir du D-glucose avec des rendements molaires de 60 et 65 %, respectivement.

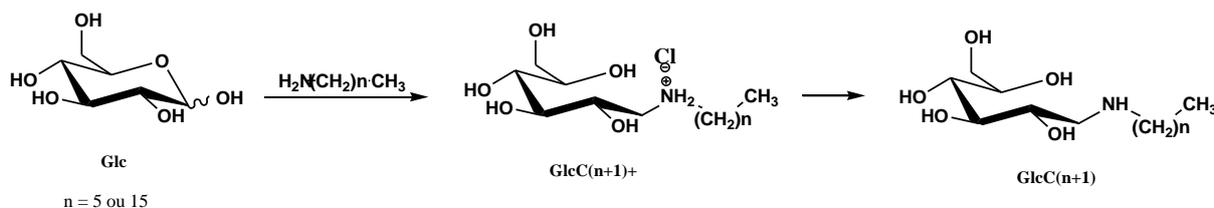
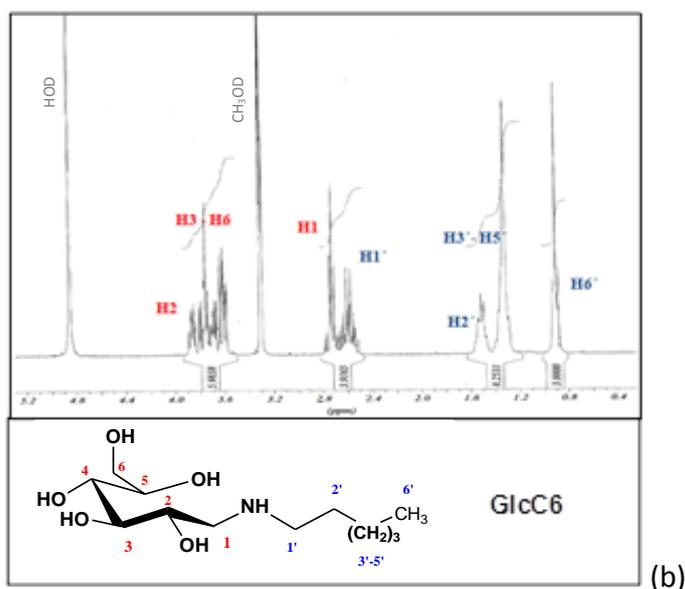
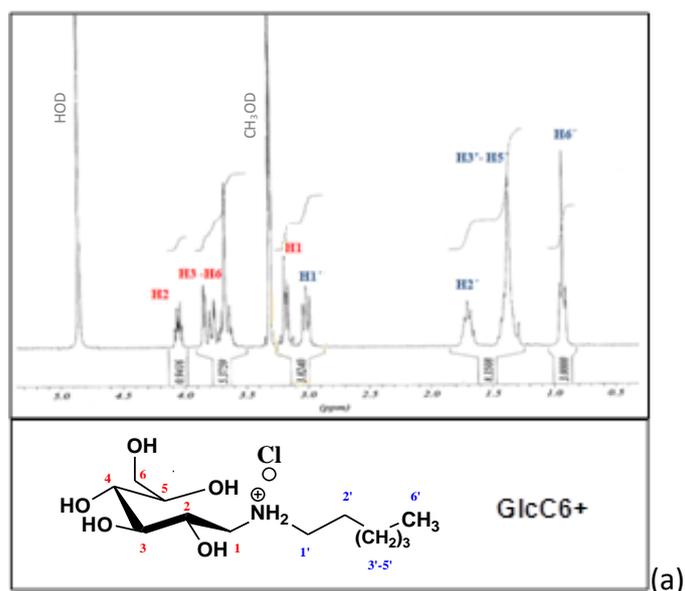


Figure 18: Schéma réactionnel de la synthèse des composés GlcC6 et GlcC16 par amination réductrice du D-glucose.

II.2.2. Caractérisations structurales des N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate et neutre

Les composés N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol et N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol obtenus sous forme chlorhydrate (respectivement GlcC6+ et GlcC16+) puis sous forme neutre (respectivement GlcC6 et GlcC16) ont été caractérisés dans un premier temps par spectroscopie RMN ^1H puis par RMN ^{13}C . L'interprétation de ces différents spectres s'est appuyée sur les analyses des spectres de RMN correspondants précédemment décrits pour l'analogue en C12 sous forme chlorhydrate (GlcC12+) et neutre (GlcC12), en raison de leurs fortes similitudes.



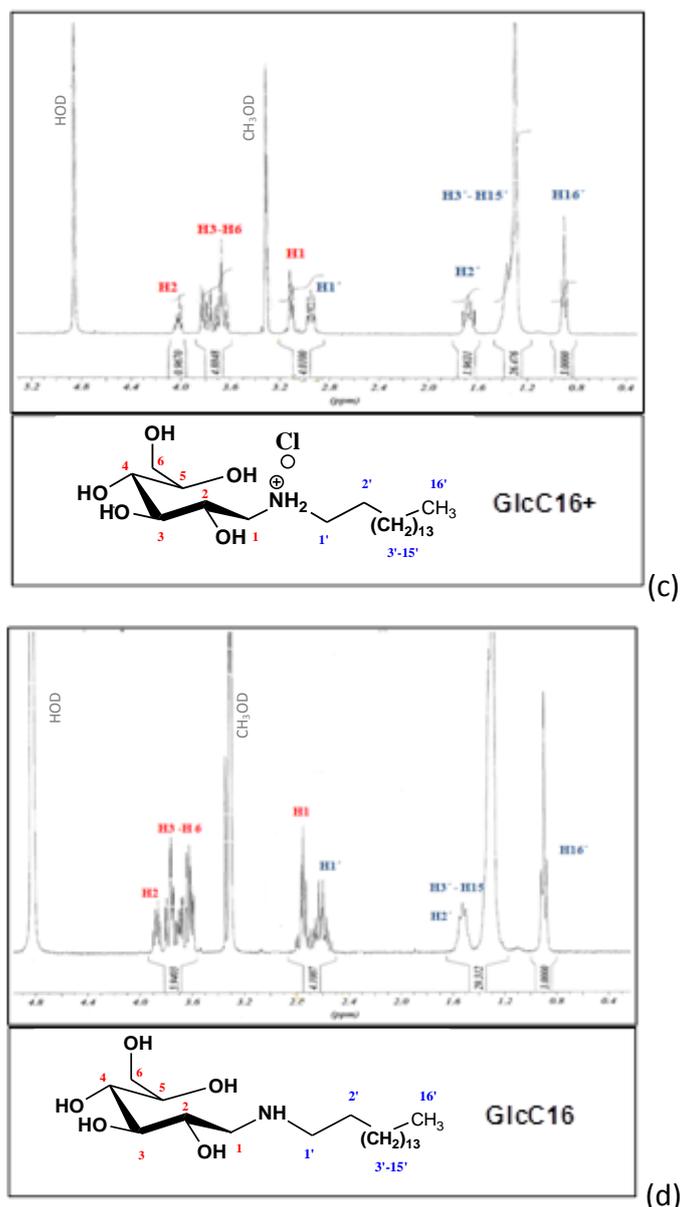


Figure 19: Spectres RMN ^1H à 300 MHz des composés (a) GlcC6+, (b) GlcC6, (c) GlcC16+ et (d) GlcC16 dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{HOD}} = 4.85 \text{ ppm}$).

En ce qui concerne les analyses de spectroscopie RMN ^1H (Figure 19), ce qui est remarquable est que quelle que soit la longueur de la chaîne alkyle, les spectres RMN ^1H obtenus présentent un double massif de signaux caractéristiques des protons H1 et H1' liés aux carbones en α du groupe NH entre 3.2 et 2.9 ppm pour les formes chlorhydrates (GlcC6+, GlcC12+ et GlcC16+ respectivement en Figures 8 et 19) et entre 2.8 et 2.5 ppm pour les formes neutres (GlcC6, GlcC12 et GlcC16 respectivement en Figures 14 et 19).

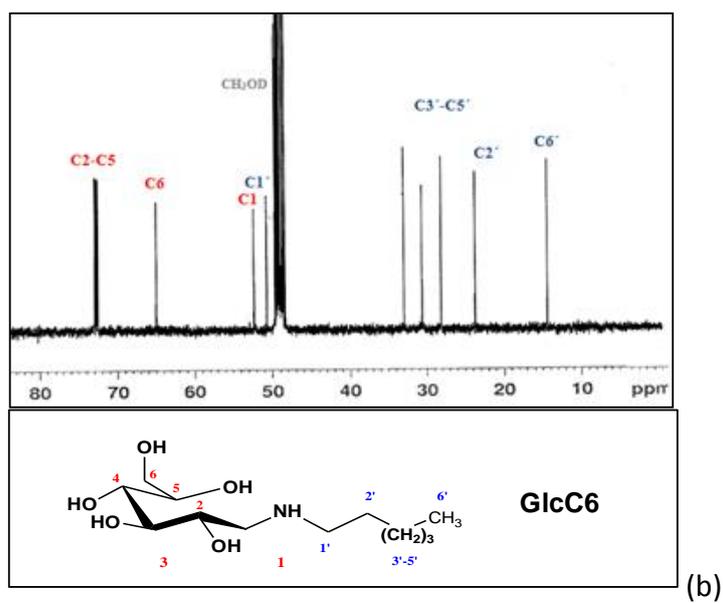
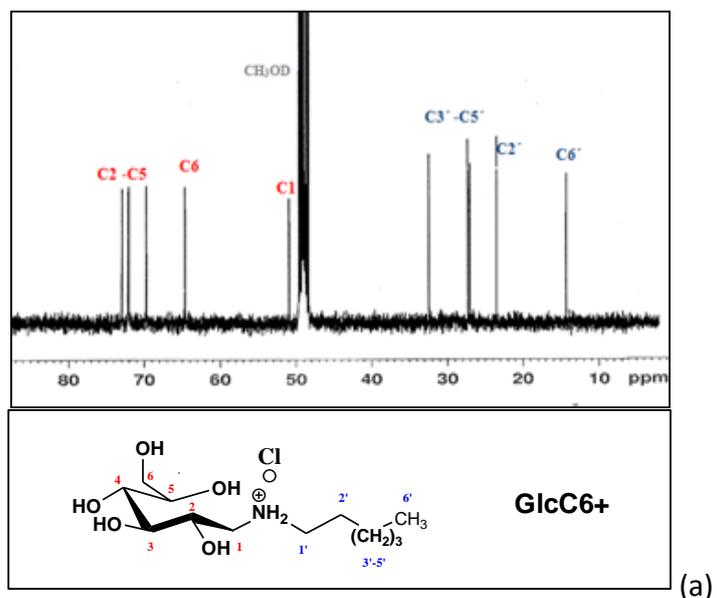
Pour une même longueur de la chaîne alkyle, lors du passage de la forme chlorhydrate à la forme neutre, les déplacements chimiques des H1 et H1' liés aux carbones adjacents du groupe NH se déplacent vers les champs forts comme cela est mentionné dans le tableau 4. On peut notamment remarquer que cette variation est dépendante de la longueur de la chaîne alkyle. Ainsi plus la longueur de la chaîne alkyle augmente, plus la variation du déplacement chimique entre les protons H1 et H1' de la forme chlorhydrate et ceux de la forme neutre diminue. Par exemple, pour le proton H1, les variations du déplacement chimique entre les composés GlcC6+ et GlcC6, GlcC12+ et GlcC12, puis GlcC16+ et GlcC16 sont respectivement de +0.44, +0.41 et 0.36 ppm. De même, dans le cas du proton H1', les variations observées sont de +0.41 entre les composés GlcC6+ et GlcC6, +0.36 entre les composés GlcC12+ et GlcC12, et +0.33 entre les composés GlcC16+ et GlcC16.

Tableau 4: Déplacements chimiques (δ) des protons H1 et H1' en α du groupe NH des composés N-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols en C6, C12 et C16 (respectivement GlcC6, GlcC12 et GlcC16) et de leurs dérivés chlorhydrate (respectivement GlcC6+, GlcC12+ et GlcC16+).

Protons	δ_{GlcC6^+} (ppm)	δ_{GlcC6} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC6}^+}-\delta_{\text{GlcC6}})$ (ppm)
H1'	3.00	2.59	+ 0.41
H1	3.17	2.73	+ 0.44

Protons	δ_{GlcC12^+} (ppm)	δ_{GlcC12} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC12}^+}-\delta_{\text{GlcC12}})$ (ppm)
H1'	3.01	2.65	+ 0.36
H1	3.16	2.75	+ 0.41

Protons	δ_{GlcC16^+} (ppm)	δ_{GlcC16} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC16}^+}-\delta_{\text{GlcC16}})$ (ppm)
H1'	2.94	2.61	+ 0.33
H1	3.10	2.74	+ 0.36



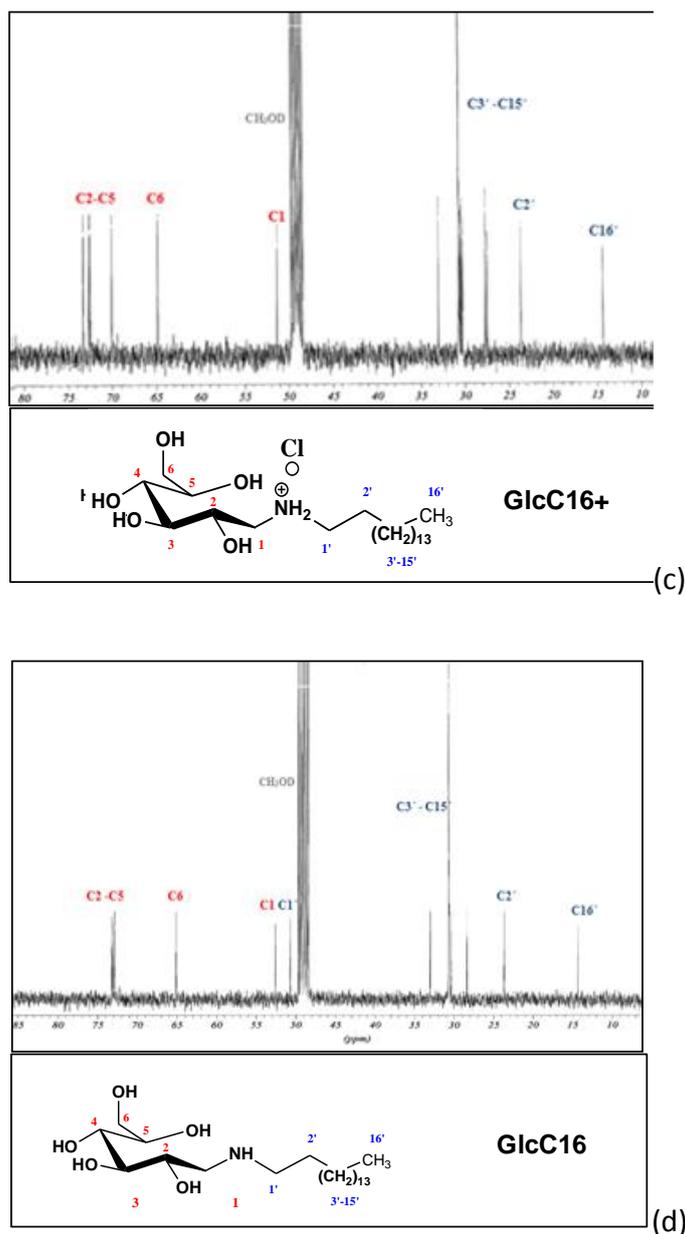


Figure 20: Spectres RMN ^{13}C à 75 MHz du GlcC6+, GlcC6, GlcC16+ et du GlcC16 dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 49.3$ ppm)

En ce qui concerne les spectres de RMN ^{13}C des composés GlcC6+, GlcC6, GlcC16+ et GlcC16 (Figure 20), ils présentent également des similitudes avec les spectres des composés analogues en C12 : GlcC12+ et GlcC12 (respectivement figures 10 et 16). On retrouve en effet la présence de trois régions distinctes caractéristiques : (i) entre 80 et 60 ppm, la région des carbones (C2 à C6) de la partie sucre, (ii) vers 50 ppm, la région des deux carbones C1 et C1' en α du groupe NH, et enfin (iii) la région entre 35 et 10 ppm correspondant aux autres carbones de la chaîne alkyle.

Toutefois, dans le cas des composés sous forme chlorhydrate, les signaux C2-C5 sont distinguables alors qu'après neutralisation ils sont confondus. De plus, le signal du C1' pour les composés sous forme chlorhydrate est masqué par la présence du pic du solvant ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 49.3$ ppm) alors que le signal est visible pour les composés après neutralisation. Le solvant d'analyse étant identique, cela indique que le déplacement chimique du C1' en α du NH est modifié par rapport à celui du composé sous forme chlorhydrate. Les déplacements chimiques des carbones en α du NH sont détaillés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Déplacement chimique (ppm) des C1 et C1' en α du groupe NH des composés N-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols en C6, C12 et C16 (respectivement GlcC6, GlcC12 et GlcC16) et de leurs dérivés chlorhydrate (respectivement GlcC6+, GlcC12+ et GlcC16+)

Carbones	$\delta_{\text{GlcC6+}}$ (ppm)	δ_{GlcC6} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC6+}} - \delta_{\text{GlcC6}})$ (ppm)
C1'	49.1	50.7	- 1.6
C1	50.9	52.4	- 1.5

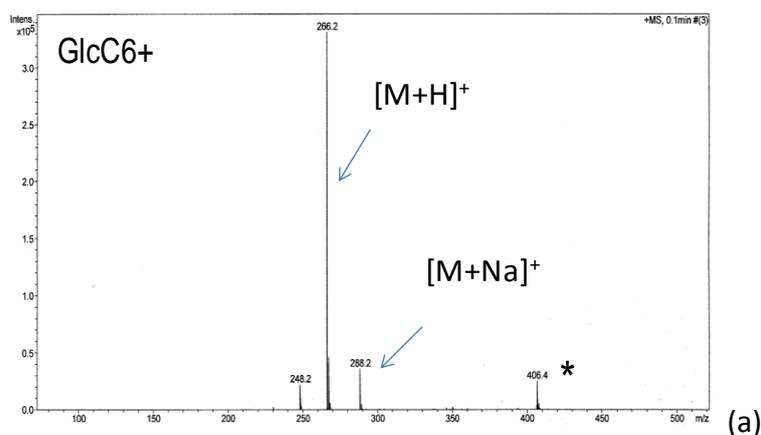
Protons	$\delta_{\text{GlcC12+}}$ (ppm)	δ_{GlcC12} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC12+}} - \delta_{\text{GlcC12}})$ (ppm)
C1'	49.1	50.7	- 1.6
C1	50.9	52.6	- 1.7

Protons	$\delta_{\text{GlcC16+}}$ (ppm)	δ_{GlcC16} (ppm)	$\Delta(\delta_{\text{GlcC16+}} - \delta_{\text{GlcC16}})$ (ppm)
C1'	49.5	50.7	- 1.2
C1	51.4	52.6	- 1.2

Lors du passage de la forme chlorhydrate à la forme neutre, les signaux ont un déplacement chimique plus élevé vers les champs faibles. De ce fait, le signal du C1 présent sous le signal du solvant ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 49.3$ ppm) dans le cas de la forme chlorhydrate devient visible à 52.6 ppm dans le cas de la forme neutre. Contrairement à la RMN ^1H , l'écart entre la valeur du déplacement chimique du C1' de la forme chlorhydrate et la valeur du déplacement chimique de la forme neutre ne diminue pas systématiquement lorsque la longueur de chaîne alkyle augmente. L'écart entre les composés GlcC6+ et GlcC6 (1.6 ppm) est identique

à celui entre les composés GlcC12+ et GlcC12 (1.6 ppm), lui-même supérieur à celui entre les composés GlcC16+ et GlcC16 (1.2 ppm). Dans le cas du C1, l'écart entre les composés GlcC6+ et GlcC6 (1.5 ppm) est inférieur à celui entre les composés GlcC12+ et GlcC12 (1.7 ppm), lui-même supérieur à celui entre les composés GlcC16+ et GlcC16 (1.2 ppm).

Par ailleurs, les analyses de spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C des composés GlcC6+, GlcC6, GlcC16+ et GlcC16 ont été complétées par des analyses de spectrométrie de masse ESI, présentées dans la Figure 21. Pour les deux composés en C6, les spectres obtenus sont caractérisés par un pic de forte intensité à 266.2 (m/z) correspondant à l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, et un pic de faible intensité à 288 (m/z) correspondant à l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figure 21a et 21b). On peut également noter la présence d'un pic de faible intensité à 406.4 (m/z) attribué à une impureté présente dans l'hexylamine utilisée comme réactif de départ. Concernant les spectres des deux composés en C16, ils sont caractérisés par un pic très majoritaire à 406.4 (m/z) de l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ et d'un autre de très faible intensité à 434.4 (m/z) dans le cas du GlcC16 correspondant à l'ion $[\text{M}+\text{K}]^+$ et à 428.3 (m/z) dans le cas du GlcC16+ correspondant à l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figure 21c et 21d).



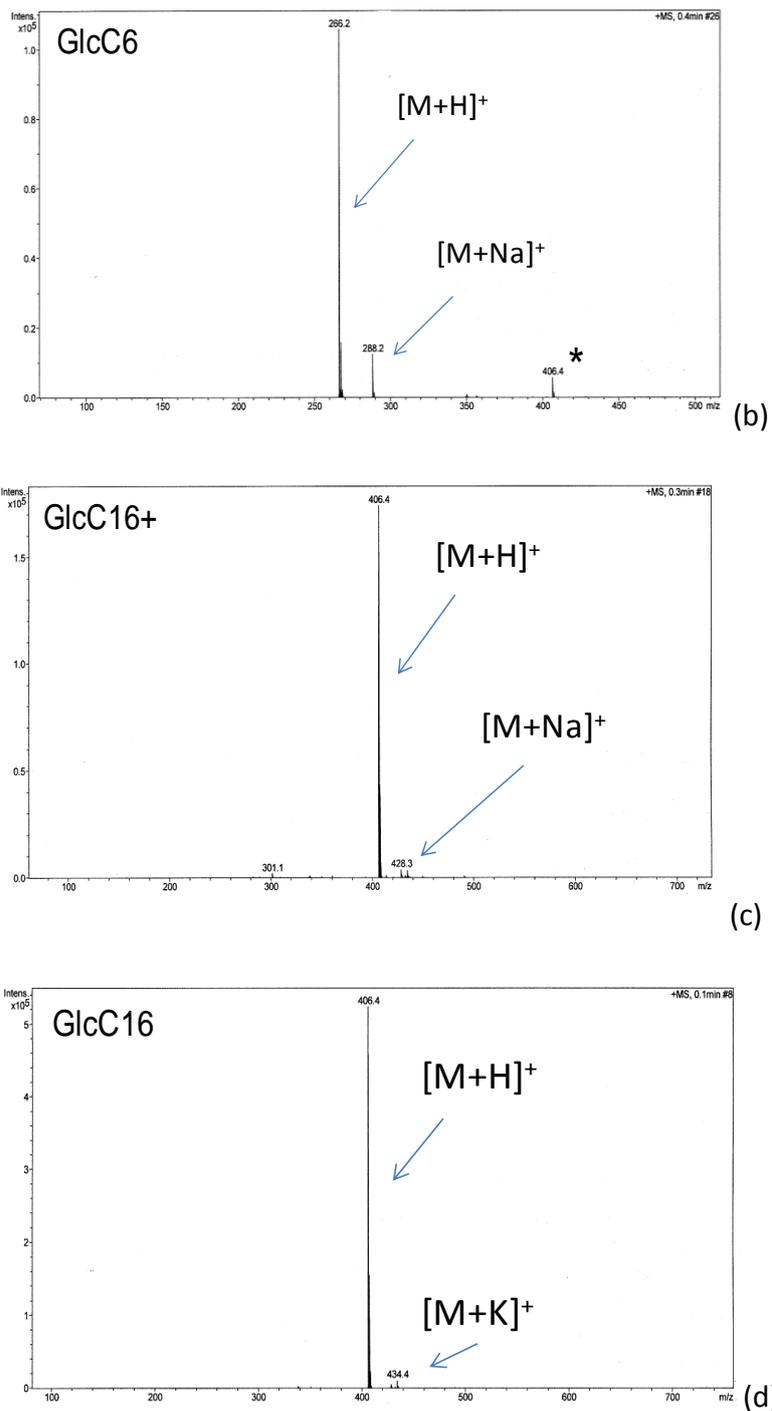


Figure 21: Spectres de masse ESI en mode positif du GlcC6+ (a), GlcC6 (b), GlcC16+ (c) et GlcC16 (d). * impureté présente au sein de l'hexylamine utilisée comme réactif de départ

II.3. Conclusion sur la synthèse des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose en C6, C12 et C16

La voie de synthèse décrite par Tokuda et coll.⁷ nous a permis de préparer les dérivés de D-glucose ayant une longueur de chaîne alkyle hydrophobe variable à 6 ou 16 atomes de carbone, avec des rendements molaires totaux satisfaisants (Figure 22).

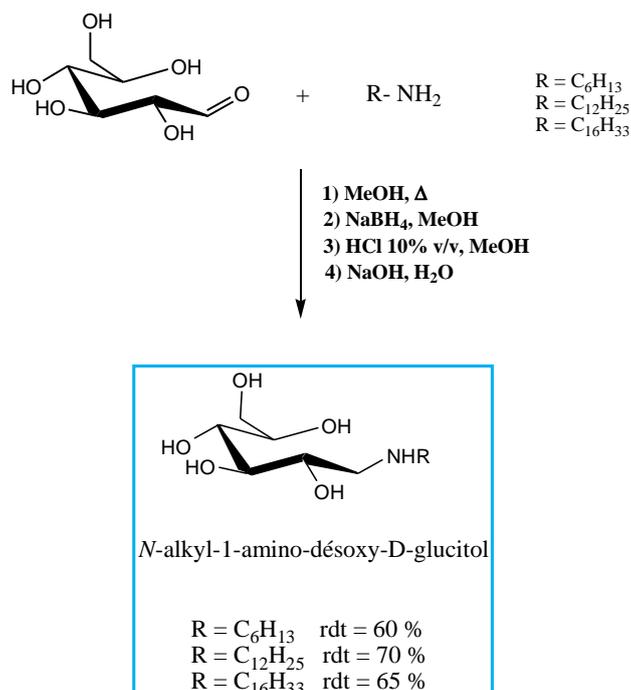


Figure 22: Bilan de l'obtention des molécules amphiphiles GlcC6, GlcC12 et GlcC16 synthétisées dans cette étude par une réaction d'amination réductrice

Cette méthode de synthèse peut être décomposée en deux étapes : (i) une première étape d'amination réductrice du D-glucose en présence de l'alkylamine conduisant à la formation du composé sous forme chlorhydrate (GlcCX⁺) suite à un traitement acide pour éliminer les résidus de l'agent réducteur utilisé ; puis (ii) une deuxième étape dans laquelle le composé (GlcCX⁺) est neutralisé en milieu basique pour conduire au produit attendu. Les *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols (GlcCX) ainsi que leurs dérivés chlorhydrate (GlcCX⁺) ont été parfaitement caractérisés à la fois par spectroscopies de RMN ¹H et ¹³C et spectrométrie de masse ESI, ce qui à notre connaissance apporte de nouvelles données à la littérature existante sur des composés analogues. Ainsi pour mémoire (Tableau 1), Tokuda et coll.⁷ ont

décrit la caractérisation du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol uniquement par analyse élémentaire. Dans leur travaux sur la synthèse de *N*-alkyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitols, Van Doren et coll.⁸ n'ont pas présenté de données structurales de ces composés qui ont servi d'intermédiaires réactionnels. Seuls, les travaux de Ramsch et coll.⁹ sur la synthèse de l'analogue en C8 (*N*-octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol) permettent d'avoir des données structurales de spectroscopies de RMN ¹H et ¹³C.

Les rendements molaires totaux obtenus pour le composé GlcC6 (60%), le composé GlcC12 (70%) et le composé GlcC16 (65%), sont supérieurs à ceux obtenus par Tokuda et coll.⁷ (52%) mais inférieurs à ceux obtenus par Van Doren et coll.⁸ (fourchette entre 60% et 90%). Dans le cas de Tokuda et coll.⁷, seul le rendement molaire du composé GlcC12 est donné (52%), il est de ce fait impossible de comparer avec les rendements molaires du composé GlcC6 et du composé GlcC16. Concernant les travaux de Van Doren et coll.⁸, le rendement donné est une fourchette pour les molécules amphiphiles synthétisées avec huit longueurs différentes de chaîne alkyle, on ne connaît donc pas le rendement exact de chaque molécule amphiphile en fonction de sa longueur de chaîne. Enfin, dans le cas des travaux de Ramsch et coll.⁹, seul une molécule amphiphile ayant une chaîne alkyle à huit atomes de carbone a été synthétisée, il n'est donc pas possible de comparer significativement ce rendement molaire (30%) avec celui des molécules amphiphiles synthétisées dans ce travail.

III. Accès aux molécules amphiphiles dérivées de *N*-acétyl-D-glucosamine

III.1. Application de la méthode d'amination réductrice décrite par Tokuda et coll. au couple *N*-acétyl-D-glucosamine/ dodécylamine

Dans ce travail nous avons voulu appliquer, pour la *N*-acétyl-D-glucosamine, la méthode d'amination réductrice de Tokuda et coll.⁷ décrite précédemment pour le D-glucose. L'objectif est ici d'étudier la faisabilité de greffer des chaînes hydrophobes de type alkylamine en position anomère de la *N*-acétyl D-glucosamine. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'amination réductrice de la *N*-acétyl-D-glucosamine par la dodécylamine, en adaptant le protocole décrit précédemment pour les dérivés D-glucose. Ainsi, étant donné la plus faible solubilité de la *N*-acétyl-D-glucosamine dans le méthanol que le D-glucose, il a été nécessaire d'utiliser des solutions diluées de *N*-acétyl-D-glucosamine à 1.6% (m/v) dans le méthanol contre 10% (m/v) pour le D-glucose. Comme dans le cas du D-glucose, la réaction d'amination réductrice a été réalisée en chauffant à reflux de méthanol la solution de *N*-acétyl D-glucosamine avec la dodécylamine en quantités stœchiométriques, puis par addition de NaBH₄ comme agent réducteur. Trois co-évaporations successives du milieu réactionnel par une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) ont permis d'obtenir un résidu solide, qui a ensuite été recristallisé dans le méthanol. Les analyses de spectroscopie RMN et de spectrométrie de masse décrites ci-après ont montré que le produit obtenu n'est pas le produit attendu, c'est-à-dire le *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcNAcC12+), mais son dérivé glucosamine, le 1-*N*-dodécyl-1,2-diamino-1,2-didésoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcNC12+) (Figure 23).

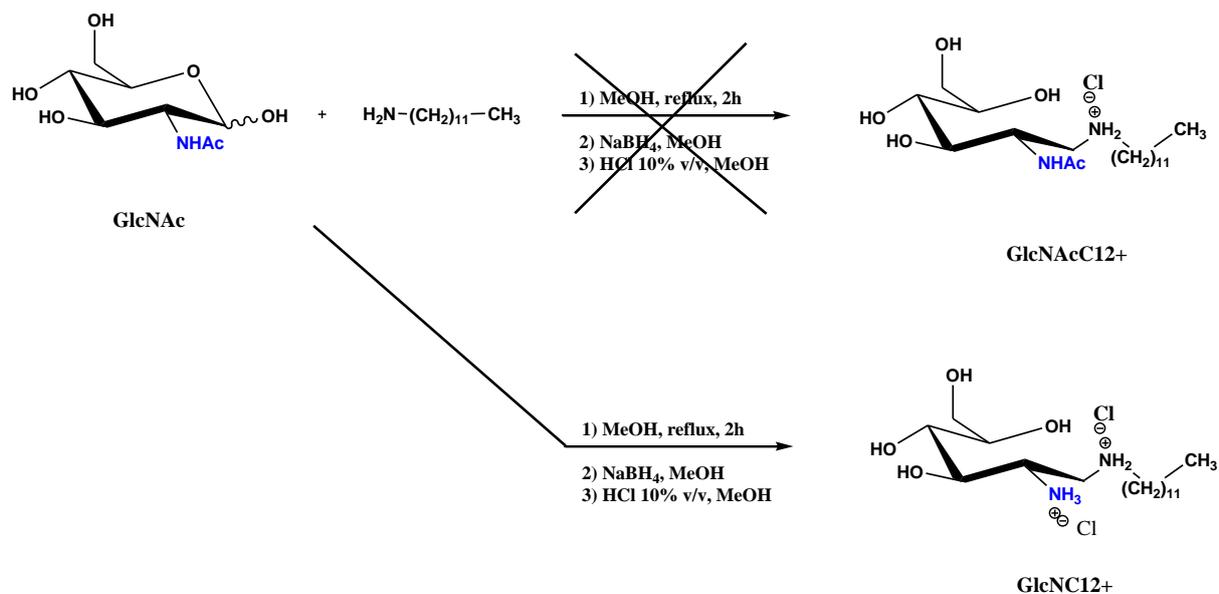


Figure 23: Schéma d'obtention du 1-N-dodécyl-1,2-diamino-1,2-didésoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate par réaction de la N-acétyl-D-glucosamine avec la dodécylamine

Sur le spectre RMN ¹H du composé obtenu (Figure 24), on peut observer trois zones caractéristiques : la partie saccharide entre 4.1 et 3.3 ppm, les signaux correspondants aux protons H1 et H1' en α de l'azote entre 3.2 et 2.8 ppm, et les signaux caractéristiques de la chaîne alkyle entre 1.7 et 0.9 ppm. Cependant, le signal caractéristique du CH₃ de l'acétyl pour le GlcNAc attendu à 2 ppm n'est pas présent sur le spectre, ce qui laisse penser que le composé obtenu n'est pas un dérivé de la N-acétyl-D-glucosamine.

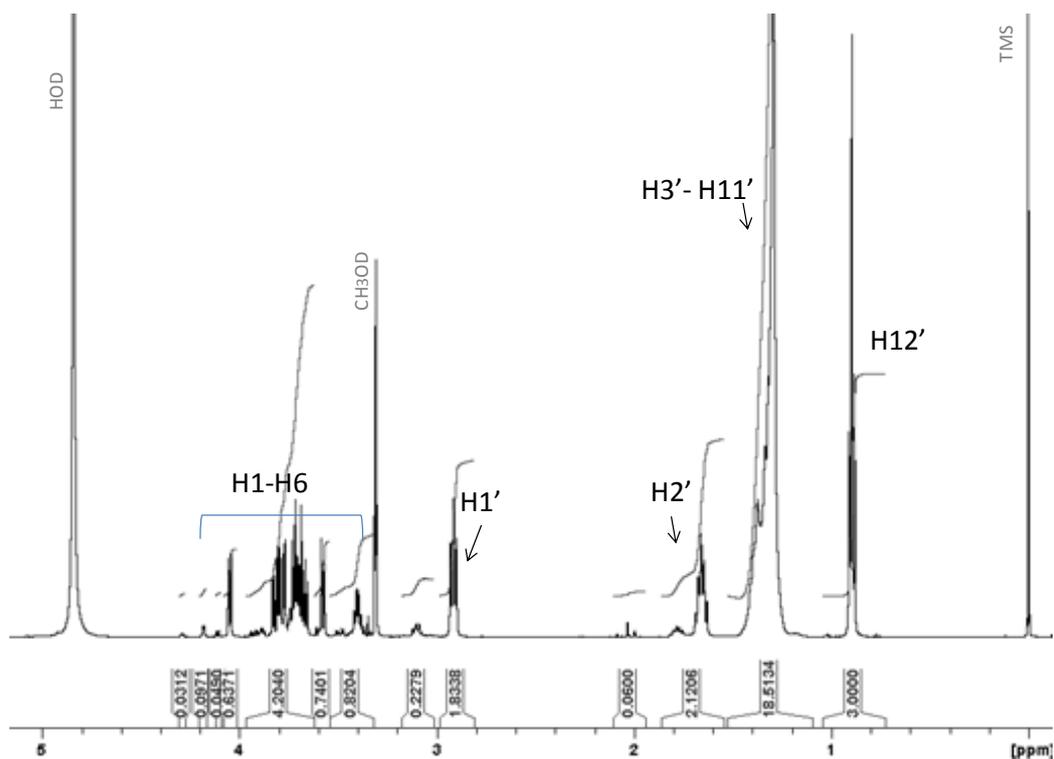
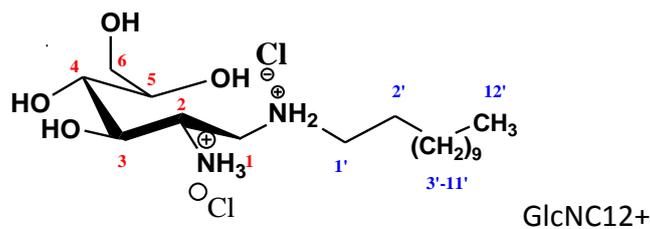


Figure 24: Spectre RMN ^1H à 300 MHz du GlcNC12+ dans le CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm ; $\delta_{\text{HOD}} = 4.85$ ppm)

On peut cependant remarquer que la valeur des intégrales des signaux de la partie saccharidique est légèrement sous-estimée par rapport à la valeur des signaux de la chaîne alkyle. En effet, la somme des intégrales des huit protons du sucre est égale à 6.4, ce qui induit une valeur de 0.8 pour le ratio proton sucre/ proton alkyle. Ceci peut être expliqué par la présence dans le produit d'alkylamine résiduelle. La caractérisation du composé obtenu a été complétée par l'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 (Figure 25).

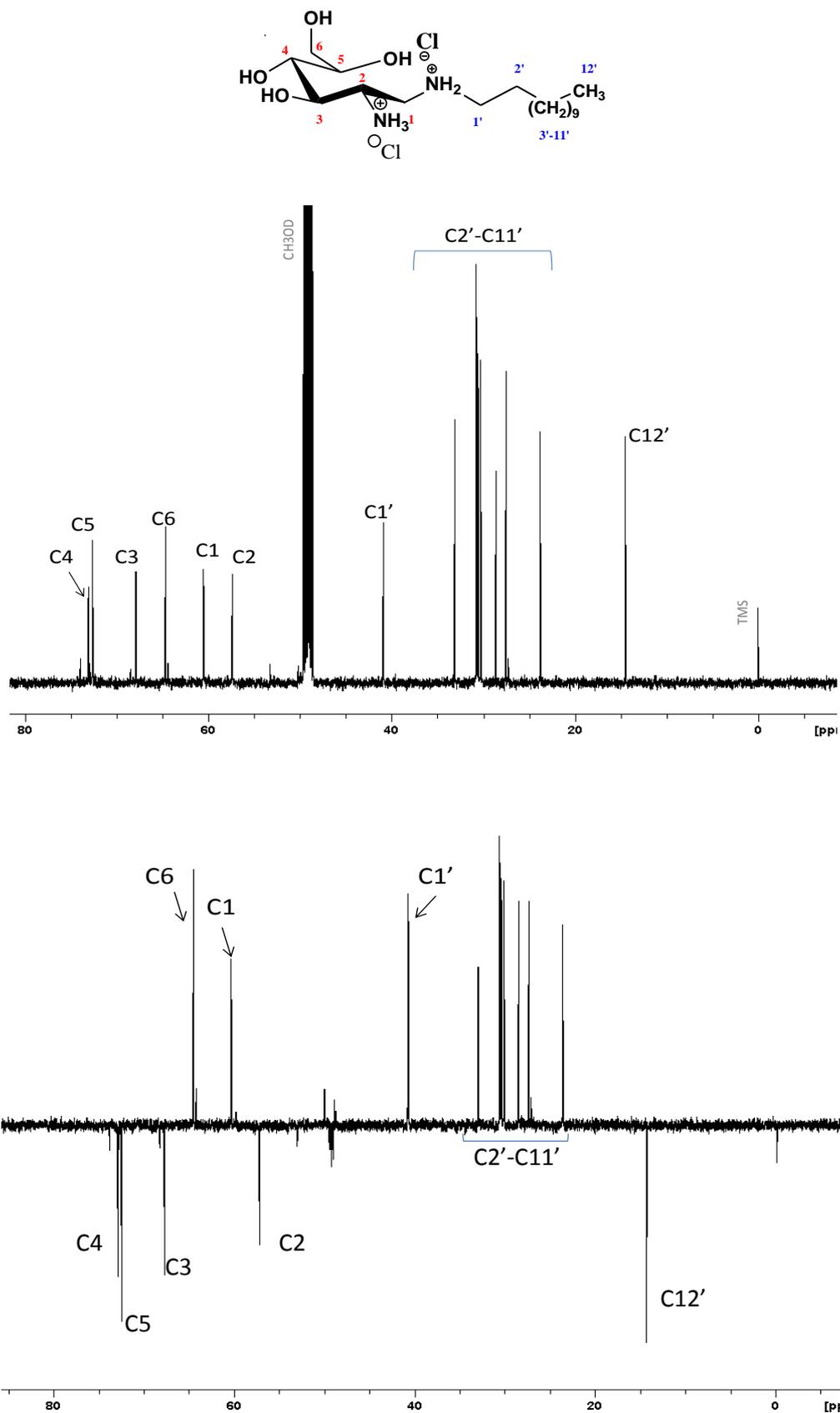


Figure 25: Spectre RMN ¹³C et DEPT 135 (75 MHz) du GlcNC12⁺ dans le CD₃OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 49.3$ ppm)

Sur le spectre ^{13}C du produit obtenu, on peut distinguer deux grandes zones de signaux : l'une entre 75 et 55 ppm pour les signaux correspondants aux carbones du sucre, et l'autre entre 45 et 10 ppm où les signaux des carbones de la chaîne alkyle sont représentés. L'interprétation du spectre DEPT 135 nous a permis de préciser la position des carbones en α du groupe NH, les carbones C1 à 60.5 ppm et C1' à 40.8 ppm, et la position du carbone C6 à 64.6 ppm. Le spectre de corrélation proton/ carbone (RMN ^1H - ^{13}C HSQC) nous a permis de compléter l'attribution des signaux du GlcNC12+ comme détaillé dans la Figure 26.

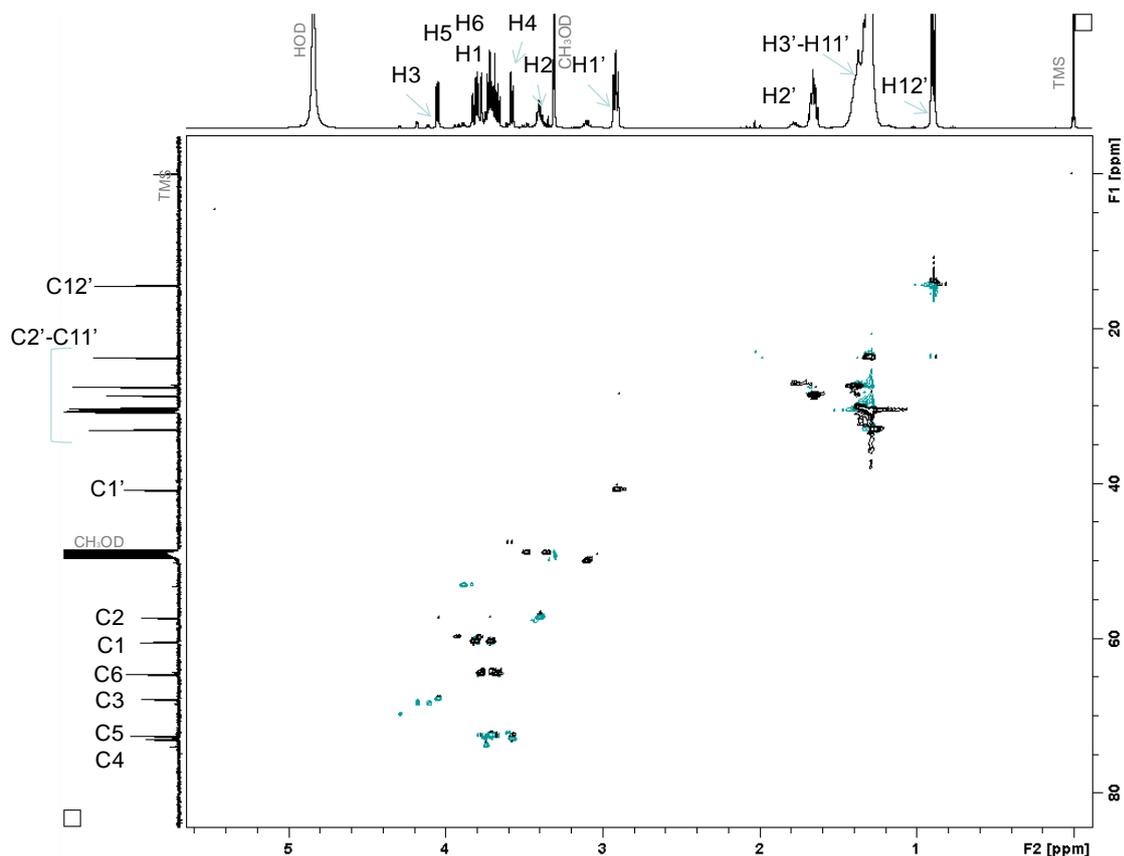


Figure 26: Spectre RMN 2D ^1H – ^{13}C HSQC (300 MHz) du composé GlcNC12+ dans CD_3OD à 500 MHz

Par ailleurs, l'analyse du composé GlcNC12+ a été complétée par spectrométrie de masse ESI (Figure 27). Un pic de forte intensité à m/z égal 349.3, a été attribué à l'ion

$[(\text{GlcNC12}) + \text{H}]^+$. Un autre pic de faible intensité caractéristique de la dodécylamine qui n'a pas entièrement réagi au cours de la synthèse et qui se retrouve dans le produit final a été observé à m/z égal 186.2 $[\text{dodécylamine} + \text{H}]^+$.

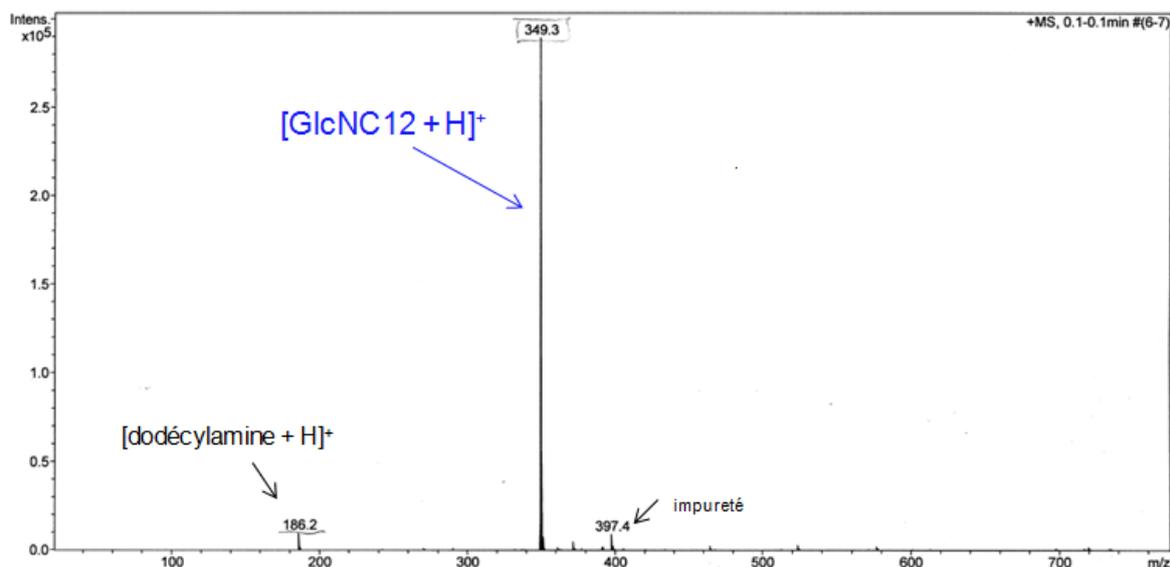


Figure 27: Spectre de masse ESI en mode positif du composé GlcNC12+

Les techniques de caractérisation structurale complémentaires ont donc permis de mettre en évidence que le produit sous forme chlorhydrate obtenu était en réalité le dérivé D-glucosamine : 1-N-dodécyl-1,2-diamino-1,2-didésoxy-D-glucitol (GlcNC12+). On peut supposer que le milieu acide au cours de la dernière étape de synthèse a favorisé la N-désacétylation du dérivé N-acétyl-D-glucosamine, conduisant à la formation du composé GlcNC12+. D'après ces observations, il a été montré que l'accès aux composés de N-alkyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol n'est pas envisageable selon le protocole suivi incluant un traitement en milieu acide pour éliminer les résidus de bore et qui favoriserait la formation des dérivés N-désacétylés.

III.2. Réaction d'amination réductrice entre la N-acétyl-D-glucosamine et les alkylamines en C6, C12, et C16 sans traitement en milieu acide

Bien que le traitement des dérivés de GlcNAc ne soit pas possible en milieu acide, nous avons souhaité présenter les résultats de synthèse qui ne sont pas, à notre connaissance, décrits dans la littérature. L'originalité de cette synthèse est ainsi d'obtenir et de caractériser des molécules amphiphiles dérivées de GlcNAc et ayant une longueur de chaîne alkyle variable. Comme précédemment, la voie de synthèse utilisée a consisté à greffer une chaîne alkylamine à 6, 12 ou 16 atomes de carbone sur l'aldéhyde de la N-acétyl-D-glucosamine par une réaction d'amination réductrice⁷. Les produits obtenus sont des bruts réactionnels nommés ici GlcNAcC6b, GlcNAcC12b, et GlcNAcC16b qui ont été caractérisés par spectroscopie RMN ¹H et spectrométrie de masse (Figure 28).

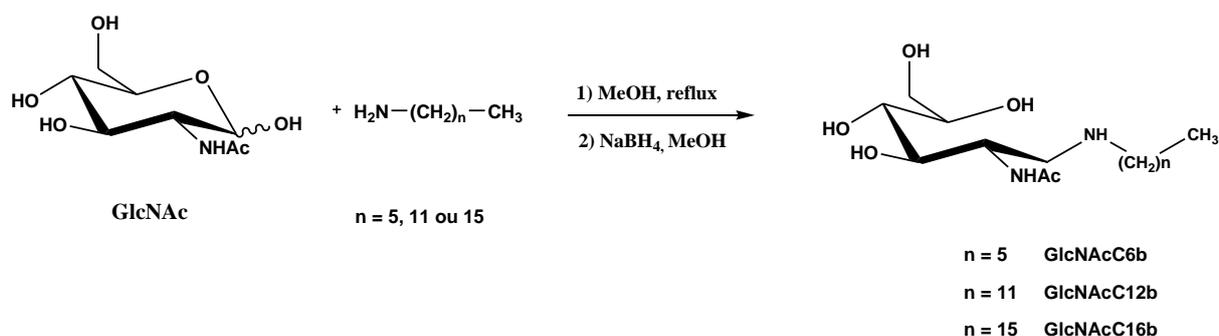


Figure 28: Obtention des composés GlcNAcC6b, GlcNAcC12b et GlcNAcC16b par amination réductrice de la N-acétyl D-glucosamine avec des alkylamines à 6, 12 et 16 atomes de carbone

Dans un premier temps, la N-acétyl-D-glucosamine et l'alkylamine (rapport molaire par rapport au saccharide 1 : 1) ont été chauffées à reflux jusqu'à solubilisation du saccharide dans le méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH₄ (rapport molaire par rapport au saccharide 1 : 4) est ajouté à la solution, puis celle-ci a été agitée 20 minutes à température ambiante puis 45 minutes à reflux. Après évaporation du solvant, les composés GlcNAcC6b, GlcNAcC12b et GlcNAcC16b sont obtenus sous forme de poudre.

A titre indicatif, les composés ont été obtenus avec des « rendements de bruts réactionnels » de 82%, 74% et 47% (respectivement pour GlcNAc6b, GlcNAc12b et GlcNAc16b). Les spectres RMN ^1H des composés obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 29).

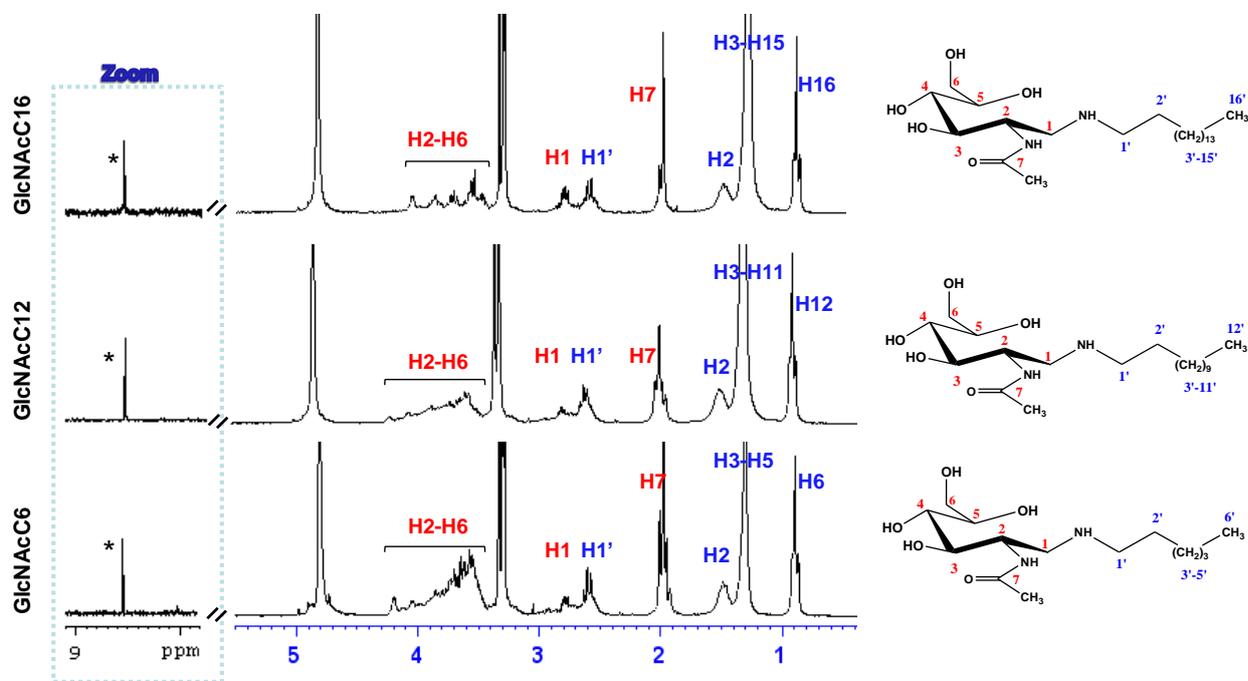


Figure 29 : Spectres RMN ^1H à 300 MHz des composés GlcNAc6b, GlcNAc12b, et GlcNAc16b dans CD_3OD ($\delta_{\text{CH}_3\text{OD}} = 3.34$ ppm ; $\delta_{\text{HOD}} = 4.85$ ppm). L'astérisque indique les signaux caractéristiques de la présence de résidus de bore.

Les spectres des trois molécules amphiphiles ayant une longueur de chaîne alkylamine variable présentent des similitudes. D'une part, les signaux caractéristiques de la partie alkyle sont présents de 1.5 à 0.8 ppm. A 2 ppm, le signal qui correspond au CH_3 du groupe acétyl permet de justifier la présence des dérivés du sucre GlcNAc. D'autre part, les signaux caractéristiques de la partie saccharidique ont été observés pour une même gamme de déplacement chimique, c'est-à-dire entre 3.40 ppm et 4.30 ppm. L'attribution exacte de ces signaux reste délicate étant donné la complexité des massifs obtenus dans cette région. On peut remarquer que la valeur de la somme des intégrales des protons H2 à H6 est légèrement plus faible que celle attendue, 5H au lieu de 6H, qui induit un ratio proton sucre/proton alkyle de 1.2. Puis, la formation des composés a été confirmée par l'apparition d'un multiplet de résonance caractéristique des protons H1' et H1 en α du groupe NH (H1' =

2.6 ppm; H1 = 2.8 ppm : similaire pour les trois composés). Toutefois, la valeur de l'intégrale obtenue étant plus faible que celle attendue (3H au lieu de 4H), il est possible que l'alkylamine provenant du réactif de départ soit encore présente au sein des composés obtenus. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse des spectres de masse ESI des trois composés (Figure 30).

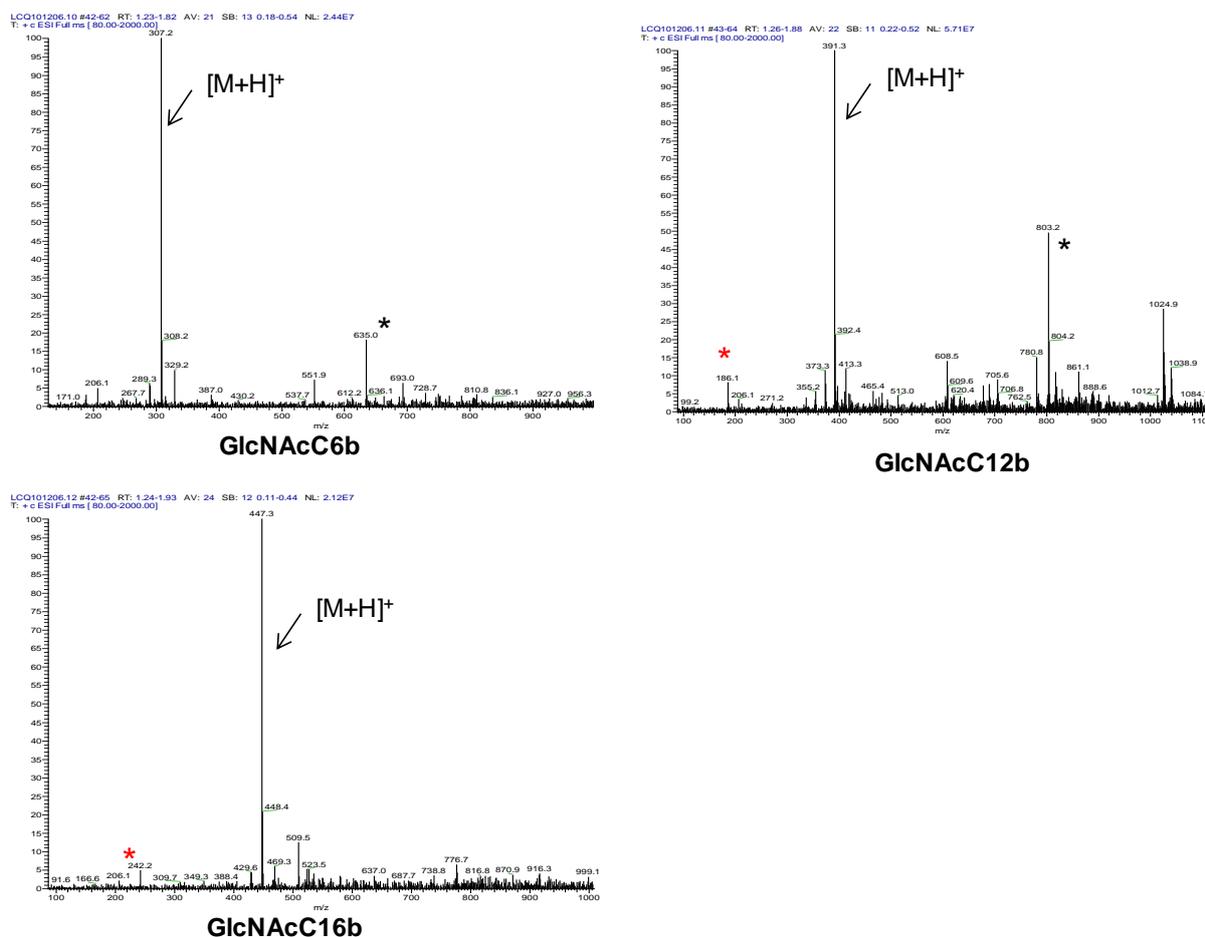


Figure 30: Spectre de masse ESI des composés GlcNAcC6b, GlcNAc12b, et GlcNAc16b. L'astérisque noir (*) représente les ions $2[M+Na]^+$. L'astérisque rouge (*) représente l'ion $[alkylamine+H]^+$

Les trois spectres de masse confirment la présence des composés GlcNAcC6b, GlcNAc12b, et GlcNAc16b synthétisés, caractérisés par la présence des pics respectivement à 307.2 m/z, 391.3 m/z et 447.3 m/z correspondants aux ions $[M+H]^+$. D'autres pics (astérisque noir) ont été attribués à la présence de l'ion $2[M+Na]^+$ pour les composés GlcNAcC6b et GlcNAc12b. De plus, les pics de faible intensité à 186.1 m/z et 242.3 m/z (astérisque rouge) mettent en évidence l'alkylamine provenant du réactif de départ qui n'aurait pas réagi, dont

la présence était envisagée par les analyses RMN ^1H . En revanche, le spectre du composé GlcNAcC6b semble exempt d'hexylamine.

III.3. Bilan

L'accès aux composés dérivés de GlcNAc a été possible en utilisant la réaction d'amination réductrice d'une chaîne alkylamine sur la GlcNAc. Nous avons adapté de la voie de synthèse utilisée par Tokuda et coll. pour obtenir les dérivés de D-glucose, à l'obtention des dérivés de *N*-acétyl-D-glucosamine. Dans un premier temps, il a été mis en évidence que le traitement en milieu acide efficace dans le cas de dérivés de D-glucose, entraînait la formation d'un dérivé de D-glucosamine lorsque le monosaccharide de départ est la *N*-acétyl-D-glucosamine. Le traitement des dérivés de GlcNAc n'est donc pas envisageable par cette méthode. Toutefois, la méthode de synthèse sans utilisation de traitement en milieu acide, nous a permis d'obtenir trois molécules amphiphiles ayant des longueurs de chaîne alkyle variable (6, 12, ou 16 atomes de carbone) qui n'ont pas été décrites dans la littérature à ce jour. Ces composés sont des bruts réactionnels qui n'ont pas subi le traitement en milieu acide. Ils ont été caractérisés par spectrométrie RMN et par spectrométrie de masse. Les différents composés obtenus avec ou sans traitement en milieu acide sont représentés sur la Figure 31.

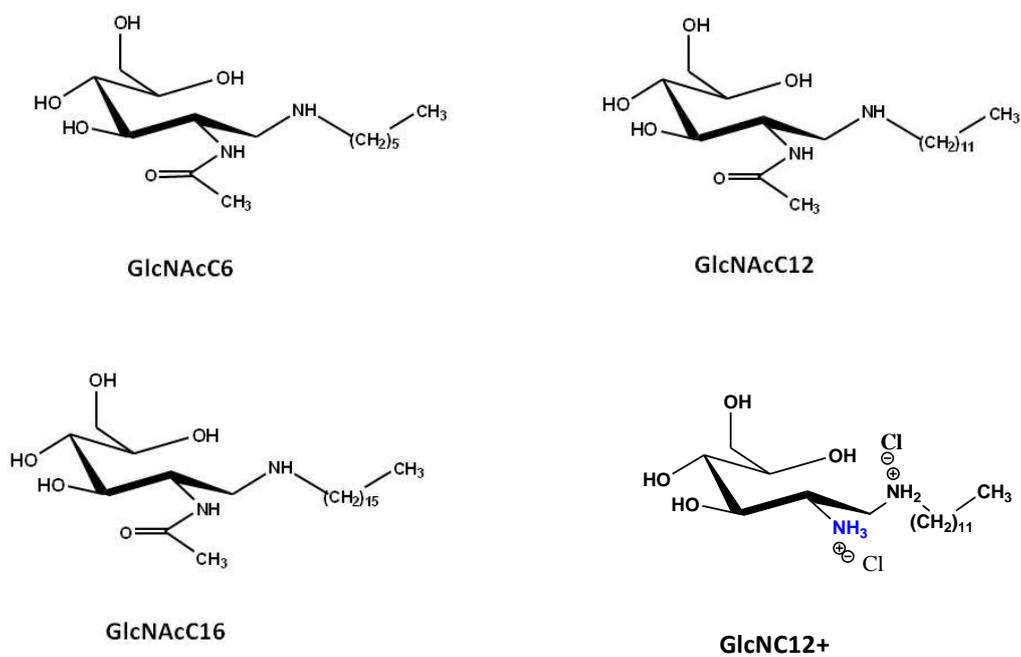


Figure 31: Représentation des composés obtenus à partir de la N-acétyl-D-glucosamine par la voie de synthèse utilisée par Tokuda et coll. avec (composé GlcNC12+) ou sans traitement en milieu acide (composés GlcNAcC6, GlcNAcC12, et GlcNAcC16)

Conclusion

L'objectif de cette étude a été de synthétiser des molécules amphiphiles monocaténares modèles afin d'étudier par la suite la relation entre leur structure et leur comportement physico-chimique en solution aqueuse. Deux monosaccharides ont été utilisés : le D-glucose et la *N*-acétyl-D-glucosamine. La longueur de la chaîne hydrophobe a été ajustable à 6, 12 ou 16 atomes de carbone.

La voie de synthèse par amination réductrice selon la méthode décrite par Tokuda et coll. a été utilisée dans ce travail. Cette méthode peut être décomposée en deux étapes : (i) une première étape d'amination réductrice du monosaccharide en présence de l'alkylamine conduisant à la formation du composé sous forme chlorhydrate après un traitement acide pour éliminer les résidus de l'agent réducteur utilisé ; puis (ii) une deuxième étape dans laquelle le composé sous forme chlorhydrate est neutralisé en milieu basique pour conduire au produit attendu.

Dans notre étude, nous avons pu observer une différence lors de la tentative d'accès aux molécules amphiphiles en fonction de la nature du monosaccharide. Dans le cas du D-glucose, la molécule amphiphile ainsi que son dérivé chlorhydrate ont été parfaitement caractérisés à la fois par spectroscopies de RMN ^1H et ^{13}C et spectrométrie de masse ESI. Les rendements des dérivés en C6, C12 et C16 sont respectivement de 60, 70 et 65%. Dans le cas de la *N*-acétyl-D-glucosamine, les dérivés ont pu être obtenus avec trois longueurs de chaîne alkyle (Figure 32c). Nous avons mis en évidence la nécessité de remplacer le traitement en milieu acide qui a entraîné la formation du composé *N*-désacétylé (Figure 32b). La méthode de synthèse utilisée permet ainsi dans le cas du D-glucose et de la *N*-acétyl-D-glucosamine, d'avoir accès à des molécules amphiphiles dont la longueur de chaîne alkyle est ajustable.

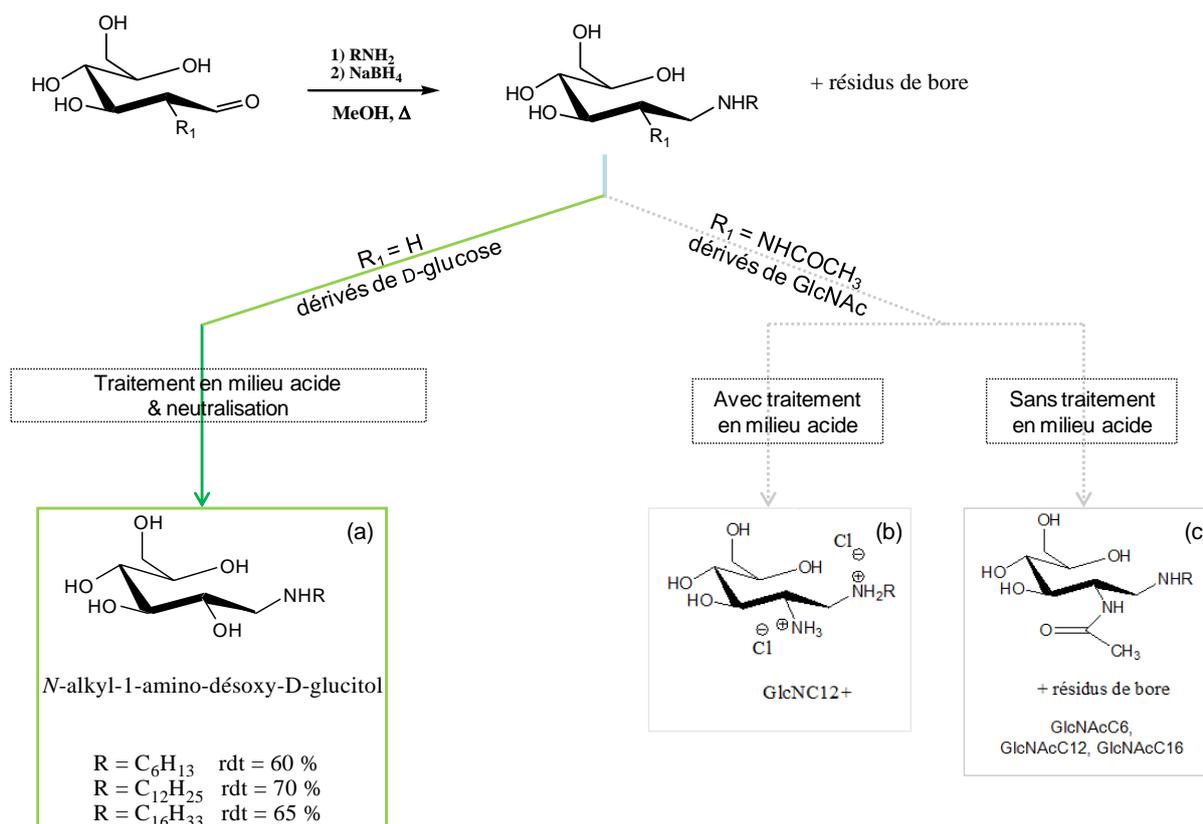


Figure 32: Schéma des résultats de la synthèse et caractérisation de molécules amphiphiles monocaténaire dérivées de D-glucose (a) et à partir de N-acétyl-D-glucosamine (b) et (c).

Concernant les perspectives de ce travail de synthèse, l'accès aux dérivés de N-acétyl-D-glucosamine pourrait être envisagé par une voie de synthèse ne nécessitant pas l'utilisation d'un agent réducteur à base de borohydrure, par exemple grâce à la réduction par hydrogénation catalytique (Etude bibliographique, II.7.2). De ce fait, cette méthode permettrait de s'affranchir de la nécessité d'éliminer les résidus de bore formés et ainsi d'obtenir des dérivés exempts de cette impureté.

En outre, étant donné la pureté et les rendements satisfaisants obtenus avec les molécules amphiphiles dérivées de D-glucose, le chapitre suivant concernera l'étude de la relation entre la structure et le comportement physico-chimique en solution aqueuse avec ces molécules amphiphiles.

Partie expérimentale

A- Informations générales sur les réactifs chimiques utilisés

Les principaux réactifs chimiques utilisés durant ce travail sont commerciaux. Les informations concernant leurs puretés et fournisseurs sont regroupés dans le tableau 5. Les solvants commercialisés par les sociétés Sigma-Aldrich, Fluka et Acros ont été utilisés sans purification supplémentaire. Concernant le méthanol deutéré (CD₃OD 100%) utilisé pour la spectroscopie de RMN, il a été fourni par la société Euriso-top.

Tableau 6: Fournisseurs et puretés des principaux réactifs utilisés

Réactifs	Fournisseurs	Pureté
D-glucose	Sigma-Aldrich	99.5 %
N-acétyl-D-glucosamine	Sigma-Aldrich	99.0 %
Hexylamine	Sigma-Aldrich	99.0 %
Dodécylamine	Sigma-Aldrich	98.0 %
Hexadécylamine	Sigma-Aldrich	98.0 %
Borohydrure de sodium	Fluka	99.0 %

B- Techniques de caractérisations

Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison (69).

Résonance magnétique nucléaire

Les analyses de spectroscopies de RMN ont été réalisées soit au Service de RMN Polymères (INSA de Lyon, Institut de chimie de Lyon) soit au Centre Commun de RMN (CPE Lyon, Institut de chimie de Lyon) à Villeurbanne (69). Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur les appareils Bruker Avance II 250 (250 MHz), Bruker ALS 300 (300 MHz), Bruker Avance III 400 (400 MHz), et Bruker AV500 Avance III (500 MHz). Les déplacements

chimiques ont été mesurés en ppm en utilisant comme référence interne le tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz). Les abréviations utilisées pour nommer les représentations sont : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), m (multiplet). La numérotation de la partie saccharide est constituée de chiffres allant de 1 à 6 et la numérotation de la partie alkyle est constituée de chiffres allant de 1' à 6' (dérivé hexyle), de 1' à 12' (dérivé dodécyle) ou 1' à 16' (dérivé hexadécyle).

Spectrométrie de masse

Les analyses ont été réalisées soit :

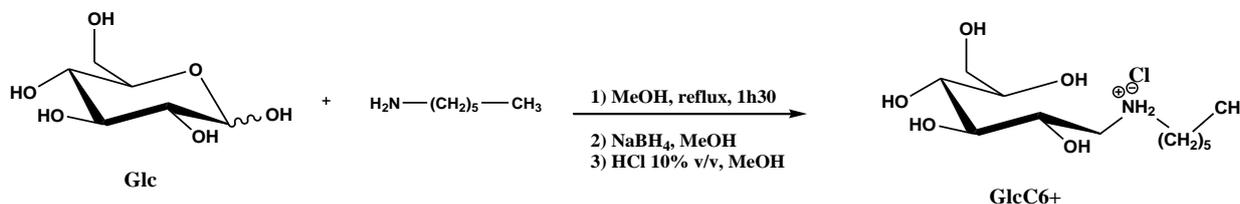
- Au centre commun de spectrométrie de masse de l'UCBL 1 sur un spectromètre de masse micrOTOF-Q II. Les paramètres sont les suivants: mode positif ; basse résolution ; débit 50 μ L/min, température de désolvatation = 200°C. La préparation des échantillons a consisté à dissoudre 1mg de chaque échantillon dans 1 mL de MeOH, et l'analyse a été réalisée avec 10 μ L de cette solution + 1 mL d'un mélange de solvants (= MeOH 300, Dichlorométhane 250, H₂O 100, HCO₂H 0,65). (Analyse nommée A).
- Ou bien sur un spectromètre LCQ de chez ThermoFinnigan (THERMOLCQ Advantage[®], 50 à 2000 m/z) à trappe ionique. Les paramètres sont les suivants : mode positif, basse résolution, Température de désolvatation = 200°C, débit 50 μ L/min. La préparation des échantillons a consisté à dissoudre chaque échantillon dans 1 mL d'un mélange de solvants (= MeOH 300, Dichlorométhane 250, H₂O 100, HCO₂H 0,65) (Analyse nommée B).

C- Protocoles expérimentaux de synthèses des molécules amphiphiles

↻ N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC6+)

Le D-glucose (1.8 g ; 0.01 mol) et l'hexylamine (0.77 mL ; 0.01 mol) sont chauffés à reflux pendant 1h30 dans 15 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH₄ (0.76 g ; 0.02 mol) est ajouté à la solution, qui est ensuite chauffée à reflux pendant 20 minutes. Le solvant est évaporé et une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) est ajoutée, puis évaporée. Après trois co-évaporations successives, le résidu

solide est recristallisé dans le méthanol. Le produit GlcC6⁺ est obtenu sous forme de poudre blanche (m = 2.34 g ; rendement molaire = 88 %).



RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) : δ (ppm) 4.05 (m, 1H, H2), 3.84 (m, 1H, H3), 3.78 (m, 1H, H6b), 3.75 – 3.60 (m, 3H, H4, H5, H6a) 3.17 (m, 2H, H1), 3.00 (m, 2H, H1'); 1.71 (m, 1H, H2'); 1.32 (6H 3CH₂); 0.93 (t, J = 6,7 Hz, 3H, CH₃).

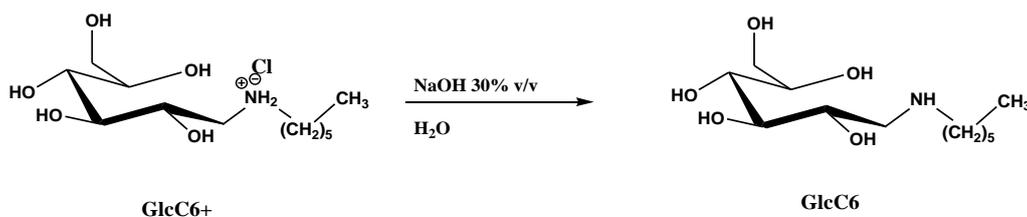
RMN ¹³C (CD₃OD; 75 MHz) : δ (ppm) 73.0 (1CH, C5); 72.2, 72.1 (2CH, C3 et C4); 69.8 (1CH, C2); 64.7 (1CH₂, C6); 50.9 (1CH₂, C1); 49.1 (1CH₂, C1'); 32.4, 27.8, 27.6, 23.5 (4CH₂, C2'-C5'); 14.6 (1CH₃, C6').

Spectrométrie de masse ESI (+) (analyse selon A) (m/z): [M+H]⁺ = 266.2 ; [M+Na]⁺ = 288.2; [M+H-18]⁺ = 248.2

Analyse élémentaire : calculée pour C₁₂H₂₈NO₅Cl : (%C) 47.76 ; (%H) 9.35 ; (%N) 4.64 ; (%Cl) 11.75 ; trouvée : (%C) 26.19 ; (%H) 5.25 ; (%N) 2.35 ; (%Cl) 26.35.

↪ N-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6)

Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 30% (m/m) (0.3 mL) est ajoutée à une à 10 mL d'une solution aqueuse du composé GlcC6⁺ (0.77 g ; 2 mmol). Le précipité formé est filtré puis lavé plusieurs fois à l'eau. Le composé GlcC6 est obtenu sous forme de poudre blanche après recristallisation dans le méthanol (m = 0.466 g ; rendement molaire = 68 % ; rendement molaire total : 60 %).



RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.86 (m, 1H, H2), 3.78 (m, 1H, H6b), 3.75 (m, 1H, H3), 3.68 (m, 1H, H5), 3.61 (m, 2H, H6a, H-4), 2.73 (m, 2H, H1), 2.59 (m, 2H, H1'); 1.52 (m, 1H, H2'); 1.33 (s, 6H, 3CH₂); 0.91 (t, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

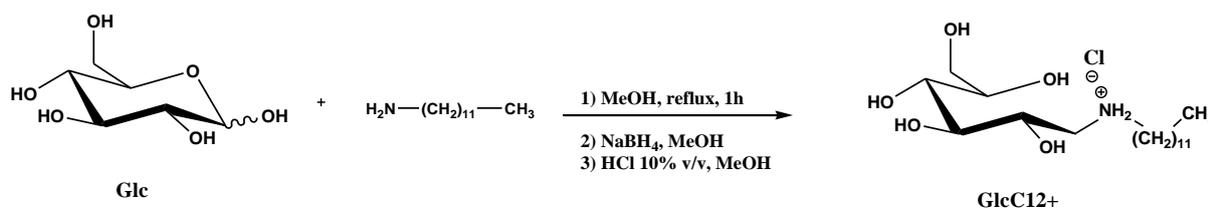
RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) : δ (ppm) 73.0, 72.9, 72.6, 72.5 (4CH, C2, C3, C4, C5); 65.0 (1CH₂, C6); 52.4 (1CH₂, C1); 50.7 (1CH₂, C1'); 33.0, 30.0, 28.1, 23.7, (4CH₂, C2'-C5'); 14.4 (1CH₃, C6').

Spectrométrie de masse ESI (+) (analyse selon A) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 266.2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 288.2$

Analyse élémentaire : calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{NO}_5$: (%C) 54.32 ; (%H) 10.26 ; (%N) 5.28 ; (%Cl) 0 ; trouvée: (%C) 49.56 ; (%H) 9.61 ; (%N) 5.05 ; (%Cl) 6.00

↪ N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC12+)

Le D-glucose (1.8 g ; 0.01 mol) et la dodécylamine (1.85 g ; 0.01 mol) sont chauffés à reflux pendant 1h dans 15 mL de méthanol. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et l'agent réducteur NaBH_4 (0.76 g ; 0.02 mol) est ajouté. Après la complète addition de NaBH_4 , la solution est chauffée à reflux pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant, une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) (5 mL) est ajoutée puis co-évaporée. Cette opération de co-évaporation est répétée trois fois. Le produit GlcC12+ obtenu est recristallisé dans le méthanol, puis séché sous vide (poudre blanche ; m = 3.22 g ; rendement molaire = 92 %).



RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) : δ (ppm) 4.05 (m, 1H, H2); 3.84 (m, 1H, H3); 3.68 (m, 1H, H6b); 3.72 – 3.62 (m, 3H, H4, H5, H6a) ; 3.16 (m, 2H, CH₂-NH, H1), 3.01 (m, 2H, NH-CH₂, H1'); 1.71 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-(CH₂)₉, H2'); 1.31 (m, 18H, 9CH₂); 0.89 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₃).

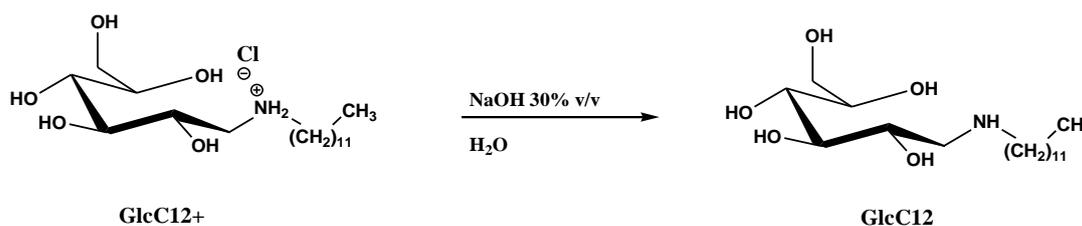
RMN ¹³C (CD₃OD, 75 MHz) : δ (ppm) 73.2 (1CH, C5); 72.2 (2CH, C3 et C4); 69.8 (1CH, C2); 64.7 (1CH₂, C6); 50.9 (1CH₂, C1); 49.7 (1CH₂, C1'); 33.1, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 27.6, 27.1, 23.8 (10CH₂, C2'-C11'); 14.5 (1CH₃, C12').

Spectrométrie de masse ESI (+)(analyse selon A) (m/z): [M+H]⁺ = 350.3

Analyse élémentaire : calculée pour C₁₈H₄₀NO₅Cl : (%C) 56.01 ; (%H) 10.45 ; (%N) 3.63 ; (%Cl) 9.19 ; trouvée : (%C) 55.73 ; (%H) 10.63 ; (%N) 4.09 ; (%Cl) 11.85

↪ N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)

Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 30% (m/m) (0.3 mL) a été ajoutée à une 10 mL d'une solution aqueuse du composé GlcC12+ (0.77 g ; 2 mmol). Le précipité formé est filtré puis lavé plusieurs fois à l'eau. Le composé GlcC12 est obtenu sous forme de poudre blanche après recristallisation dans le méthanol ((m = 0.640 g ; rendement molaire= 65% ; rendement molaire total = 70 %).



RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.88 (m, 1H, H2), 3.79 (m, 1H, H3) 3.72 (m, 1H, H6b), , 3.69 (m, 1H, H5), 3.61 (m, 2H, H6a, H-4), 2.75 (m, 2H, H1), 2.65 (m, 2H, H1'); 1.52 (m, 2H, H2'); 1.28 (s, 18H, H3'-H11', 9CH₂); 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H12', CH₃).

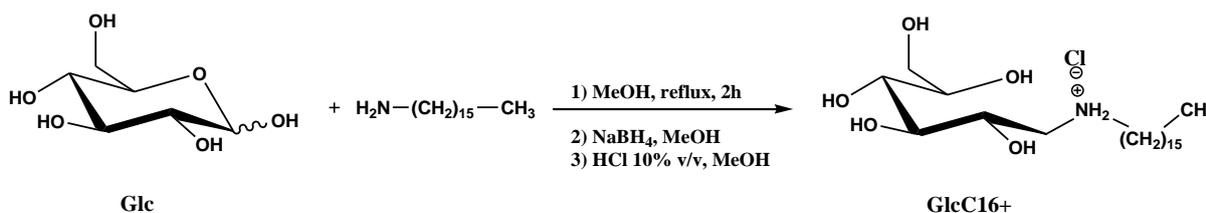
RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) : δ (ppm) 73.2 (1CH, C5); 73.0, 72.9, 72.8 (3CH, C2, C3, C4); 65.1 (1CH₂, C6); 52.6 (1CH₂, C1); 50.7 (1CH₂, C1'); 33.0, 30.7, 30.6, 30.4, 28.4, 23.6 (10CH₂, C2'-C11'); 14.3 (1CH₃, C12').

Spectrométrie de masse ESI (+)(analyse selon A) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 350.3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 372.3$

Analyse élémentaire : calculée pour: $\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_5$: (%C) 61.86 ; (%H) 11.25 ; (%N) 4.01 ; (%Cl) 0 ; trouvée : (%C) 60.23 ; (%H) 11.28 ; (%N) 4.27 ; (%Cl) 0

➤ N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol sous forme chlorhydrate (GlcC16+)

Le D-glucose (1.8 g ; 0.01 mol) et l'hexadécylamine (2.41 g ; 0.01 mol) sont chauffés à reflux pendant 2h dans 15 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH_4 (0.76 g ; 0.02 mol) est ajouté à la solution, qui est ensuite chauffée à reflux pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant sous pression réduite, une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) (5 mL) est ajoutée puis co-évaporée. Après trois co-évaporations successives, le résidu obtenu est recristallisé dans le méthanol et le composé GlcC16+ est obtenu sous forme de poudre blanche (m = 3.70 g ; rendement molaire = 91%).



RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 4.02 (m, 1H, H2), 3.83 (m, 1H, H3), 3.78 (m, 1H, H6b), 3.74 – 3.60 (m, 3H, H4, H5, H6a) 3.10 (m, 2H, H1), 2.94 (m, 2H, H1'); 1.67 (m, 1H, H2'); 1.30 (m, 18H, 9CH₂); 0.89 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

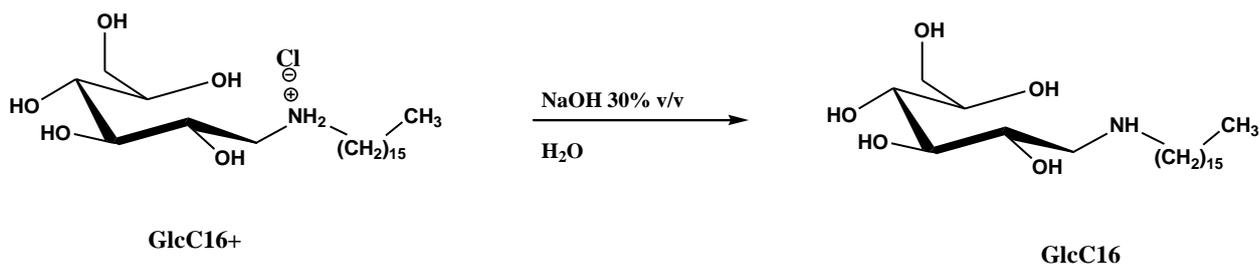
RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) : δ (ppm) 73.3 (1CH, C5); 72.7, 72.5 (2CH, C3, C4); 70.1 (1CH, C2); 64.9 (1CH₂, C6); 51.4 (1CH₂, C1); 49.5 (1CH₂, C1'); 33.1, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 27.7, 27.5, 23.7 (14CH₂, C2'-C15'); 14.7 (1CH₃, C16').

Spectrométrie de masse ESI (+)(analyse selon A) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 406.4$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 428.3$

Analyse élémentaire : calculée pour: $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{NO}_5\text{Cl}$: (%C) 59.77 ; (%H) 10.94 ; (%N) 3.17 ; (%Cl) 8.02 ; trouvée : (%C) 59.29 ; (%H) 11.01 ; (%N) 3.41 ; (%Cl) 10.87

↪ N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16)

Le composé GlcC16+ (0.81 g ; 2 mmol) est solubilisé à chaud (60°C) dans 10 mL d'une solution aqueuse, puis une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 30% (m/m) (0.3 mL) est ajoutée à température ambiante. Le précipité formé est filtré puis lavé plusieurs fois à l'eau. Le composé GlcC16 est obtenu sous forme de poudre blanche après recristallisation dans le méthanol (m = 0.737 g ; rendement molaire= 73% ; rendement molaire total = 65 %).



RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.88 (m, 1H, H-2), 3.83 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-6b), 3.75 (m, 1H, H-3), 3.68 (m, 1H, H-5), 3.63 (m, 2H, H-6a, H-4), 2.74 (m, 2H, H-1), 2.61 (m, 2H, H-1'); 1.52 (m, 1H, H-2'); 1.30 (m, 26H, 13CH₂); 0.90 (t, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

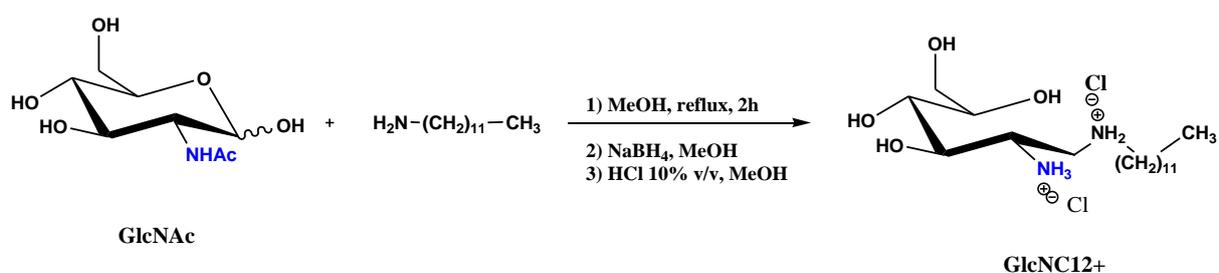
RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) : δ (ppm) 73.2 (1CH, C5), 73.0, 72.9, 72.8 (3CH, C2, C3, C4); 65.1 (1CH₂, C6); 52.6 (1CH₂, C1); 50.7 (1CH₂, C1'); 33.0, 30.7, 30.6, 30.4, 28.4, 23.6 (14CH₂, C2'-C15'); 14.3 (1CH₃, C16').

Spectrométrie de masse ESI (+)(analyse selon A) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 406.4$; $[\text{M}+\text{K}]^+ = 434.4$

Analyse élémentaire : calculée pour: $\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{NO}_5$: (%C) 65.15 ; (%H) 11.68 ; (%N) 3.45 ; (%Cl) 0 ; trouvée : (%C) 62.59 ; (%H) 11.39 ; (%N) 3.54 ; (%Cl) 3.14

↻ N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-2-amino-2-désoxy-D-glucitol (GlcNC12+)

La N-acétyl-D-glucosamine (1.1 g ; 0.005 mol) et la dodécylamine (0.92 g ; 0.005 mol) sont chauffées à reflux pendant 2h dans 70 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH_4 (0.38 g ; 0.01 mol) est ajouté à la solution qui est ensuite chauffée à reflux pendant 30 minutes. Après évaporation du solvant, une solution méthanolique de HCl à 10% (v/v) (5 mL) est ajoutée puis co-évaporée. Après trois co-évaporations successives, le résidu solide obtenu est recristallisé dans le méthanol et le produit GlcNC12+ est obtenu sous forme d'une poudre blanche (m = 0.899 g ; rendement molaire = 52 %).



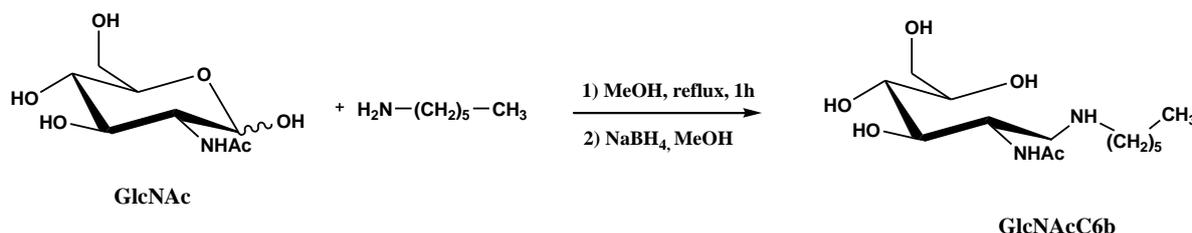
RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 4.04 (1H, dd, $J_{3-2} = 6.0$ Hz, $J_{3-4} = 1.6$ Hz, H3) ; 3.9-3.6 (5H, m, H1, H5 et H6) ; 3.57 (1H, dd, $J_{4-3} = 1.6$ Hz, $J_{4-5} = 8.2$ Hz, H4) ; 3.40 (1H, dd, $J_{2-3} = 6.5$ Hz, $J_{2-1} = 6.6$ Hz, H2) ; 2.91 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H1') ; 1.65 (2H, m, H2') ; 1.29 (18H, m, H3'-H11') ; 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H12').

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) : δ (ppm) 73.1 (1CH, C4); 72.7 (1CH, C5); 67.9 (1CH₂, C3); 64.6 (1CH, C6); 60.5 (1CH₂, C1); 57.3 (1CH, C2); 40.8 (1CH₂, C1'); 33.1-30.8-30.7-30.6-30.5-30.4-30.2-28.6-27.5-23.7 (10CH₂, C2'-C11'); 14.4 (1CH₃, C12').

Spectrométrie de masse ESI (+) (analyse selon B) (m/z): [GlcNC12(+)+H]⁺ = 349.3; [dodécylamine+H]⁺ = 186.2; [GlcNC12(+)+2Na]⁺ = 397.4

↪ N-hexyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol (GlcNAcC6b)

La N-acétyl-D-glucosamine (0.99 g ; 0.005 mol) et l'hexylamine (0.52 g ; 0.005 mol) sont chauffées à reflux pendant 1h dans 20 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH₄ (0.25 g ; 0.007 mol) est ajouté à la solution, qui est ensuite agitée pendant 20 minutes à température ambiante puis 45 minutes à reflux. Après évaporation du solvant, le produit GlcNAcC6b obtenu sous forme de poudre blanche (m = 1.26 g ; rendement molaire brut = 82 %).



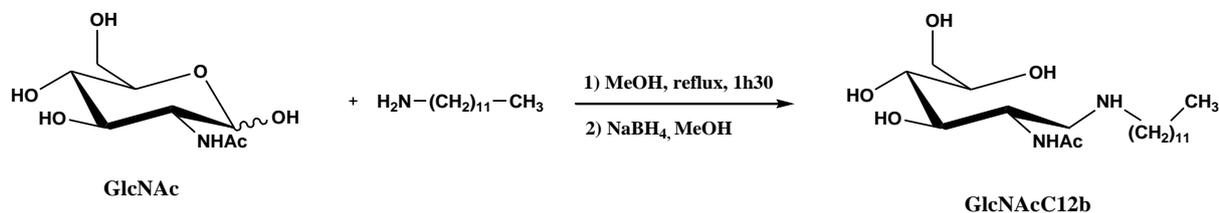
RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.42-4.27 (m, 6H, H2-H6) ; 2.77 (m, 1H, H1); 2.59 (m, 2H, H1') ; 1.98 (m, 4H, H7) ; 1.49 (m, 2H, H2') ; 1.31 (m, 6H, H3'-H5',3CH₂) ; 0.90 (t, 3H, H6', J= 6.8 Hz).

Spectrométrie de masse ESI (+) (analyse selon B) (m/z): [M+H]⁺= 307.2; 2[M+Na]⁺ = 635.0

↪ N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol (GlcNAcC12b)

La N-acétyl-D-glucosamine (0.99 g ; 0.005 mol) et la dodécylamine (0.93 g ; 0.005 mol) sont chauffées à reflux pendant 1h30 dans 20 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH₄ (0.25 g ; 0.007 mol) est ajouté à la solution,

qui est ensuite agitée pendant 20 minutes à température ambiante puis 45 minutes à reflux. Après évaporation du solvant, le produit GlcNAcC12b est obtenu sous forme de poudre blanche ($m = 1.45 \text{ g}$; rendement molaire brut = 74 %).

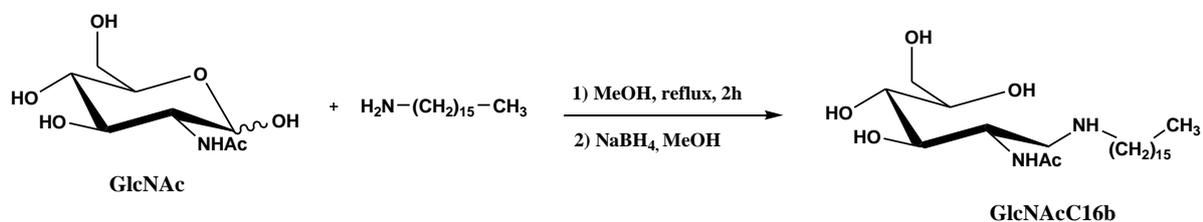


RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.42-4.33 (m, 6H, H2-H6) 2.78 (m, 1H, H1); 2.59 (m, 2H, H1'); 1.99 (m, 3H, H7) ; 1.50 (m, 2H,H2'); 1.29 (m, 18H,H3'-H11',9 CH_2); 0.89 (t, 3H, H12', J= 6.8 Hz).

Spectrométrie de masse ESI (+)(analyse selon B) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 391.3$; 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 803.2$

↪ N-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol (GlcNAcC16b)

La N-acétyl-D-glucosamine (0.99 g ; 0.005 mol) et l'hexadécylamine (1.21 g ; 0.005 mol) est chauffées à reflux pendant 2h dans 50 mL de méthanol. Après refroidissement à température ambiante, l'agent réducteur NaBH_4 (6.52 mmol) est ajouté à la solution, qui est ensuite agitée à température ambiante pendant 20 minutes puis à reflux pendant 45 minutes. Après évaporation du solvant, le composé GlcNAcC16b est obtenu sous forme de poudre blanche ($m = 1.05 \text{ g}$; rendement molaire brut = 47 %).



RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) : δ (ppm) 3.40-4.14 (m, 6H, H2-H6) ; 2.77 (m, 1H, H1); 2.60 (m, 2H, H1'); 1.99 (m, 3H, H7); 1.50 (m, 2H, H2'); 1.28 (m, 26H, H3'-H15', 13CH₂) 0.89 (t, 3H, H16', J= 6.8 Hz).

Spectrométrie de masse ESI (+) (analyse selon B) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 447.3$.

Références bibliographiques

1. Gazaliev, A.; Nurkenov, O.; Kulakov, I.; Ainabaev, A.; Bessonov, D. Synthesis and fungicidal activity of alkaloid-containing carbohydrates. *Russian Journal of Applied Chemistry* **2006**, *79* (3), 508-510.
2. Retailleau, L.; Laplace, A.; Fensterbank, H.; Larpent, C. Synthesis, Structural Analysis, and Properties of N-Alkylglucosyl(meth)acrylamides New Reactive Sugar Surfactants. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (3), 608-617.
3. Peter, K.; Vollhardt, C.; Schore, N. E. Les glucides. In *Traité de chimie organique*, De Boeck Supérieur ed.; 2004; p 1334.
4. Schuur, B.; Wagenaar, A.; Heeres, A.; Heeres, E. H. J. A synthetic strategy for novel nonsymmetrical bola amphiphiles based on carbohydrates. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (6), 1147-1153.
5. Latge, P.; Rico, I.; Garelli, R.; Lattes, A. Synthesis of Long-Chain N-Alkylactylamines from Unprotected Lactose A New Series of Nonionic Surfactants. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1991**, *12* (3-4), 227-237.
6. Sato, S.; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Kikugawa, Y. One-pot reductive amination of aldehydes and ketones with picoline-borane in methanol, in water, and in neat conditions. *Tetrahedron* **2004**, *60* (36), 7899-7906.
7. Tokuda, T.; Ikeda, S.; Kubota, Y. Control of plant virus diseases. US4269855, 1982.
8. Van Doren, H. A.; Terpstra, K. R. Structure-Property relationships in D-glucitol derivatives with two geminal hydrocarbon chains. *J. Mater. Chem.* **1995**, *5* (12), 2153-2160.
9. Ramsch, R.; Cassel, S.; Rico-Lattes, I. Impact of Solvent Physical Parameters on the Aggregation Process of Catanionic Amphiphiles. *Langmuir* **2009**, *25* (12), 6733-6738.

CHAPITRE III

CHAPITRE III :

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS D'AUTO-ASSOCIATION

DES MOLECULES AMPHIPHILES

DERIVEES DE D-GLUCOSE

SEULES OU EN MELANGE AVEC UN PHOSPHOLIPIDE

SOMMAIRE

Introduction	141
I. Etude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose .	142
I.1. Introduction.....	142
I.2. Assemblages de <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)	143
I.2.1. Détermination de la concentration d'agrégation critique du <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)	143
I.2.2. Méthode de préparation des assemblages.....	147
I.2.3. Etude de la taille et de la stabilité des assemblages par QELS.....	147
I.2.4. Etude de la morphologie des assemblages par MET.....	149
I.2.5. Détermination de la structure des assemblages par SAXS	150
I.2.5.1. <i>Choix de la concentration optimale en GlcC12</i>	151
I.2.5.2. <i>Comparaison de trois lots de GlcC12</i>	152
I.2.5.3. <i>Modélisation des résultats expérimentaux</i>	154
I.3. Influence de la longueur de chaîne sur la nature des assemblages formés	163
I.3.1. Détermination des concentrations d'agrégation critique.....	164
I.3.2. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par QELS.....	167
I.3.3. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par MET.....	168
I.3.4. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par SAXS.....	170
I.4. Conclusion	174
II. Etude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles (GlcC6, GlcC12 et GlcC16) avec un phospholipide (DPPC)	176
II.1. Introduction.....	176
II.2. Evolution de la taille des assemblages de DPPC/GlcC12 par QELS	178
II.3. Etude de la morphologie des assemblages de DPPC/GlcC12 par MET	180
II.4. Etude de la structure des assemblages de DPPC/GlcC12 par SAXS	182
II.4.1. Modélisation des résultats obtenus	184
II.4.1.1. <i>Modélisation selon le modèle de vésicule</i>	184
II.4.1.2. <i>Modélisation selon le modèle de micelle sphérique ou ellipsoïdale</i>	188
II.4.2. Effet de la température sur les assemblages	189
II.5. Influence de la longueur de chaîne de la molécule amphiphile dans les mélanges avec la DPPC	191
II.5.1. Mélange avec le <i>N</i> -hexyl-1-amino-désoxy-D-glucitol (GlcC6)	191

II.5.2. Mélange avec le <i>N</i> -hexadécyl-1-amino-désoxy-D-glucitol (GlcC16).....	193
II.6. Conclusion	196
Conclusion	197
Partie expérimentale	199
Références	202

Introduction

Dans le chapitre précédent, plusieurs molécules amphiphiles ont été synthétisées, avec comme saccharide constitutif le D-glucose ou la N-acétyl-D-glucosamine, et comme chaîne hydrophobe un groupement alkyle à six, douze ou seize atomes de carbone. Parmi ces deux types de molécules amphiphiles, seules les espèces à base de D-glucose ont été synthétisées avec des puretés ainsi que des rendements satisfaisants. De ce fait, les analyses physico-chimiques et l'examen des propriétés auto-associatives décrites dans ce chapitre ont été réalisées uniquement sur ces composés.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude du comportement physico-chimique du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12) en solution aqueuse, puis à l'influence de la longueur de la chaîne hydrophobe sur le comportement de la molécule amphiphile correspondante (GlcC6 et GlcC16). La seconde partie décrit quant à elle l'évolution de la nature des systèmes moléculaires organisés, en fonction de la proportion de GlcC12 en mélange avec un phospholipide modèle, la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC). Cette partie présente également l'influence de la longueur de chaîne de la molécule amphiphile synthétisée dans les mélanges DPPC/molécule amphiphile sur la nature des assemblages (Figure 1).

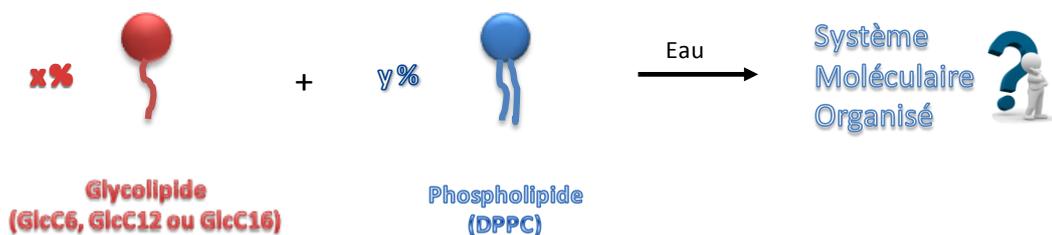


Figure 1: Illustration des formulations de phospholipide/molécule amphiphile étudiées dans ce chapitre (avec x% et y%, les pourcentages molaires de chacune des deux espèces)

I. Etude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose

I.1. Introduction

Dans la littérature, l'auto-association des molécules amphiphiles est généralement caractérisée par plusieurs techniques complémentaires. D'une part, les propriétés tensioactives des molécules amphiphiles en solution aqueuse sont déterminées grâce à des mesures de tension de surface à l'aide d'un tensiomètre¹⁻³ ou encore des mesures de grandeurs thermodynamiques par microcalorimétrie de titration isotherme^{4,5}. D'autre part, la technique de diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS)⁶ permet de mesurer la taille et la distribution en taille des assemblages formés en solution. Leur morphologie peut, quant à elle, être évaluée par microscopie électronique en transmission (MET)^{7,8}, qui peut être couplée à une méthode de cryofracture⁶. Les techniques de diffusion des rayons X^{2,9,10} ou des neutrons^{11,12} aux petits angles (respectivement SAXS et SANS), apportent des informations très complémentaires concernant l'organisation structurale des assemblages.

En conséquence, les techniques choisies dans ce travail pour caractériser le *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12) en solution aqueuse, ont été la tensiométrie, qui permet d'accéder aux concentrations d'agrégation critiques (CAC), ainsi que la QELS et la MET, afin d'obtenir une notion de la morphologie des assemblages. Cette étude a été complétée par des analyses SAXS pour déterminer la nature et les dimensions caractéristiques des assemblages formés. Une étude similaire a été ensuite réalisée avec le *N*-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6) et le *N*-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16) afin de préciser l'influence de la longueur de la chaîne hydrophobe sur le comportement du composé amphiphile correspondant en solution aqueuse.

I.2. Assemblages de N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)

I.2.1. Détermination de la concentration d'agrégation critique du N-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12)

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration d'un composé amphiphile permet de déterminer sa concentration d'agrégation critique (CAC) à partir de laquelle les assemblages se forment en solution, à une température et dans un solvant donnés. Dans la littérature, les méthodes standards de l'anneau de DuNoüy^{1,13} et de la lame de Wilhelmy¹⁴⁻¹⁶ sont utilisées lors de la détermination de la tension de surface par un tensiomètre. Contrairement à la méthode de l'anneau de DuNoüy qui nécessite l'utilisation de corrections liées à la forme de l'anneau, nous avons choisi d'employer la méthode de la lame de Wilhelmy qui n'en requiert aucune^{17,18} (Annexe 2). Cette méthode consiste à étudier le comportement de la surface d'un liquide en fonction de la quantité de molécules amphiphiles présentes en solution. Pour cela, une lame de platine de surface connue, suspendue à une balance de précision, est plongée dans une solution contenant les molécules amphiphiles. Ensuite, la lame est remontée jusqu'à ce que l'extrémité inférieure affleure la surface du liquide, et la balance, intégrée à l'appareil, mesure alors la résultante des forces s'exerçant à ce moment précis (Figure 2).

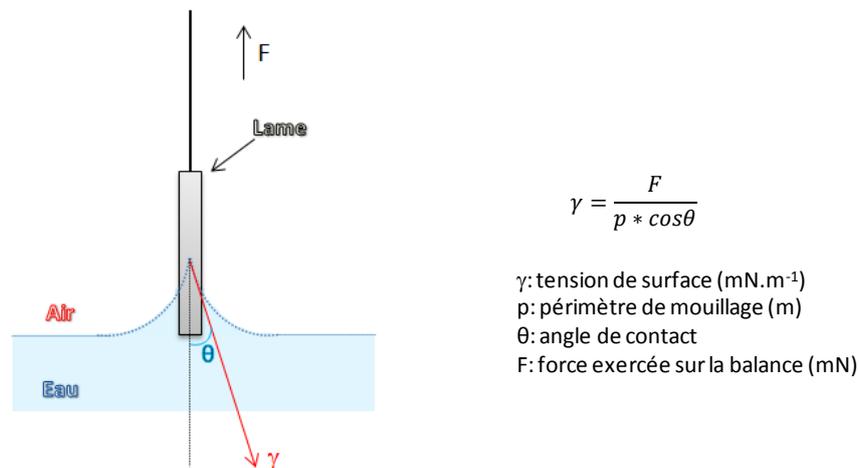


Figure 2: Schéma illustrant la mesure de la tension superficielle par la méthode de la lame de Wilhelmy (d'après la fiche technique de la société Krüss¹⁷)

La lame en platine assure un mouillage parfait du liquide sur la surface de la lame (angle de contact nul entre la lame et le liquide), et entraîne ainsi la valeur de $\cos \theta = 1$. Ainsi, la tension de surface dépend uniquement de la force exercée sur la balance et du périmètre de mouillage. La représentation graphique de l'évolution de la tension de surface en fonction du logarithme de la concentration des molécules amphiphiles en solution permet la détermination de la CAC au niveau du point de rupture de pente comme représenté en Figure 4.

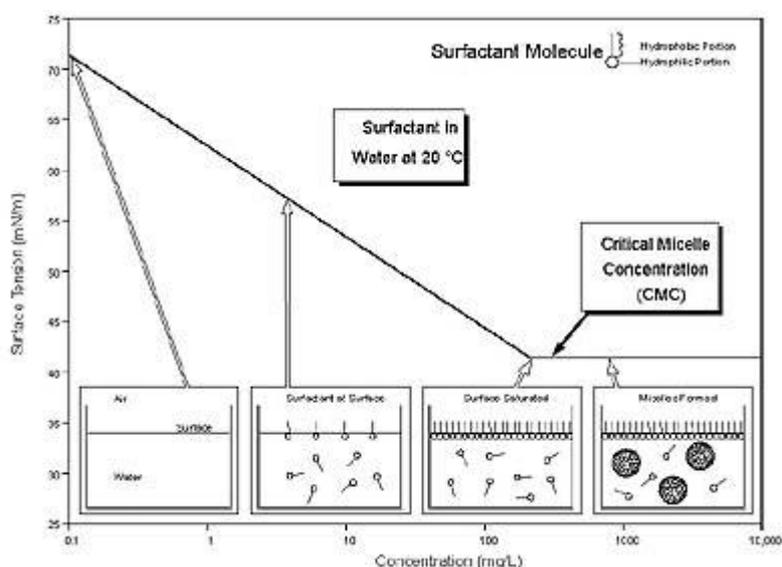


Figure 3: Illustration de la détermination de la concentration à partir de laquelle les assemblages se forment en solution (tirée de la fiche technique de la société Krüss¹⁹)

Sur le plan expérimental, la technique de mesure dite « CMC inverse » a été choisie pour déterminer la CAC du composé GlcC12 en solution aqueuse à 25°C car elle permet l'utilisation d'une concentration initiale minimale en molécule amphiphile ($c_{\text{GlcC12}} = 0.07 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} = 24.5 \text{ mg.L}^{-1}$) (vis-à-vis de sa faible solubilité à température ambiante). Cette méthode consiste à diluer progressivement, par ajout de solvant, une solution de tensioactifs préalablement dissous dans un cristallisateur. La rupture de pente sur la courbe du GlcC12 (Figure 4) a été observée à 0.04 mM (13.5 mg.L⁻¹). En outre, les résultats confirment que la molécule amphiphile GlcC12 possède des propriétés tensioactives étant donné qu'elle

abaisse la tension de surface (γ) de l'eau de $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à $23 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à partir de 0.04 mM (Figure 4).

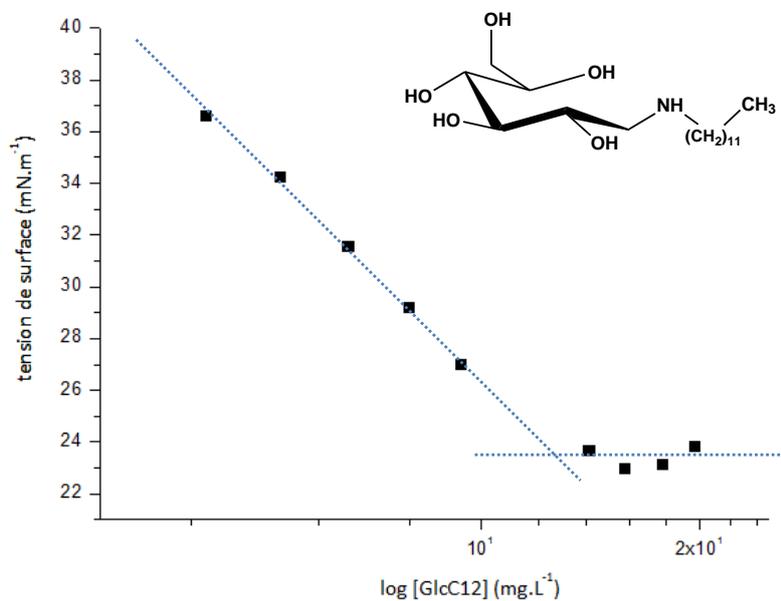
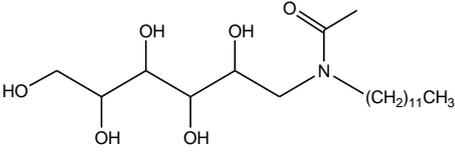
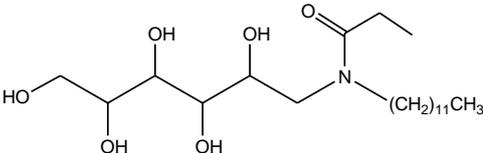
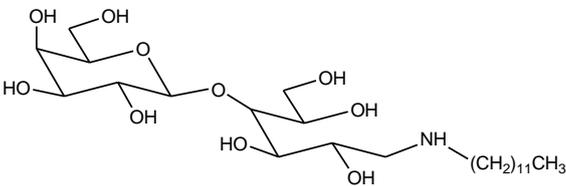


Figure 4: Tension de surface en fonction du logarithme de la concentration massique du composé GlcC12 mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy

Dans la littérature, il semblerait qu'aucune valeur de CAC n'ait été répertoriée pour une molécule amphiphile identique au *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol synthétisé dans ce travail. En guise de comparaison, la valeur de la CAC obtenue pour des tensioactifs non ioniques ayant la même longueur de chaîne que le GlcC12, des têtes polaires de nature chimique similaire, et un greffage de la chaîne au niveau du carbone anomère ont été répertoriées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Comparaison des valeurs de CAC et de γ (pour des concentrations \geq CAC) tirées de la littérature pour des molécules amphiphiles dont la structure s'approche de celle du composé GlcC12 synthétisé dans ce travail

Références	Molécule amphiphile	CAC (mM)	γ (mN.m ⁻¹)
Pestman ²⁰ Méthode de la goutte (Annexe 3) Mesures réalisées à 40°C Dans l'eau	<i>N</i> -acyl, <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol 	0.20	30.3
	<i>N</i> -propionyl, <i>N</i> -dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol 	0.13	28.6
Latge et coll. ²¹ Dupuy et coll. ² Méthode par tensiométrie Mesures réalisées à 25°C Dans l'eau	<i>N</i> -dodécylamino-1-désoylactitol 	0.60	37.0

La valeur de la CAC obtenue pour les molécules amphiphiles décrites dans la littérature est supérieure à celle mesurée pour le GlcC12 (0.04 mM). Par exemple, Pestman²⁰ a montré que la valeur de la CAC du *N*-acyl, et du *N*-propionyl, *N*-dodécyl-1-amino-désoxy-D-alditol était égale respectivement à 0.20 mM et 0.13 mM. D'après les auteurs, la présence d'un groupement acyl ou propionyl sur l'atome d'azote augmente le caractère hydrophile de la tête polaire et donc la CAC du composé. Par ailleurs, la présence d'un disaccharide peut également avoir une influence importante sur la valeur de la CAC. Par exemple, dans le cas

du composé *N*-dodécylamino-1-désoxylactitol^{2,21,22}, la tête disaccharidique apporterait une valeur de CAC plus élevée (0.60 mM *versus* 0.04 mM pour le GlcC12), notamment par la présence de groupes hydroxyles supplémentaires.

1.2.2. Méthode de préparation des assemblages

Dans le cadre de ce travail, la mise en suspension des molécules amphiphiles en solution aqueuse a fait intervenir une étape d'hydratation d'un film de GlcC12²³. Le protocole a consisté à dissoudre les molécules amphiphiles dans un solvant organique (méthanol) puis à évaporer le solvant pour obtenir un film homogène sur les parois du ballon (Figure 5(1)). L'hydratation de ce film par une solution aqueuse (Figure 5(2)) sous agitation, a entraîné la formation des assemblages puisque la concentration (10 mM) était bien supérieure à la concentration d'agrégation critique mesurée précédemment. La solution a été ensuite soumise à un traitement aux ultrasons afin de réduire la distribution en taille des assemblages formés.

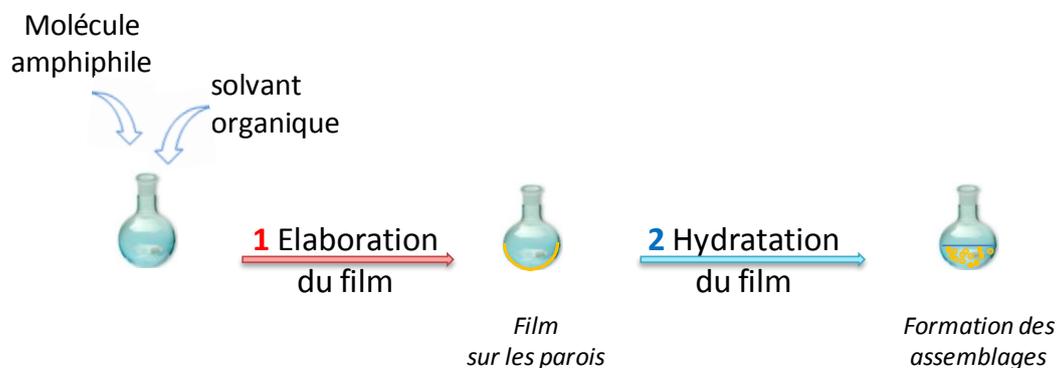


Figure 5: Schématisation de la préparation des suspensions de GlcC12

Ce protocole a été suivi pour réaliser les assemblages étudiés par QELS, MET et SAXS.

1.2.3. Etude de la taille et de la stabilité des assemblages par QELS

La diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS) permet d'accéder au diamètre hydrodynamique moyen d'objets en suspension en fonction de leur coefficient de diffusion

dans une solution de viscosité donnée et à une température donnée. Ces objets se déplacent suivant un mouvement Brownien. Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement laser, ils diffusent la lumière dans toutes les directions. Les fluctuations de l'intensité de lumière diffusée pour un angle donné renseignent sur leur vitesse qui est ainsi reliée à leur diamètre hydrodynamique moyen par la relation de Stokes-Einstein (Équation 1):

Équation 1 :

$$D = kT / 6\pi R\eta$$

D coefficient de diffusion de la particule

T température

k constante de Boltzmann

R rayon hydrodynamique moyen de la particule

η viscosité du milieu

Le diamètre moyen mesuré par QELS pour les assemblages de GlcC12 est d'environ 95 ± 25 nm avec une valeur de distribution en taille POLY (fournie par le logiciel de l'appareil de mesure de MALVERN®) élevée de 0.3, reflétant une distribution relativement large. D'après la représentation en intensité des diamètres (Figure 6), la gamme de taille semble s'étendre de 15 nm à 400 nm.

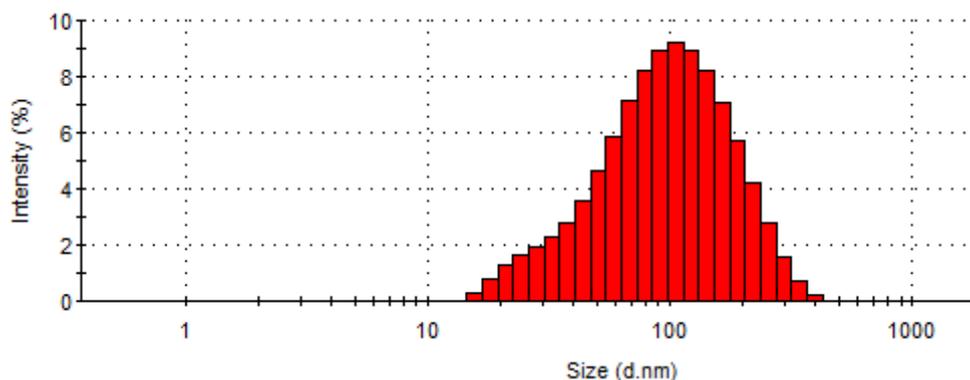


Figure 6: Distribution en intensité des tailles des assemblages de GlcC12 (à 1 mM, dans l'eau) mesurée par QELS

La stabilité des échantillons a été vérifiée en comparant une mesure réalisée à $t = 0$ et à $t = 8$ jours avec conservation de l'échantillon à 4°C à 10 mM. La taille et distribution en taille des

assemblages restent similaires pendant 8 jours, permettant de considérer ces objets stables pendant cet intervalle de temps.

1.2.4. Etude de la morphologie des assemblages par MET

La morphologie des objets formés a été étudiée par microscopie électronique en transmission (MET). Cette technique consiste à placer l'échantillon sous un faisceau d'électrons, et à visualiser l'image fournie par la diffraction des électrons. Les différences de densité électronique existant au sein de l'échantillon conduisent à une absorption plus ou moins importante des électrons, et créent ainsi un contraste au niveau de l'image. Lorsque les différences de densité électronique ne sont pas suffisantes pour la visualisation de l'image, il est nécessaire d'utiliser un agent de contraste tel que des sels de métaux lourds. Ces derniers absorbent les électrons et créent alors un contraste artificiel. Ainsi, les objets en solution apparaissent plus clairs que ce qui les entoure (blanc sur un fond sombre) sur les clichés. Nous avons utilisé comme agent de contraste l'acétate d'uranyle (2 wt %), qui donne le contraste le plus fort pour ces assemblages d'après de nombreux essais. Un échantillon témoin sans GlcC12 a été réalisé et son cliché MET est présenté en Annexe 4.

Les observations pour le système GlcC12 ont révélé la présence d'objets (en blanc) dont la distribution de taille semble être large, et de taille comprise entre 10 nm et 80 nm (Figure 7). De plus, il semble coexister plusieurs formes d'objets qui peuvent provenir d'une agrégation d'assemblages de plus petites tailles, il est donc difficile de caractériser précisément le système observé.

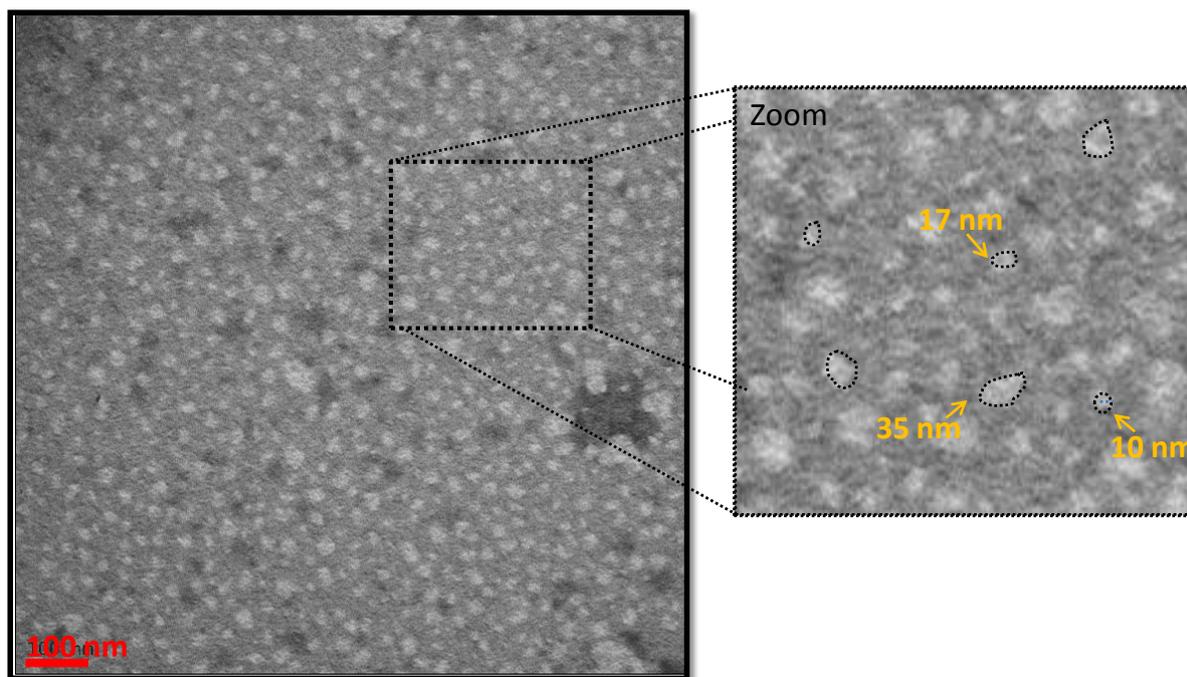


Figure 7: Cliché obtenu par MET pour une grille préparée à partir d'une solution aqueuse en GlcC12 de concentration égale à 1 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2.

Ces observations sont à interpréter avec précaution étant donné que les clichés sont réalisés en milieu sec et avec l'utilisation d'un agent de contraste qui perturbe le système. Dans des travaux futurs, il serait intéressant d'utiliser une autre technique d'observation permettant de figer la structure, comme la cryofracture. Dans ce cas, l'échantillon serait congelé extrêmement rapidement, ce qui permettrait de conserver l'organisation interne de l'échantillon et d'éviter l'agrégation éventuelle des molécules amphiphiles au cours du séchage.

I.2.5. Détermination de la structure des assemblages par SAXS

Au cours de ces travaux, la structure du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol a été étudiée par diffusion des rayons X aux petits angles (Annexe 5). Tout d'abord, la concentration de la solution de molécule amphiphile optimale à utiliser pour obtenir des résultats exploitables a été définie, puis trois lots de GlcC12 issus de synthèses différentes ont été étudiés.

1.2.5.1. Choix de la concentration optimale en GlcC12

La Figure 8 représente le profil d'intensité diffusée par une solution aqueuse de GlcC12 à différentes concentrations (1mM, 4mM, et 10 mM). Les mesures ont été répétées avec deux lots différents de GlcC12 pour chaque concentration.

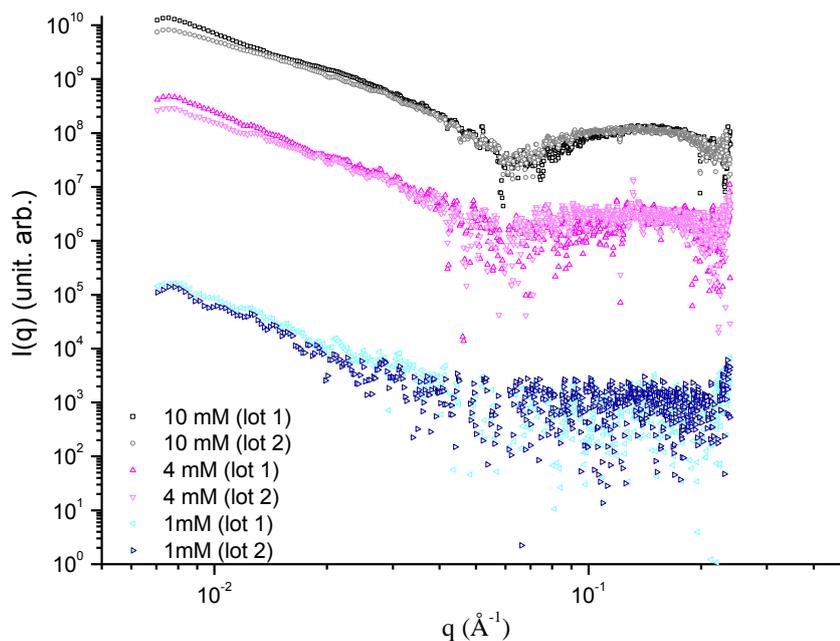


Figure 8: Comparaison en coordonnées logarithmiques de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q à différentes concentrations 1 mM, 4 mM et 10 mM en GlcC12 dans l'eau. Les assemblages de GlcC12 ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe 1.2.2. Les données ont été décalées d'un facteur 10^4 pour 10 mM et 10^3 pour 4 mM.

A faibles concentrations (1 mM et 4 mM), les mesures présentent une dispersion en intensité élevée malgré la brillance du faisceau et le long temps de pose (plusieurs dizaines de secondes) et sont difficilement exploitables quantitativement. La courbe de diffusion obtenue à 1 mM, donc assez proche de la CAC, montre un diagramme de diffusion monotone décroissant avec la valeur du vecteur de diffusion. En revanche, à une concentration de 10 mM, on voit que les mesures sont similaires entre le lot n°1 et le lot n°2 avec moins de dispersion. Ainsi, la concentration de 10 mM a été conservée pour la suite de ces mesures.

1.2.5.2. Comparaison de trois lots de GlcC12

Trois lots de GlcC12 de différentes synthèses ont été analysés et comparés. Un exemple de la courbe d'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q est représenté Figure 9, pour une solution de composé GlcC12 à 10 mM.

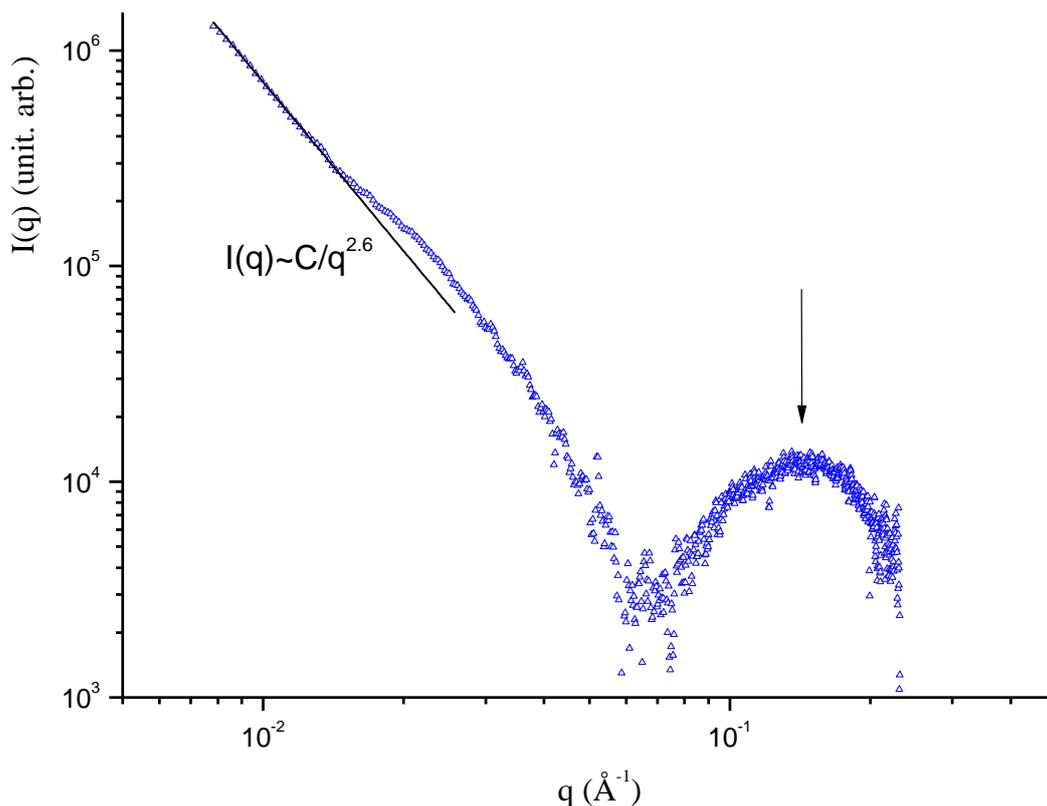


Figure 9: Courbe expérimentale en coordonnées logarithmiques de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour une solution de GlcC12 à 10 mM. Les assemblages de GlcC12 ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe 1.2.2.

La courbe $I(q)$ présente un maximum entre $q = 0.1$ et 0.2 \AA^{-1} indicatif du facteur de forme des assemblages en solution. A plus petits angles, la mesure est limitée par la présence du puits nécessaire à l'atténuation du faisceau incident vers $8 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$. On observe un épaulement vers 2×10^{-2} à $3 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$, avec néanmoins aux plus petits angles une remontée de la diffusion en $\sim q^{-2.6}$ qui pourrait représenter des objets agrégés plus gros avec une large distribution de tailles d'objets.

Les courbes $I(q)$ représentatives des trois lots du composé GlcC12 ont été superposées dans la Figure 10 sur un domaine de q allant de 0.006 \AA^{-1} à 0.25 \AA^{-1} , et pour une concentration en GlcC12 égale à 10 mM .

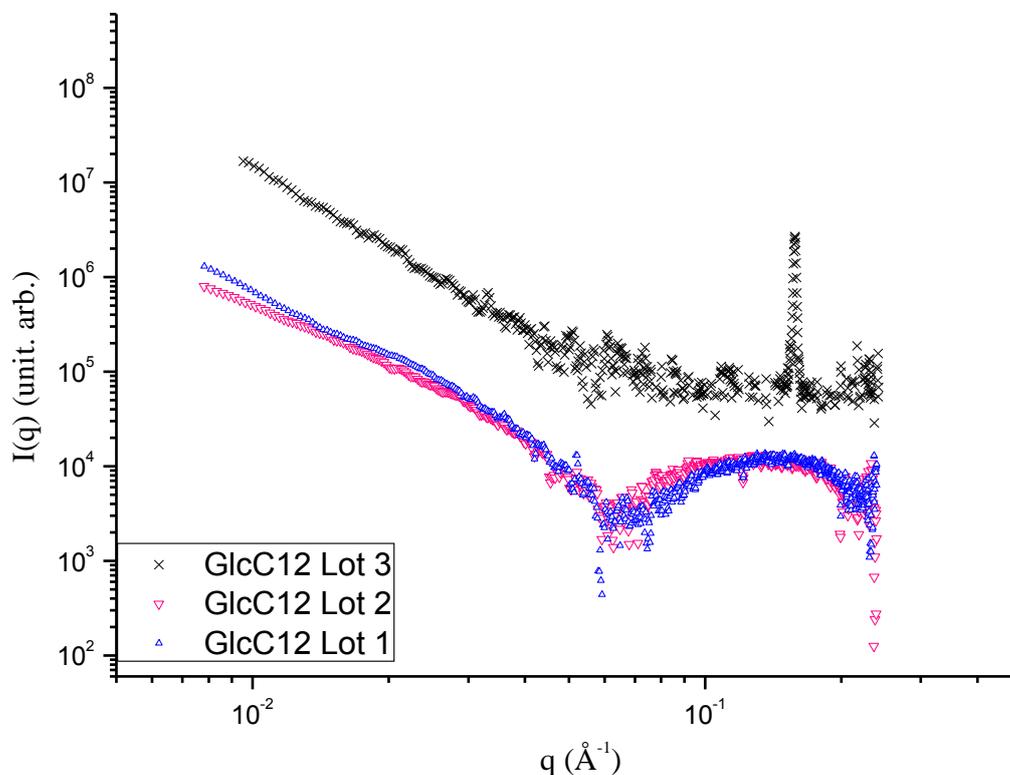


Figure 10: Courbe en coordonnées logarithmiques de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour les trois lots d'une solution de GlcC12 à 10 mM dans l'eau. La courbe représentant le lot 3 a été décalée vers le haut pour améliorer la lisibilité. Les assemblages de GlcC12 ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2.

Cette comparaison a mis en évidence l'influence non négligeable de l'histoire thermique des échantillons. Dans le cas des lots 1 et 2, on a pu constater que les courbes $I(q)$ étaient similaires sur toute la gamme de q observée avec un maximum très large vers $1.5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. En revanche, pour le lot 3 la diffusion présente un pic de diffraction très fin présentant son maximum pour $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$. Cette différence a pu être observée à l'œil nu par un précipité blanc présent dans le capillaire d'analyse. La présence de ce pic fin est caractéristique d'une phase solide. Le lot 3 a en effet été conservé 24 h de plus à 4 °C par rapport aux lots 1 et 2 qui n'ont pas été maintenus à 4 °C . Le lot 3 semble donc avoir été

cristallisé, car il présente un pic de diffraction vers 0.16 \AA^{-1} . Seuls les deux premiers lots ayant la même histoire thermique ont donc été considérés car ils sont représentatifs des assemblages formés en solution aqueuse, et les résultats de diffusion ont été modélisés à partir de ces deux lots.

1.2.5.3. Modélisation des résultats expérimentaux

En général, une modélisation de résultats expérimentaux $I(q)$ exprimée en unités arbitraires peut être ajustée par l'équation suivante :

$$M(q,x) \sim k I(q)$$

Où M est un modèle ayant différents paramètres x et k est un facteur d'échelle. Ainsi, un modèle M est choisi à l'avance (sur la base de la connaissance du comportement physico-chimique de ce type de systèmes) et la détermination des paramètres x et k est réalisée de façon à ce que la modélisation s'approche le plus possible des données expérimentales $I(q)$, au sens des moindres carrés.

Les clichés obtenus en MET ont permis de mettre en évidence que le GlcC12 formait des assemblages en solution de formes multiples (page 150). En particulier, la modélisation a été affinée sur le domaine de q allant de 0.04 \AA^{-1} à 0.25 \AA^{-1} où le diagramme de diffusion présente un maximum, puisque le domaine de diffusion aux plus petits angles ($q < 0.04 \text{ \AA}^{-1}$) est influencé par la présence de différents types d'objets (agrégats). Parmi les nombreux modèles existants dans la littérature²⁴, les plus classiques pour les molécules amphiphiles sont les modèles de micelles^{3,21,21,25}. Nous avons choisi de nous focaliser sur deux d'entre eux, à savoir le modèle de micelle sphérique et le modèle de micelle elliptique. La modélisation réalisée sous Mathcad ou Excel a permis de déterminer les dimensions caractéristiques des assemblages formés par le GlcC12 à partir des courbes $M(q,x)$ modèles.

1.2.5.3.1. Modèle de micelle sphérique : détermination des ordres de grandeur

Le modèle de micelle sphérique a été choisi dans un premier temps pour modéliser les données expérimentales. Les micelles sont constituées de deux zones distinctes qui sont le cœur, contenant les chaînes hydrocarbonées, considéré comme un milieu homogène et sans solvant ; et la coquille, contenant les têtes polaires, le tout dispersé dans l'eau (Figure 11).

Connaissant le nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrocarbonée du composé amphiphile, et posant l'hypothèse que la tête polaire possède une géométrie sphérique, il est possible d'accéder par le calcul à plusieurs dimensions caractéristiques de la micelle (Figure 11), qui sont le rayon du cœur (R_c) et l'épaisseur de la coquille (E_c). Ces valeurs pourront ensuite être comparées à celles obtenues par la modélisation des données expérimentales.

Tout d'abord, le rayon du cœur peut être calculé en le considérant comme le plus grand rayon possible, c'est-à-dire comme la longueur d'une chaîne hydrophobe étirée²⁶ (Équation 2).

Équation 2:

$$R_c = l_c = 0.15 + 0.127 \times n_c \text{ (nm)}$$

Où n_c est le nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrocarbonée (pour le GlcC12, $n_c=12$).

Connaissant R_c , il est possible de calculer l'aire à la surface de la micelle (A) avec l'hypothèse que la micelle possède une géométrie sphérique. En divisant A par le nombre moyen de molécules amphiphile par micelle (N_a), la valeur de la section transversale par chaîne hydrocarbonée à la surface de la micelle (a_0) peut être obtenue, et l'épaisseur de la coquille E_c en être déduite en supposant que la tête polaire est sphérique.

Tout d'abord, V_c (en nm^3) est le volume du cœur ($V_c = (4/3) \times \pi \times R_c^3$) ; et V_e (en nm^3) le volume d'encombrement d'une chaîne hydrocarbonée²⁶ ($V_e = 0.0274 + 0.0269 \times n_c$)

Équation 3:

$$N_a = \frac{V_c}{V_e} \quad a_0 = \frac{A}{N_a} = \frac{4\pi R_c^2}{N_a} \quad E_c = 2 \times \left(\frac{a_0}{\pi}\right)^{1/2}$$

Le rayon de la micelle R_m est ensuite déterminé en additionnant le rayon du cœur (R_c) et l'épaisseur de la coquille (E_c). Ainsi, nous avons pu accéder à l'évaluation des tailles caractéristiques suivantes pour le GlcC12 :

V_e (nm ³)	V_c (nm ³)	N_a	a_0 (nm ²)	E_c (nm)	R_c (nm)	R_m (nm)	D_m (nm)
0.35	19.65	56	0.63	0.91	1.67	2.58	5.16

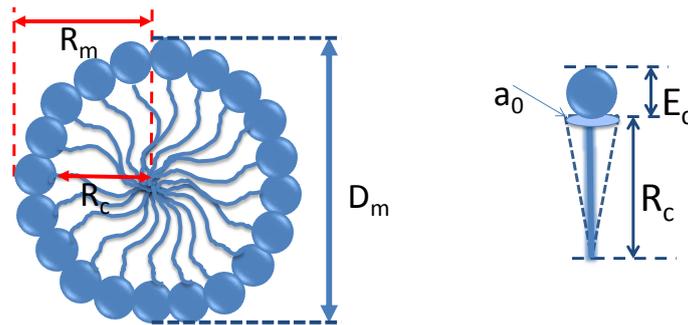


Figure 11: Schéma des données caractéristiques d'un modèle de micelle sphérique, à tête polaire sphérique, appliqué au GlcC12

D'autre part, le contraste de diffusion provenant de la variation de densité électronique entre les constituants de la micelle et le solvant peut être déterminé par la modélisation. En effet, la modélisation permet d'accéder aux valeurs de densité électronique ρ_e ou densité de longueur de diffusion de Thomson $\rho = r_0 \cdot \rho_e$ propres à chaque zone de la micelle. Ces valeurs peuvent être évaluées en connaissant le volume v_{ur} de l'unité de répétition (ur) dans la phase concernée, la longueur de diffusion de Thomson pour un électron² ($r_0 = 2.82 \cdot 10^{-13}$ cm) et le nombre d'électrons par unité de répétition Z_{ur} .

Équation 4

$$\rho = r_o * \rho_e = \frac{r_o * Z_{ur}}{V_{ur}}$$

Ainsi, les densités de longueur de diffusion de la chaîne hydrophobe et celle de la tête hydrophile du GlcC12 ont été déterminées par le calcul ($\rho_{\text{cœur}} = 7.82 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ et $\rho_{\text{coquille}} = 6.35 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) et comparées par la suite à celles obtenues par la modélisation. Notons toutefois que la valeur de ρ_{coquille} déterminée par le calcul est inférieure à celle du solvant ($\rho_{\text{eau}} = 9.43 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). Or, dans la littérature^{2,27} il a été montré que le cœur hydrophobe possède une densité électronique plus faible que celle de l'eau, et que la tête polaire possède une densité électronique plus forte que l'eau. Les résultats obtenus par cette méthode de calcul dans le cas d'une tête hydrophile sphérique sont ainsi à prendre avec précaution. Les valeurs obtenues par la modélisation sont donc probablement plus proches de la réalité.

Dans le cas général de micelles sphériques ayant un cœur hydrophobe de rayon R_c et une coquille hydrophile de rayon ($R_c + E_c$), le facteur de forme en SAXS est exprimé par la relation suivante²⁴ :

Équation 5:

$$M(q, R_c, E_c, \Delta\rho_1, \Delta\rho_2) = k. [K(q, R_c + E_c, \Delta\rho_2) - K(q, R_c, \Delta\rho_1)]^2$$

avec $K(q, R, \Delta\rho) = \frac{4}{3} \pi R^3 \cdot \Delta\rho \cdot 3 \frac{\sin(qR) - qR \cdot \cos(qR)}{(qR)^3}$

R_c Rayon du cœur

E_c Epaisseur de la coquille

$\Delta\rho_1$ Différence de densité de longueur de diffusion (ou densité électronique) entre la coquille et celle du solvant (eau), $\Delta\rho_2 = \rho_{\text{coquille}} - \rho_{\text{solvant}}$

$\Delta\rho_2$ Différence de densité de longueur de diffusion (ou densité électronique) entre le cœur et la coquille $\Delta\rho_1 = \rho_{\text{cœur}} - \rho_{\text{coquille}}$

La courbe de modélisation correspondante a été tracée d'après ce modèle, puis elle a été comparée à la courbe expérimentale au sens des moindres carrés. Cette courbe expérimentale, a quant à elle été tracée en soustrayant l'intensité diffusée par le capillaire rempli de solvant (eau) (Figure 12).

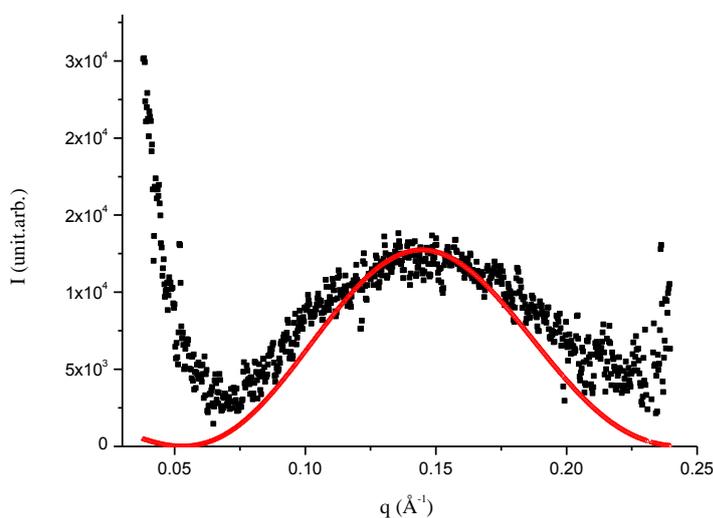


Figure 12: Comparaison en coordonnées unitaires de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour une solution de GlcC12 à 10 mM et la modélisation par un modèle de micelle sphérique (en rouge).

Les valeurs obtenues par modélisation sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 2).

Tableau 2: Comparaison des valeurs caractéristiques théoriques et modélisées (où $k = 1.40 \times 10^{-5}$) des assemblages formés par une solution de GlcC12 à 10 mM

	E_c (nm)	R_c (nm)	$\rho_{\text{cœur}}$ (cm^{-2})	ρ_{coquille} (cm^{-2})
Calcul	0.91	1.67	7.82×10^{10}	6.35×10^{10}
Modélisation	0.98	1.95	7.59×10^{10}	10.33×10^{10}

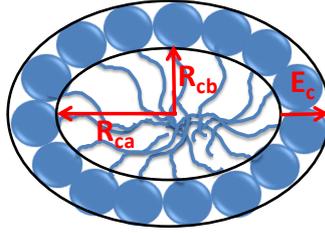
Comme le montre la Figure 12, le modèle sphérique ne permet pas de modéliser correctement les résultats expérimentaux de la solution de GlcC12, en particulier pour les valeurs de $q < 0.06 \text{ \AA}^{-1}$, même si le rayon du cœur $R_c = 1.95 \text{ nm}$ correspond grossièrement au

modèle calculé $R_c = 1.67$ nm. De plus, la valeur de ρ_{coquille} ($6.35 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) déterminée par le calcul pour une tête sphérique est inférieure à celle obtenue par la modélisation ($10.33 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$), alors que les valeurs de $\rho_{\text{cœur}}$ sont proches.

1.2.5.3.2. Modèle de micelle ellipsoïdale

Après le modèle de micelle sphérique, l'utilisation du modèle de micelle ellipsoïdale a été examinée. Dans le cas général de micelle ellipsoïdale ayant un cœur hydrophobe de demi-axe R_{ca} et de deux autres demi-axes R_{cb} , et une coquille hydrophile de rayon ($R_{ca} + E_c$) et de deux autres demi-axes ($R_{cb} + E_c$), le facteur de forme est exprimé par la relation suivante²⁴ :

Équation 6:



$$I(q) = \langle M^2(q, \mu) \rangle = \int_0^1 [M(q, \mu)]^2 d\mu$$

Où $\mu = \cos(\hat{a}, q)$ est le cosinus de l'angle entre l'axe R_{ca} et le vecteur de diffusion q .

$$M(q, \mu) = (\rho_{RC} - \rho_{EC})V_C \left[\frac{3j_1(x_{RC})}{x_{RC}} \right] + (\rho_{EC} - \rho_{eau})V_{EC} \left[\frac{3j_1(x_{EC})}{x_{EC}} \right]$$

avec $j_1(x) = \frac{\sin(x) - x\cos(x)}{x^2}$

$$x_c = q\sqrt{(R_{ca}^2\mu^2 + R_{cb}^2(1-\mu^2))} \quad V_C = \frac{4}{3}\pi R_{ca}R_{cb}^2$$

$$x_t = q\sqrt{(R_{ca} + E_c)^2\mu^2 + (R_{cb} + E_c)^2(1-\mu^2)} \quad V_t = \frac{4}{3}\pi(R_{ca} + E_c)(R_{cb} + E_c)^2$$

La courbe de modélisation correspondante à ce modèle a été tracée (en rouge, Figure 13), puis la courbe expérimentale et la courbe de modélisation ont été comparées au sens des moindres carrés.

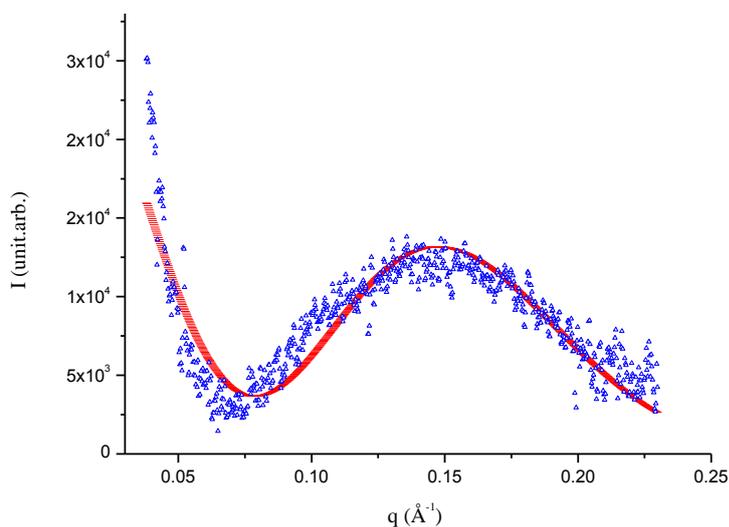


Figure 13: Comparaison en coordonnées unitaires de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour une solution de GlcC12 à 10 mM (en bleu) et la modélisation par un modèle de micelle ellipsoïdale (en rouge).

Comme nous pouvons le constater, le modèle de micelle ellipsoïdale conduit à une meilleure modélisation des données expérimentales par rapport au modèle de micelle sphérique. Les valeurs des tailles caractéristiques obtenues par cette modélisation sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Valeurs caractéristiques modélisées des assemblages formés par une solution de GlcC12 à 10 mM (où $k = 2.31 \times 10^{-6}$)

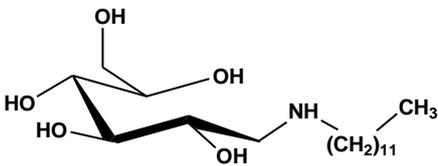
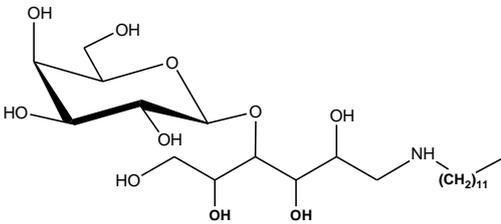
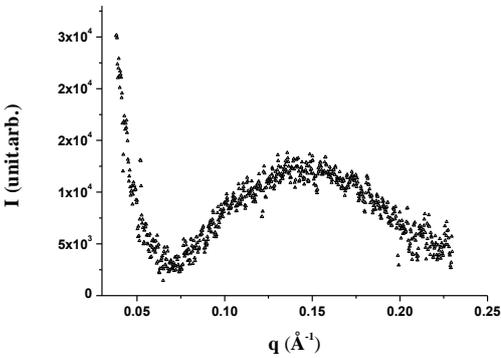
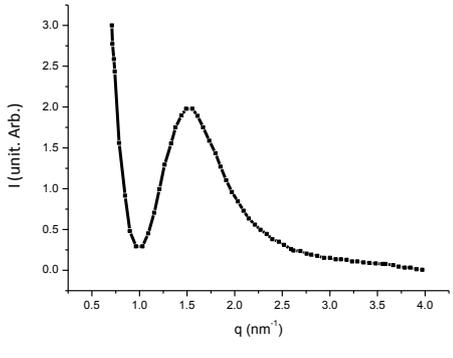
E_C (nm)	R_{ca} (nm)	R_{cb} (nm)	$\rho_{\text{cœur}}$ (cm^{-2})	ρ_{coquille} (cm^{-2})
1.23	1.59	1.65	5.11×10^{10}	10.95×10^{10}

D'après le Tableau 3, les micelles ellipsoïdales auraient un rayon égal à environ 2.90 nm. Notons qu'il faudrait prendre en compte la distribution en taille des assemblages dans la

modélisation par SAXS pour mettre en évidence la formation d'objets de taille similaire à ceux obtenus par MET (entre 10 et 80 nm) et par QELS (95 nm ± 25 nm).

A titre de comparaison, les valeurs obtenues pour les tailles caractéristiques de la micelle ont été comparées à celles d'assemblages formés par des solutions de molécules amphiphiles à base de lactose².

Tableau 4: Comparaison en coordonnées unitaires de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q et des valeurs caractéristiques obtenues pour une solution de GlcC12 à 10 mM dans cette étude (à gauche dans le tableau) et pour une solution d'un composé dérivé de lactose (référence²) à 19 mM (à droite dans le tableau).

	 <p><i>N</i>-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (dans cette étude)</p>	 <p><i>N</i>-dodécyl-amino-1-désoxy-lactitol (référence²)</p>
$I(q)$		
R_{ca} (nm)	1.59	2.38
R_{cb} (nm)	1.65	1.31
E_c (nm)	1.23	1.29

Dans ce tableau, on voit que l'épaisseur de la couronne contenant les têtes polaires est similaire pour les deux molécules amphiphiles comparées. La longueur de la chaîne hydrocarbonée étant identique, la différence de taille des demi-axes peut être due à la présence d'une tête plus large dans le cas du composé dérivé de lactose qui modifierait le rayon de courbure de la micelle.

De plus, les densités de longueur de diffusion (Tableau 3) de la chaîne hydrophobe et celle de la tête hydrophile du GlcC12 obtenues par la modélisation avec le modèle de micelle ellipsoïdale ont été comparées à celle évaluées par le calcul pour une tête sphérique (page 156). Les valeurs de ρ_{coquille} et de $\rho_{\text{cœur}}$ obtenues par la modélisation sont différentes de celles calculées, ce qui laisse envisager que la tête hydrophile ne soit pas sous forme sphérique.

Grâce aux valeurs de densités de longueur de diffusion obtenues par la modélisation, nous pouvons déduire le profil de diffusion au sein de la micelle ellipsoïdale (Figure 14).

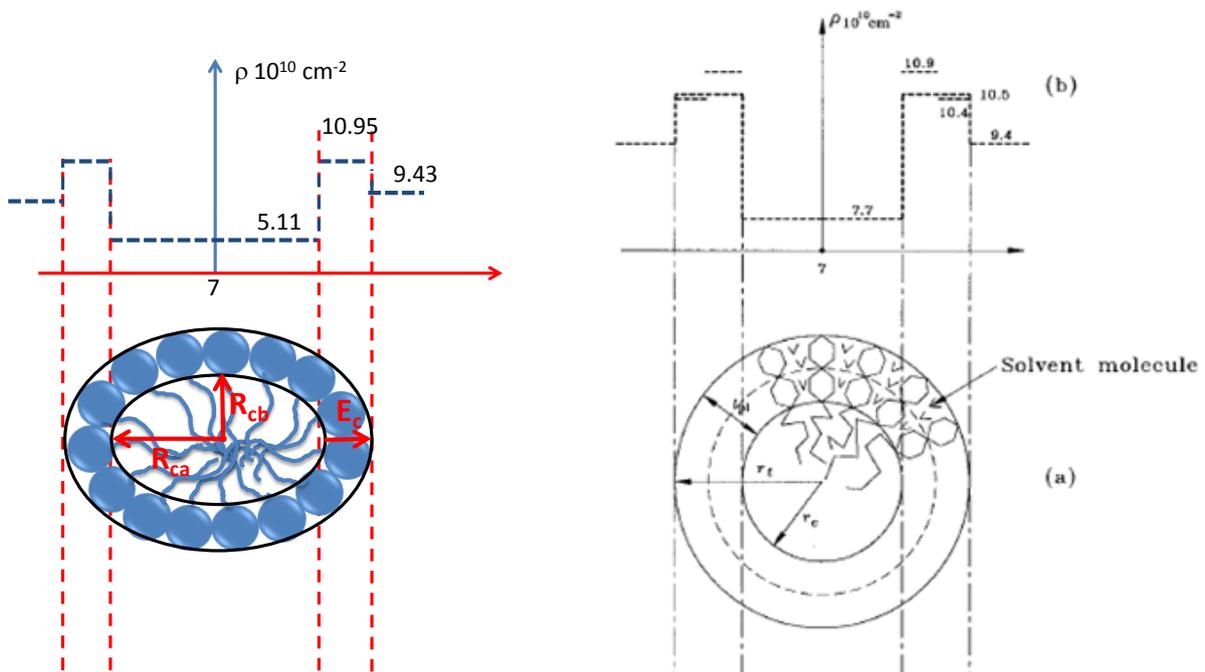


Figure 14: Représentation schématique d'une micelle ellipsoïdale et de son profil de diffusion ρ pour la modélisation d'une solution de GlcC12 (à gauche) et pour une solution d'un composé à base de lactose² (à droite)

Le profil de diffusion pour une solution de GlcC12 est similaire au profil de diffusion pour une solution d'un composé à base de lactose dans le sens où $\rho_{\text{cœur}} < \rho_{\text{eau}} < \rho_{\text{coquille}}$. Dans les deux cas, la variation de densité électronique entre les constituants et le solvant a permis de mettre en évidence la présence de composés de nature différente au sein de l'assemblage.

1.3. Influence de la longueur de chaîne sur la nature des assemblages formés

Dans la littérature, une molécule a été définie comme amphiphile, par Van Doren et coll.²⁸ et par Kartha et coll.²⁹, lorsqu'elle possède une chaîne hydrocarbonée ayant au moins 6 atomes de carbone. Dans ce travail, il a été choisi d'étudier le comportement auto-associatif en solution aqueuse de plusieurs molécules amphiphiles ayant au moins 6 atomes de carbone au sein de leur partie hydrophobe. Ainsi, le *N*-hexyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC6), le *N*-octyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC8), le *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC12) et le *N*-hexadécyl-1-amino-1-désoxy-D-glucitol (GlcC16) ont été examinés. Leur structure diffère donc de celle du GlcC12 uniquement par la longueur de la chaîne alkylamine (Figure 15). Les assemblages formés par ces molécules amphiphiles sont vraisemblablement des micelles, d'après le calcul de leur paramètre d'empilement (Annexe 7).

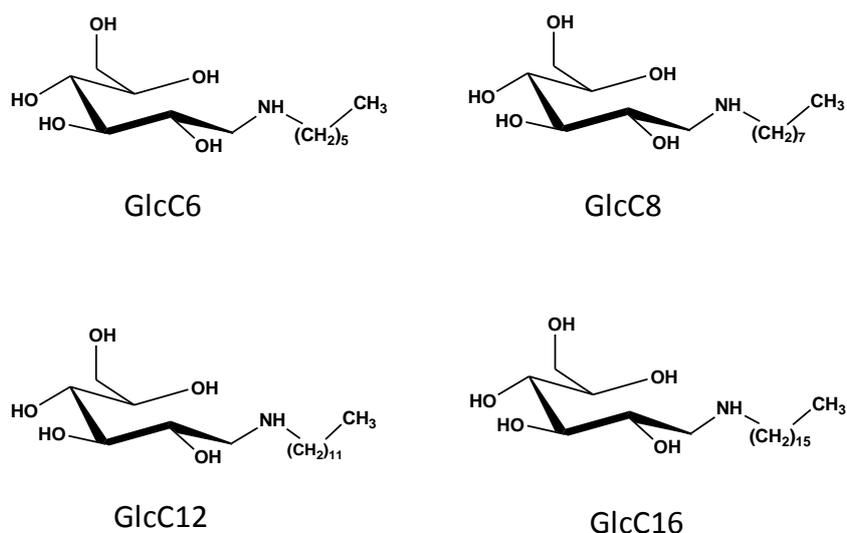


Figure 15: Structure des molécules amphiphiles GlcC6, GlcC8 (commercial), GlcC12 et GlcC16 examinés dans ce travail

I.3.1. Détermination des concentrations d'agrégation critique

La détermination de la concentration à partir de laquelle les molécules amphiphiles forment des assemblages en solution aqueuse a été déterminée par tensiométrie avec la méthode de la lame de Wilhelmy précédemment décrite. Les mesures ont été effectuées avec une concentration initiale en molécule amphiphile pour laquelle celle-ci est soluble en milieu aqueux à température ambiante ($C_{\text{GlcC6}} = 275 \text{ mg.L}^{-1}$; $C_{\text{GlcC8}} = 25 \text{ mg.L}^{-1}$; $C_{\text{GlcC12}} = 25 \text{ mg.L}^{-1}$). Nous avons constaté que la solubilité du GlcC16 était trop faible pour pouvoir le solubiliser à température ambiante, ce qui a rendu sa caractérisation difficile. Ainsi, les courbes représentant la tension de surface en fonction du logarithme de la concentration pour les molécules amphiphiles sont exposées ci-dessous (Figure 16 : GlcC6 (a) ; GlcC8 (b) et GlcC12 (c)).

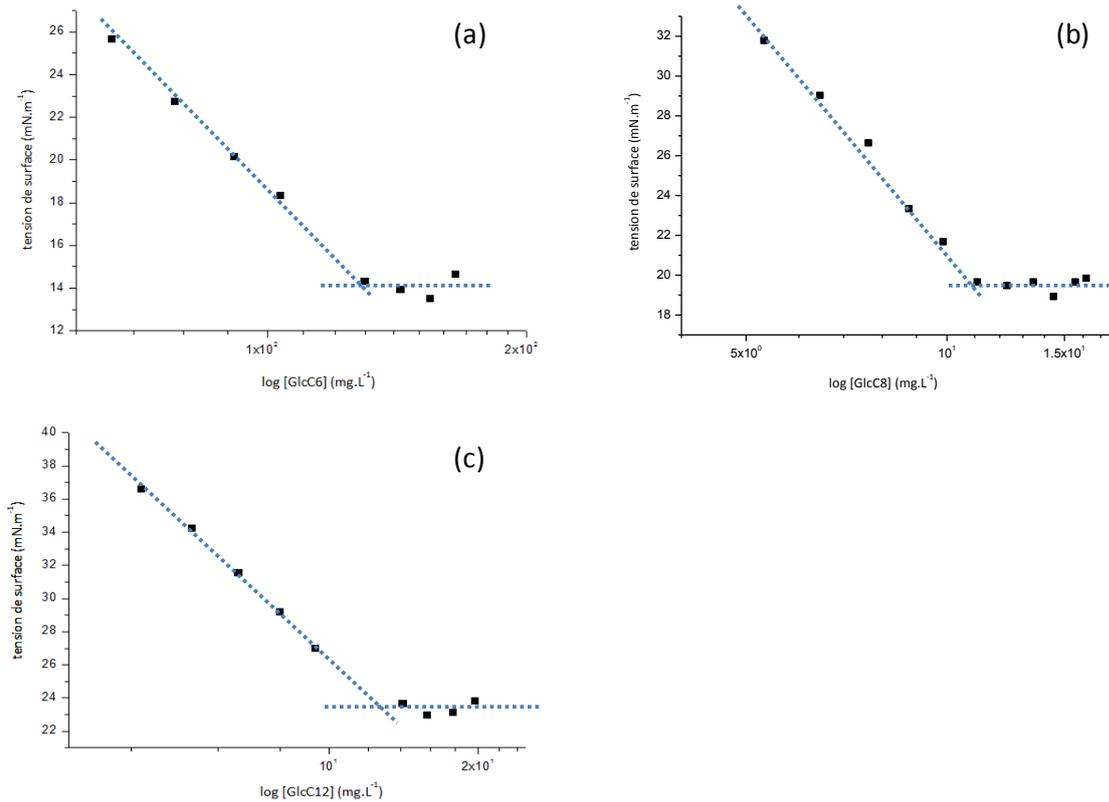
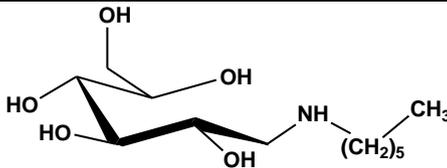
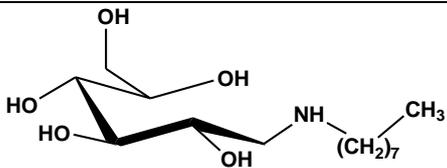
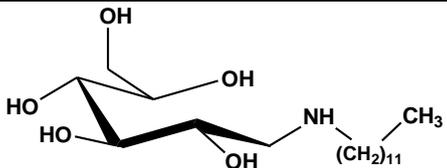


Figure 16: Tension de surface en fonction du logarithme de la concentration pour (a) GlcC6 ; (b) GlcC8 ; (c) GlcC12 dans l'eau; mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy à 25°C

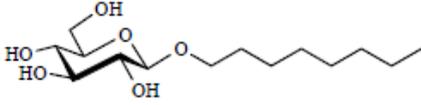
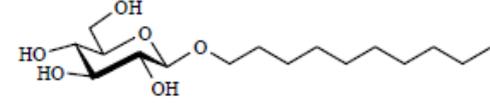
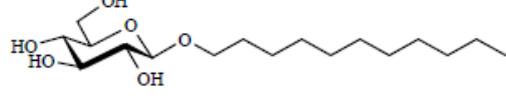
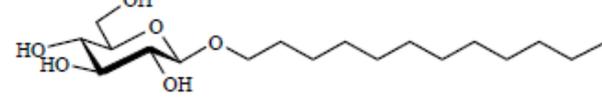
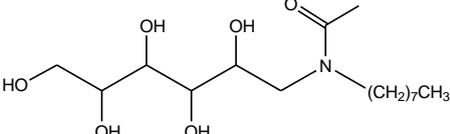
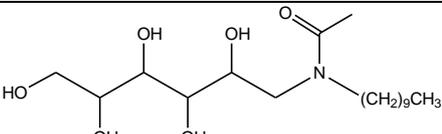
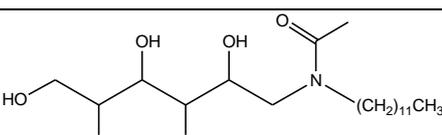
Le Tableau 5 suivant regroupe les différentes valeurs de CAC mesurées.

Tableau 5: Valeurs de la CAC molaire et massique obtenues pour les GlcC6, GlcC8, et GlcC12 dans l'eau

Composé	CAC (mM)	CAC (mg/L)
<p><i>GlcC6</i></p> 	0.49	129.5
<p><i>GlcC8</i></p> 	0.04	10.8
<p><i>GlcC12</i></p> 	0.04	13.5

Ces résultats montrent que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle réduit la valeur de la CAC. En effet, lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente, le composé amphiphile est moins hydrophile et donc moins soluble. Il va donc avoir tendance à s'auto-associer plus rapidement de façon à former des assemblages et ainsi permettre à l'eau de minimiser sa surface de contact avec l'espèce hydrophobe. Ces résultats sont en accord avec la littérature où il a été observé que la longueur de la chaîne alkyle influait sur la CAC d'un composé amphiphile (ayant la même tête polaire) : la CAC diminuait lorsque la longueur de la chaîne augmentait^{3,21,22,30-32}. En guise de comparaison, le Tableau 6 répertorie les valeurs de CAC obtenues pour des molécules amphiphiles proches de celles synthétisées dans ce travail^{13,20}.

Tableau 6: Valeurs de CAC de composés similaires aux molécules amphiphiles synthétisées

Référence	Molécules amphiphiles	CAC (mM)
Lopez et coll. ¹³ Mesures réalisées à 25°C En milieu tampon Méthode de l'anneau		18.0
		1.80
		0.58
		0.18
Pestman et coll. ²⁰ Mesures réalisées à 40°C Dans l'eau Méthode de la goutte		21
		1.9
		0.20

Ces différents exemples confirment que la CAC est dépendante de la longueur de la chaîne alkyle. Pour ces composés, lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente de deux atomes de carbone, la CAC diminue d'un facteur 10. Cependant, comme on peut le voir sur la Figure 17, ce comportement diffère quelque peu pour les molécules amphiphiles synthétisées dans ce travail.

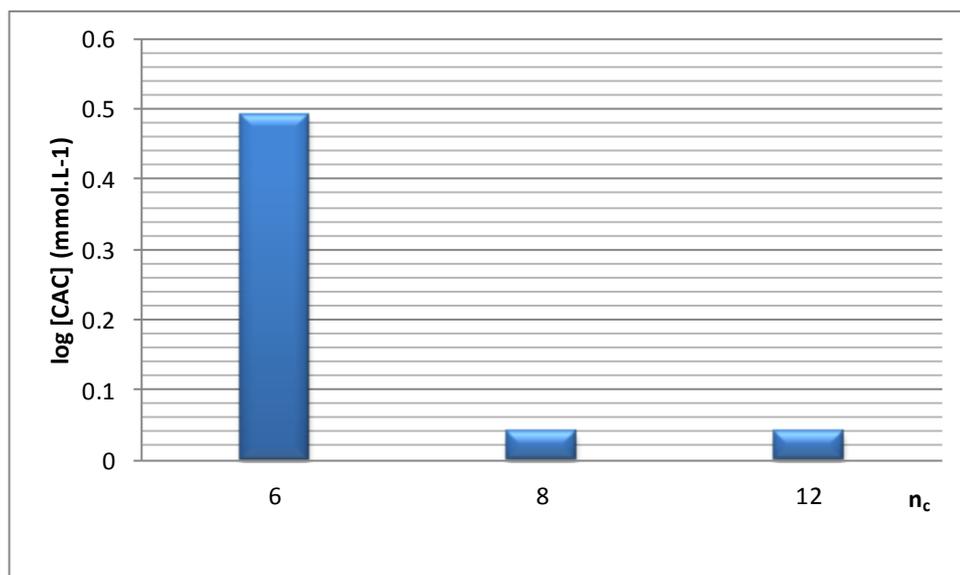


Figure 17: Evolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne alkyle (avec n_c = nombre d'atomes de carbone) pour les molécules amphiphiles synthétisées GlcC6 et GlcC12 et commerciale GlcC8

La concentration d'agrégation critique diminue d'un facteur 10 lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente de deux atomes de carbone entre le composé GlcC6 et le composé GlcC8. Puis cette caractéristique est identique entre le composé GlcC8 et le composé GlcC12. Néanmoins, il est important de noter que ces analyses n'ont été réalisées qu'une fois, il serait donc judicieux de les répéter pour valider ou non cette observation. Ces résultats préliminaires ont toutefois permis de mettre en évidence que quelle que soit la longueur de chaîne alkyle, les molécules amphiphiles présentaient un comportement tensioactif en solution aqueuse.

1.3.2. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par QELS

L'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la taille et la distribution en taille des assemblages formés par les GlcC6, GlcC8, GlcC12 et GlcC16 a été ensuite examinée (Tableau 7).

Tableau 7: Comparaison des résultats obtenus par QELS (3 mesures) pour le GlcC6, GlcC8, GlcC12 et GlcC16 par QELS pour une concentration en molécule amphiphile égale à 1 mM. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2.

	Dz (nm)	POLY
GlcC6	410	0.50
GlcC8	530	0.69
GlcC12	95	0.26
GlcC16	105	0.25

La valeur élevée de POLY traduit une distribution très large en agrégats pour les GlcC6 et GlcC8 et relativement large pour les GlcC12 et GlcC16. Il existe donc une variété importante d'objets en solution, et il est ainsi difficile de préciser par cette technique l'influence de la taille de la chaîne alkyle sur la taille et la distribution des agrégats en solution.

I.3.3. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par MET

La taille et la forme des assemblages formés par le GlcC6, GlcC12 et GlcC16 ont été observées par MET. Les clichés mettent en évidence trois types de populations d'objets (Figure 18).

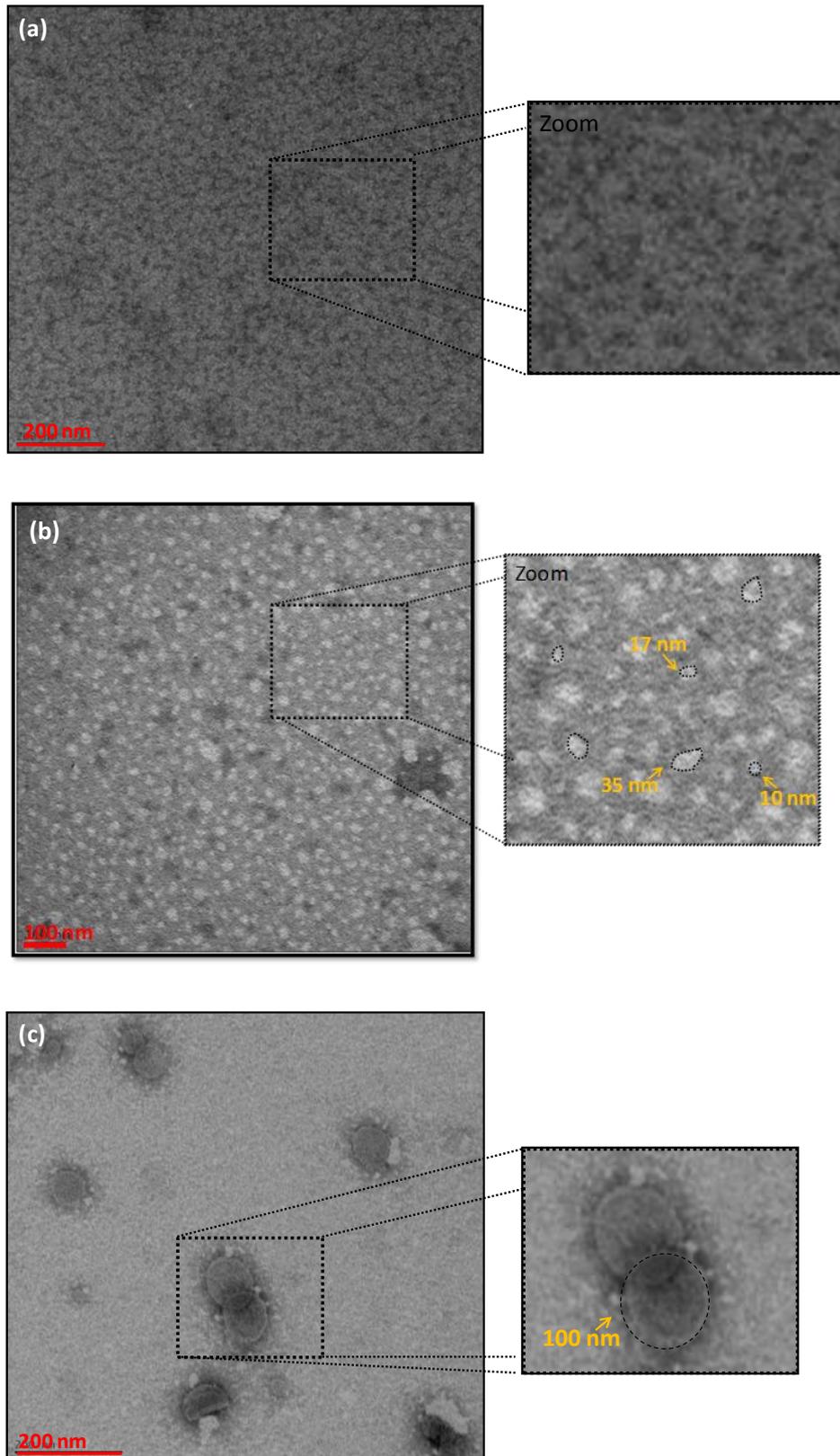


Figure 18: Clichés obtenus par MET pour les assemblages formés par le (a) Glc6 ; (b) Glc12; (c) Glc16 pour des grilles préparées à partir de solutions aqueuses en molécules amphiphiles de concentration égale à 1 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2.

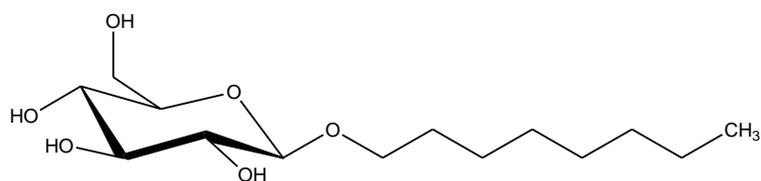
Dans le cas du GlcC6 (Figure 18a), il est difficile de confirmer la présence d'assemblages sur le cliché obtenu. Il est possible que les molécules amphiphiles possédant une chaîne alkyle courte à 6 atomes de carbone forment des assemblages trop petits en solution pour être vus à ce grossissement.

Quant au GlcC16 (Figure 18c), les clichés montrent la présence de structures plutôt sphériques d'un diamètre compris entre 25 nm et 100 nm (clichés supplémentaires en Annexe 6). Les molécules amphiphiles sont détectables par l'accumulation de contrastant à l'extérieur des assemblages. D'après leur forme et leur taille, ces assemblages pourraient être des vésicules. Il semblerait donc que la présence d'une chaîne alkyle plus longue au sein d'un composé de même tête polaire entraîne la formation d'objets de taille plus importante et de forme moins irrégulière, en comparaison avec le GlcC12 ($10 \text{ nm} < D_z < 80 \text{ nm}$).

1.3.4. Influence de la longueur de chaîne mise en évidence par SAXS

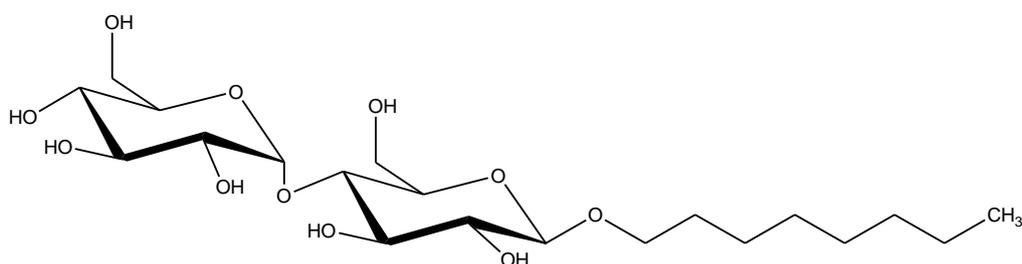
Selon He et coll.⁹, la nature des assemblages formés par des composés de structure proche varie en fonction de la longueur de chaîne hydrophobe et aussi de la tête polaire (Tableau 8). Par exemple, les assemblages formés par le n-octyl- β -maltopyranoside sont des micelles sphériques (de rayon égal à 23.7 Å), ceux formés par le n-dodécyl- β -maltopyranoside sont des micelles ellipsoïdales (de rayon plus grand égal à 34.4 Å) et enfin pour le n-octyl- β -glucopyranoside, les assemblages sont des micelles cylindriques (de longueur égale à 96 Å et de rayon égal à 12.7 Å) ou encore des micelles ellipsoïdales²⁵.

Tableau 8: Comparaison de la structure des micelles formées par le n-octyl- β -glucopyranoside, le n-octyl- β -maltopyranoside et le n-dodécyl- β -maltopyranoside⁹



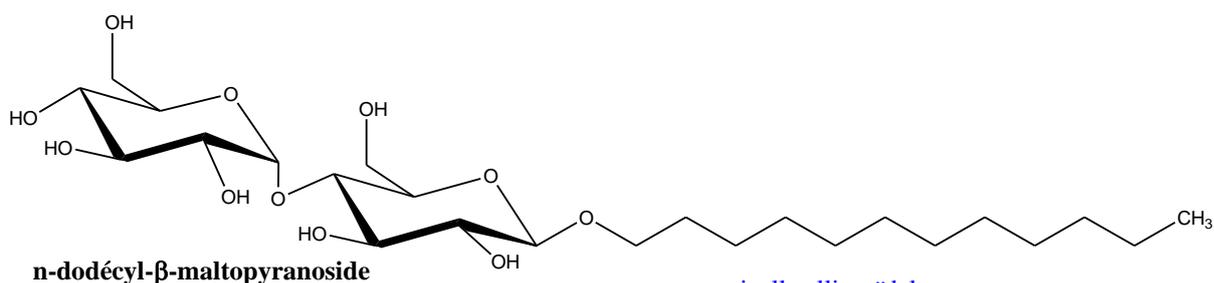
n-octyl- β -glucopyranoside

→ micelle cylindrique
ou ellipsoïdale



n-octyl- β -maltopyranoside

→ micelle sphérique



n-dodécyl- β -maltopyranoside

→ micelle ellipsoïdale

Par ailleurs, Dupuy et coll.² ont mis en évidence la formation de micelles avec des composés dérivés du lactose ayant une chaîne hydrophobe à 8, 9, 10 ou 12 atomes de carbone. La forme des micelles (ellipsoïdales) et la taille moyenne (diamètre le plus grand environ égal à 3 nm) en solution est quasiment similaire pour les dérivés C9, C10 et C12 déduite ici par SAXS. Cependant, dans le cas du dérivé ayant la chaîne la plus courte (C8), les auteurs ont remarqué que la formation de micelles s'accompagnait de la présence de petits agrégats, sans plus d'information sur ces derniers.

Dans ce travail, des mesures par SAXS ont été effectuées sur un seul lot pour chaque composé GlcC6, GlcC8, GlcC12 et GlcC16 à une concentration égale à 10 mM. D'après le calcul de leur paramètre d'empilement (Annexe 7), les assemblages devraient former des micelles. Les échantillons GlcC6 et GlcC16 n'ont malheureusement pas permis d'obtenir un signal exploitable lors de cette expérience (signal peu intense). Les résultats pour le GlcC8 et GlcC12 (le GlcC12 correspond au « lot 3 » du paragraphe I.2.5.2) cristallisés 24h à 4°C sont représentés sur la Figure 19.

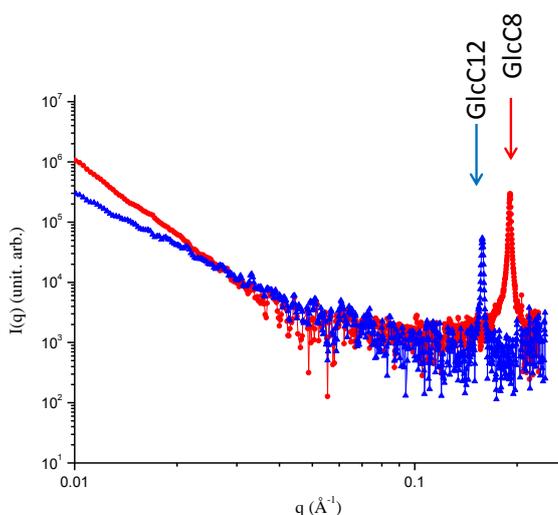


Figure 19: Comparaison en coordonnées logarithmiques représentant l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour des solutions de GlcC8 (en rouge) et GlcC12 (en bleu) à 10 mM. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2..

La courbe $I(q)$ présente un pic de diffraction très fin présentant son maximum respectivement à $q = 0.19 \text{ \AA}^{-1}$ et $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ pour le GlcC8 et le GlcC12. Les capillaires contenaient tous les deux un précipité blanc visible à l'œil nu. La microstructure de cet échantillon est donc caractérisée par une phase solide avec un pic de diffraction fin présent entre 0.1 et 0.2 \AA^{-1} (Annexe 8). Le maximum d'intensité peut être attribué à la longue période $D_{(hkl)} = 2\pi/q_{\max}$, qui est la distance de répétition entre deux feuillettes au sein du cristal.

	q (\AA^{-1})	$D_{(hkl)}$ (\AA)	Taille théorique du composé (\AA)
GlcC8	0.19	33.1	20.8
GlcC12	0.16	39.3	25.8

D'après ces résultats, on constate que la distance de répétition est supérieure à la taille théorique d'un composé amphiphile, et que cette distance augmente lorsque le nombre d'atomes de carbone augmente au sein de la chaîne hydrocarbonée. En extrapolant la courbe tracée (Figure 20) à partir de D_{hkl} en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrophobe, l'ordonnée à l'origine est censée correspondre à la taille de la tête polaire, D_m , puisque : $D_{hkl} = l_c + D_m$.

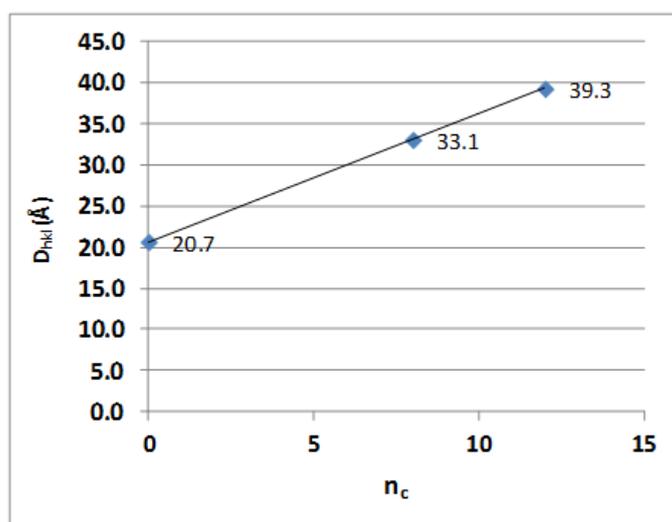


Figure 20: Représentation graphique de la distance de répétition en fonction du nombre d'atomes de carbone au sein de la chaîne hydrocarbonée de la molécule amphiphile

La taille extrapolée de la tête polaire serait alors égale à 20.7 Å. Toutefois, rappelons que les tailles théoriques calculées de la molécule entière de GlcC8 et GlcC12 sont respectivement de 20.8 Å et 25.8 Å et les tailles de la chaîne hydrocarbonée calculée sont respectivement de 12.4 Å et 18.6 Å pour le GlcC8 et le GlcC12. Les résultats calculés et extrapolés sont ainsi éloignés.

Les mesures relatives à ces molécules amphiphiles ont été réalisées pour un seul lot. Etant donné la différence d'histoire thermique de ces échantillons par rapport aux échantillons étudiés dans cette thèse, les mesures devront être reproduites.

I.4. Conclusion

Cette partie a été consacrée à l'étude des assemblages formés en solution aqueuse par les molécules amphiphiles synthétisées. Il semblerait qu'aucune étude n'ait été réalisée à ce jour pour déterminer les propriétés physico-chimiques de molécules amphiphiles identiques à celles que nous avons synthétisées. Les résultats obtenus semblent montrer que les composés amphiphiles forment des assemblages en solution aqueuse quelque soit la longueur de la chaîne alkyle. Les principales informations concernant les propriétés tensioactives, la taille et la distribution en taille ainsi que l'organisation structurale des assemblages formés sont présentés dans le graphique ci-dessous. L'organisation en solution est caractérisée par deux domaines de tailles caractéristiques, celui de micelles en solution, et celui d'agrégats de plus grande taille.

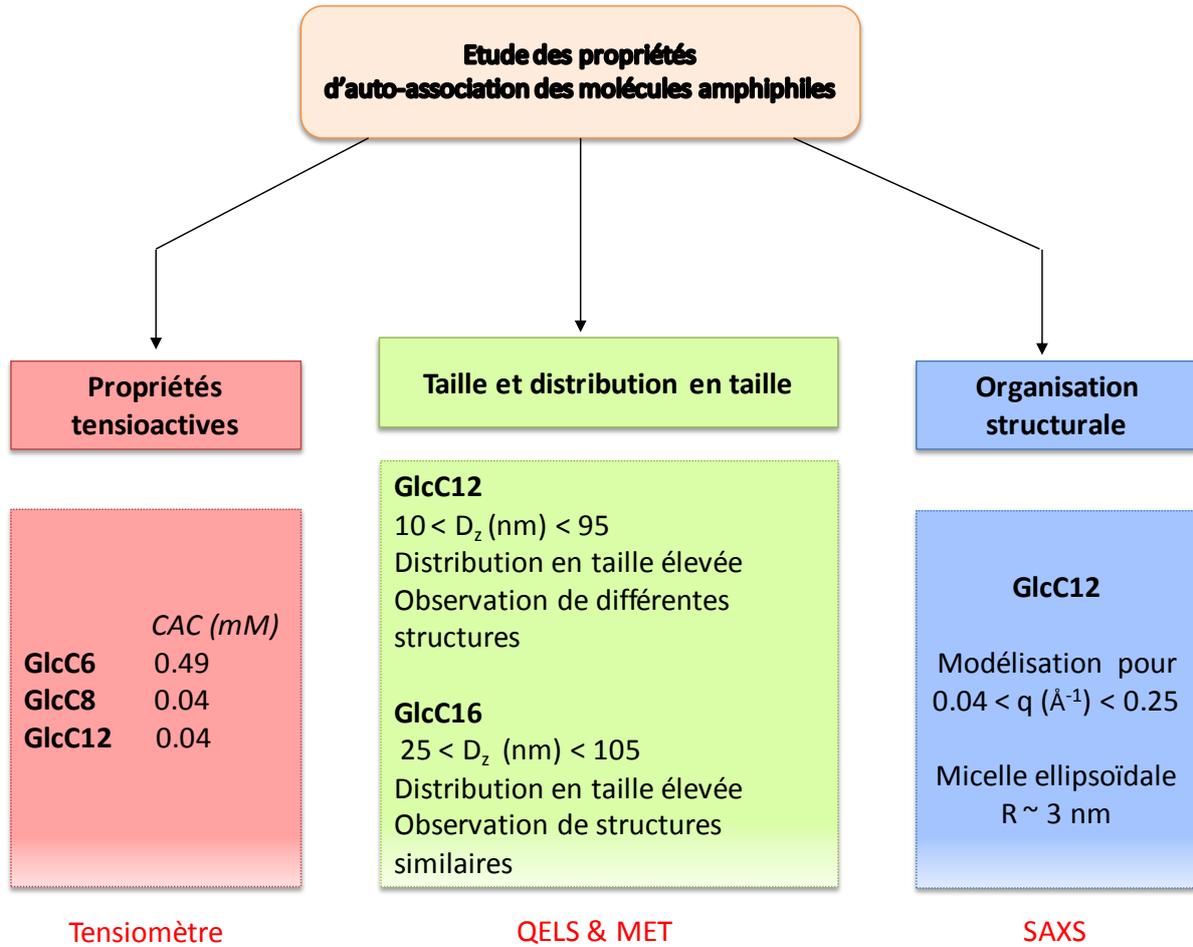


Figure 21: Graphique illustrant les principales informations concernant les molécules amphiphiles étudiées

II. Etude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles (GlcC6, GlcC12 et GlcC16) avec un phospholipide (DPPC)

II.1. Introduction

L'étude des assemblages formés par des phospholipides en milieu aqueux est bien décrite dans la littérature, notamment car les vésicules composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques peuvent permettre la vectorisation de principes actifs^{30,33-37}. Parmi ces phospholipides, la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), peut être considérée comme un phospholipide modèle puisque sa structure auto-associative de type vésiculaire a été très étudiée^{38,39} l'impliquant ainsi dans de nombreuses applications biomédicales^{33,40}.

Cette thèse s'inscrit dans une thématique générale de recherche visant à synthétiser des vecteurs à haute valeur ajoutée en utilisant des molécules amphiphiles bioactives. Le composé amphiphile est alors le propre acteur de sa formulation de par ses propriétés d'auto-association et de bioactivité (concept « d'économie moléculaire »). Dans ce contexte, le but de ce travail est de montrer la faisabilité de ces systèmes associant un phospholipide modèle (DPPC), et un composé amphiphile modèle synthétisé dans la première partie de ce travail (GlcC6, GlcC12 ou GlcC16).

L'impact de l'ajout d'une molécule amphiphile telle que le GlcC12 sur l'évolution de la nature et de la taille des vésicules de DPPC en milieu aqueux n'a pas été étudié précédemment dans la littérature. Notons toutefois que Dahbi et coll.⁴¹ ont mis en évidence que l'ajout d'une molécule amphiphile proche de celle étudiée (de type décylglucoside) perturbait la structure des assemblages formés par un phospholipide (DLPC). Ces auteurs ont montré par SAXS que la distance de répétition entre les bicouches au sein de vésicules multilamellaires diminuait de 61 Å à 59 Å lorsque la fraction molaire de décylglucoside augmentait de 0 % à 35 %. De façon plus générale, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence l'intérêt de l'addition des molécules amphiphiles sur les membranes⁴²⁻⁴⁴. Par exemple, Hildreth et coll.⁴⁵ et Caussanel et coll.⁴⁶ ont montré qu'il était possible d'extraire des protéines membranaires au sein de micelles mixtes en ajoutant des molécules amphiphiles à des membranes biologiques. Ils ont montré que la nature de la tête polaire du

composé ainsi que celle de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyle influait de façon significative sur l'efficacité de la solubilisation des membranes.

Dans cette thèse, il a été choisi de développer une étude sur les mélanges de DPPC avec le GlcC12, et d'étudier de façon préliminaire l'influence de la longueur de la chaîne sur la taille et la morphologie des assemblages formés en solution.

Différentes proportions molaires DPPC/GlcC12 ont été préparées (100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 50/50 ; 10/90 ; 0/100) et examinées de façon à mettre en évidence une éventuelle influence du pourcentage de molécule amphiphile sur la structure des assemblages. Comme précédemment (Figure 5), les assemblages ont été préparés par la méthode d'hydratation de film lipidique à une concentration de 10 mM en milieu aqueux.

Dans le but de prédire la nature des assemblages formés par les différents mélanges, le paramètre d'empilement pour les sept fractions de DPPC/GlcC12 a été évalué. En effet, ce calcul peut être réalisé sur des mélanges de molécules amphiphiles en tenant compte de la proportion molaire de chaque constituant^{47,48} (Équation 7).

Équation 7: Paramètre d'empilement pour les assemblages de DPPC/GlcC12

$$P = \frac{V_{DPPC}}{l_{c,DPPC} \times a_{0,DPPC}} X_{DPPC} + \frac{V_{GlcC12}}{l_{c,GlcC12} \times a_{0,GlcC12}} X_{GlcC12}$$

avec

- X_i fraction molaire de la molécule amphiphile dans l'assemblage
- V_i volume occupé par la chaîne hydrocarbonée²⁶ ($V=27.4+26.9.n_c$) (nm^3)
- l_{c_i} longueur de la chaîne hydrocarbonée²⁶ ($l_c=1.54+1.265.n_c$) (nm)
- a_0 aire occupée à l'interface par la tête polaire (nm^2)

La valeur de a_0 a été extraite de la littérature pour la DPPC ($a_0 = 52.3 \text{ \AA}^2$ à 25°C ³⁹) et calculée pour le GlcC12 ($a_0 = 62.8 \text{ \AA}^2$) page 156.

$$a_0 = \frac{4\pi R_c^2}{N_a}$$

Ce calcul prend donc en compte la longueur de la chaîne hydrocarbonée²⁶ (l_c) et le nombre d'agrégation.

Tableau 9 : Paramètre d'empilement P pour les différents assemblages de DPPC ($V=861.8 \text{ \AA}^3$, $l_c=20.5 \text{ \AA}$, $a_0=52.3 \text{ \AA}^2$, $n_c=15$) et de GlcC12 ($V=350.2 \text{ \AA}^3$, $l_c=16.8 \text{ \AA}$, $a_0=62.8 \text{ \AA}^2$, $n_c=12$).

DPPC/GlcC12 (% mol.)	100/0	99/1	95/5	90/10	50/50	10/0	0/100
P	0.80	0.80	0.78	0.75	0.57	0.38	0.33

Les valeurs de P pour les assemblages de DPPC/GlcC12 sont comprises entre $0.33 < P < 0.8$. Ainsi, d'après ce calcul, les assemblages de DPPC/GlcC12 ayant une fraction de DPPC comprise entre 0.9 et 1 auraient plutôt une géométrie de vésicule alors que les assemblages ayant une fraction de DPPC comprise entre 0 et 0.1 présenteraient plutôt une structure micellaire. Il semblerait donc que l'ajout de 10 % (mol.) de GlcC12 pourrait entraîner la solubilisation des vésicules formées par la DPPC. Ceci sera vérifié expérimentalement dans la suite de cette étude. En effet, le calcul du paramètre d'empilement tient uniquement compte de la chaîne hydrocarbonée dans son état étiré et il se peut que les lipides soient inclinés dans les bicouches des vésicules ou encore que les chaînes hydrocarbonées soient enchevêtrées. Il convient donc de rester critique vis-à-vis de ce calcul.

II.2. Evolution de la taille des assemblages de DPPC/GlcC12 par QELS

Le diamètre hydrodynamique moyen obtenu pour le GlcC12 seul a été comparé à ceux obtenus pour les mélanges DPPC/GlcC12. Les mesures ont été répétées au moins trois fois (Figure 22).

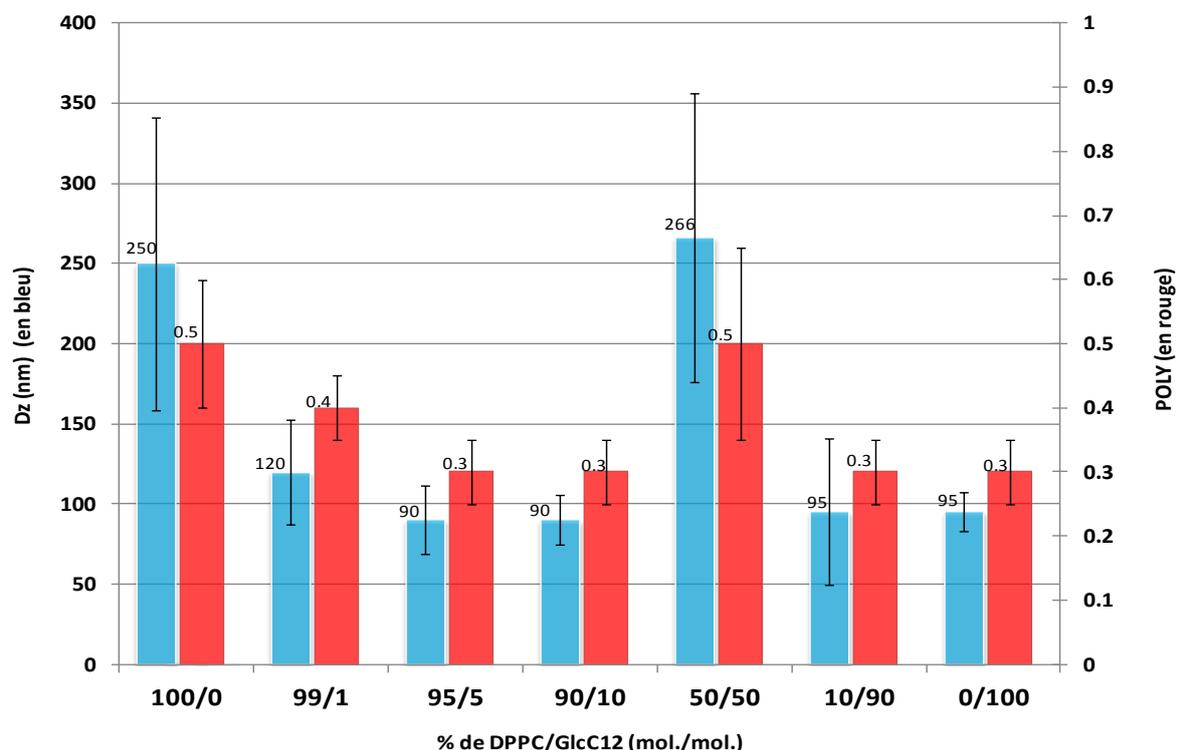


Figure 22: Représentation par histogramme de la taille (en bleu) des assemblages de DPPC/GlcC12 à une concentration de 1mM pour des ratios de DPPC/GlcC12 égaux à 100/0; 99/1; 95/5; 90/10; 50/50 ; 10/90; 0/100.

Dans les formulations, l'ajout de GlcC12 fait évoluer la taille des assemblages à l'échelle de la centaine de nanomètres formés par la DPPC puisque dès 1 %, le diamètre des assemblages diminue. A partir de 10 % de GlcC12 on remarque que la taille des assemblages reste relativement constante (sauf pour 50%). Pour toutes les fractions, les valeurs de POLY sont de l'ordre de 0.37 ± 0.08 et dénotent d'une distribution en taille relativement large. Sur le cliché représentant les suspensions de mélanges de DPPC/GlcC12 (Figure 23), on peut remarquer que l'aspect visuel opaque blanc du mélange 50/50 est similaire à celui de la DPPC, ce qui pourrait confirmer la présence d'objets de taille élevée en solution dans ce cas-là.

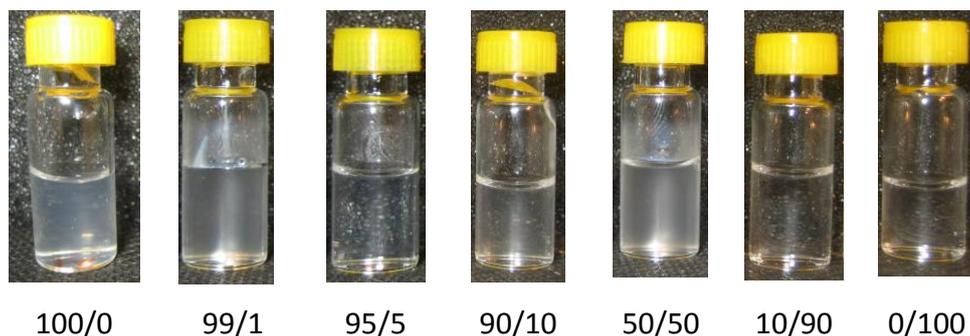
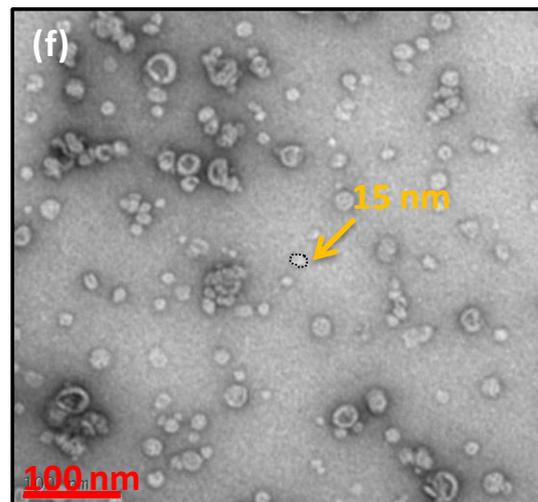
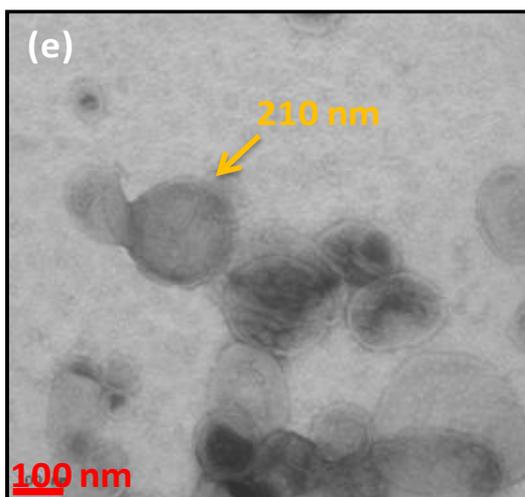
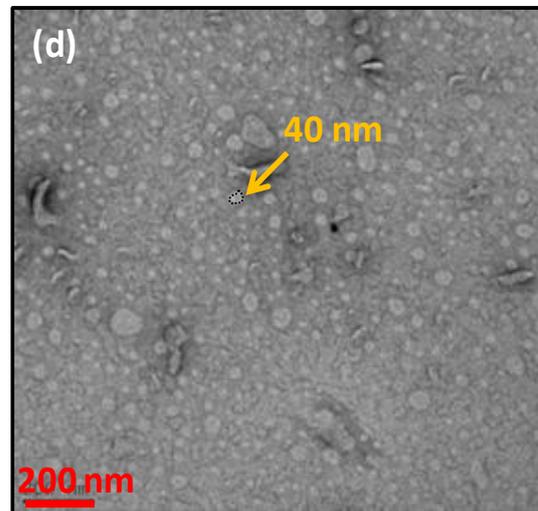
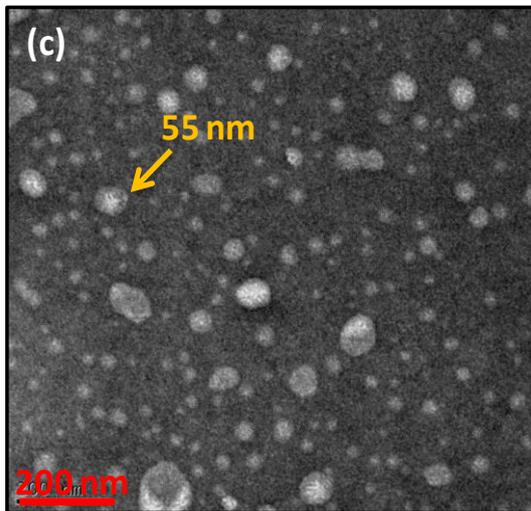
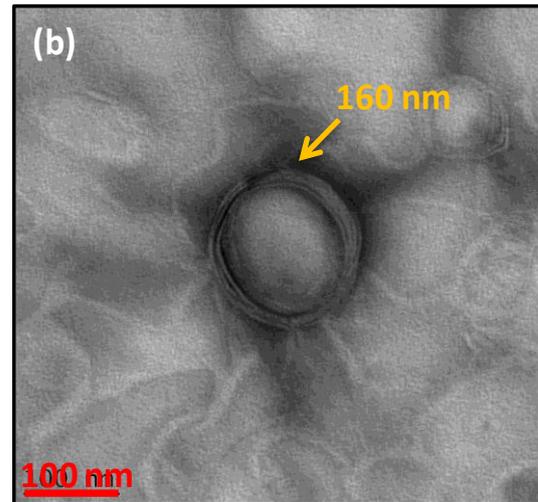
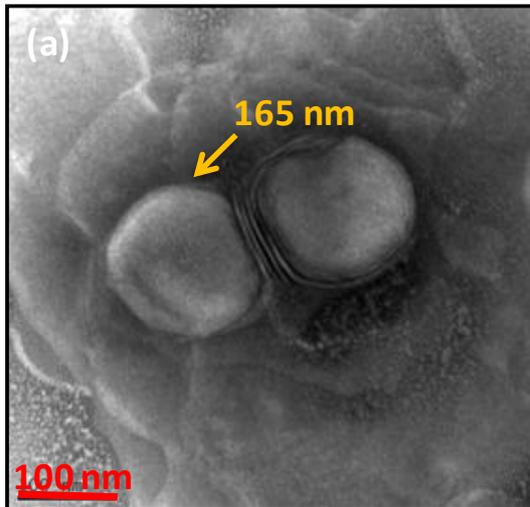


Figure 23: Photographies des suspensions des mélanges de DPPC/GlcC12 à 100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 50/50 ; 10/90 ; 0/100 à une concentration de 1 mM dans l'eau.

La stabilité des assemblages formés a été étudiée après une conservation à 4°C à une concentration de 10 mM au bout de 7 jours. La taille des assemblages de DPPC /GlcC12 à 100/0 ; 99/1 ; 95/5 et 50/50 a respectivement augmenté de 75%, 70%, 30% et 35%. La taille des autres assemblages de DPPC/GlcC12 90/10 ; 10/90 et 0/100 n'a pas évolué significativement. Il semblerait donc qu'à partir de 10% de composé amphiphile introduit, la taille des objets soit stable sur ce laps de temps (mis à part l'assemblage 50/50 qui présente un comportement ne s'inscrivant pas dans la tendance générale). Les organisations supramoléculaires en solution à l'échelle de la centaine de nanomètres et au-delà, formés par les composés amphiphiles seraient ainsi plus stables que ceux formés par la DPPC.

II.3. Etude de la morphologie des assemblages de DPPC/GlcC12 par MET

L'évolution de la morphologie des assemblages de DPPC/GlcC12, avec le pourcentage de molécule amphiphile ajouté, a été confirmée par des observations en microscopie électronique en transmission (Figure 24).



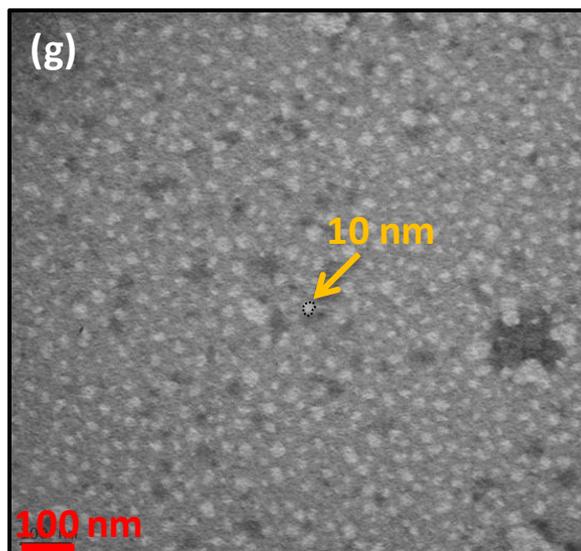


Figure 24: Clichés obtenus par MET représentant l'évolution de la taille des assemblages formés par les mélanges DPPC/GlcC12 : (a) 100/0 (et Annexe 9); (b) 99/1 ; (c) 95/5 ; (d) 90/10 ; (e) 50/50 ; (f) 10/90 ; (g) 0/100 de concentration de 1 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit en paragraphe I.2.2.

Sur les clichés de microscopie, la taille des assemblages diminue avec l'ajout de GlcC12. Dès l'ajout de 5 % mol. de molécule amphiphile (Figure 24c), les vésicules multilamellaires formées semblent disparaître au profit d'objets de taille plus faible, de type vésicules plutôt unilamellaires ou de micelles. Les observations ont été répétées plusieurs fois mais il convient de rester critique vis-à-vis des résultats étant donné la difficulté à obtenir des clichés toujours reproductibles.

II.4. Etude de la structure des assemblages de DPPC/GlcC12 par SAXS

La superposition des courbes d'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q à une concentration de 10 mM pour les mélanges de DPPC/GlcC12 (100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 50/50 10/90 ; et 0/100) est présentée en Figure 25.

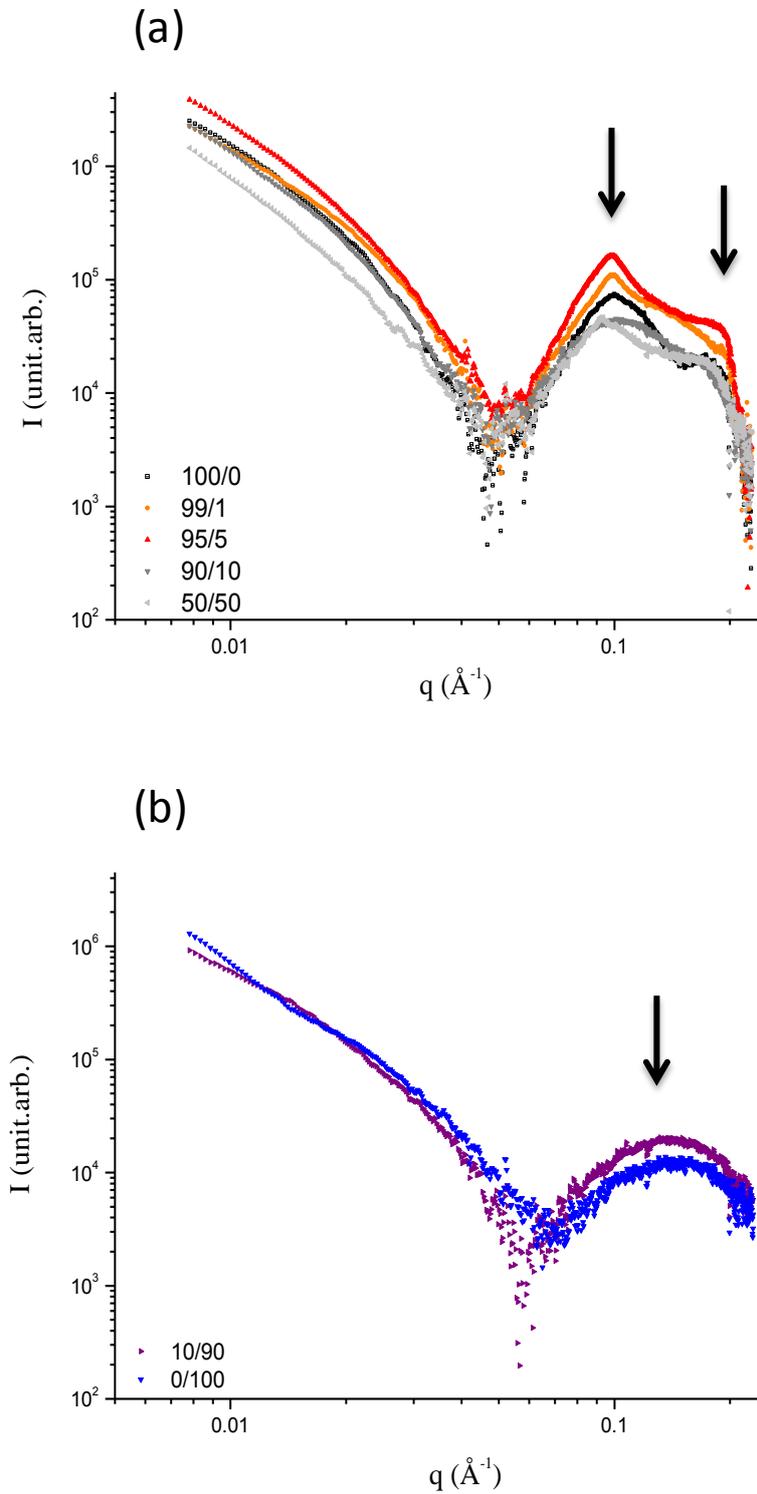


Figure 25: Comparaison en coordonnées logarithmiques de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour des solutions de mélanges de DPPC/GlcC12 à une concentration de 10 mM dans l'eau et préparés selon le protocole décrit en I.2.2.. Mise en évidence de deux tendances (a) 100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 50/50 et (b) 10/90 ; 0/100.

D'après cette représentation graphique, toutes les courbes présentent un comportement comparable aux petits angles ($q < 0.05 \text{ \AA}^{-1}$). Cependant, le comportement aux plus grands q ($q > 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) dépend de la fraction DPPC/GlcC12 au sein de la solution. En effet, pour les fractions 100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 50/50 (Figure 25a), on observe un pic assez large vers $q = 0.10 \text{ \AA}^{-1}$ suivi d'un épaulement aux plus grands q , alors que pour les fractions 10/90 ; 0/100 (Figure 25b), on observe un maximum plus diffus pour les hautes valeurs de $q \sim 0.11 \text{ \AA}^{-1}$.

II.4.1. Modélisation des résultats obtenus

La modélisation des résultats obtenus semble délicate en regard du choix du modèle à utiliser étant donné que les assemblages sont formés par des mélanges de composés. Deux stratégies ont été comparées. Dans un premier temps nous avons modélisé les résultats de la DPPC par un modèle de vésicule, puis observé l'influence de l'ajout du composé amphiphile sur ce modèle. Dans un second temps, nous sommes partis de la modélisation du GlcC12 par le modèle de micelle sphérique et elliptique décrit précédemment, puis nous avons observé l'influence de l'ajout de DPPC sur les résultats obtenus.

II.4.1.1. Modélisation selon le modèle de vésicule

Dans la littérature, le comportement des assemblages constitués de DPPC est généralement modélisé par un modèle de vésicule unilamellaire²⁷ ou multilamellaire^{40,49}. Nous avons choisi de modéliser les assemblages formés par la DPPC d'après le modèle de vésicule unilamellaire décrit par Hirai et coll.²⁷. Cette modélisation tient compte des différentes couches de densité électroniques différentes présentes au sein de la vésicule unilamellaire et de la distribution des vésicules dans la solution. La vésicule est alors constituée de quatre couches : la région du cœur remplie d'eau, et la bicouche constituée de trois parties qui sont une région hydrophobe (chaînes hydrocarbonées de la DPPC) enveloppées par deux régions hydrophiles (les têtes polaires de la DPPC). L'intérieur d'une vésicule étant aqueux, les paramètres de modélisation sont les épaisseurs et la densité électronique des couches hydrophiles et hydrophobes. Le facteur de forme est exprimé par la relation suivante (Équation 8):

Équation 8: Facteur de forme du modèle décrit par Hirai et coll.²⁷

$$I_s(q, R_1, R_2, \dots, R_i, \dots, R_n) = 9 \left\{ \frac{\rho_1 V_1 j_1(qR_1)}{qR_1} + \sum_{i=2}^n \frac{(\rho_i - \rho_{(i-1)}) V_i j_1(qR_i)}{(qR_i)} \right\}^2$$

Avec

$$j_1(x) = \frac{\sin x}{x^2} - \frac{\cos x}{x}$$

$$V_i = \frac{4}{3} \pi R_i^3$$

En tenant compte de la distribution des vésicules dans la solution, l'expression de l'intensité diffusée devient (Équation 9):

Équation 9: Fonction de l'intensité diffusée pour le modèle décrit par Hirai et coll.

$$I(q) = \int_{R_{min}}^{\infty} I_s(q, R_1) D(R_1) dR_1$$

$$\text{avec } D(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp \left\{ -\frac{(R-R_{moy})^2}{2\sigma^2} \right\}$$

Dans un premier temps, la courbe expérimentale de l'intensité diffusée I par rapport au vecteur de diffusion q pour la DPPC a été comparée à celle obtenue par Hirai et coll.²⁷ (Figure 26).

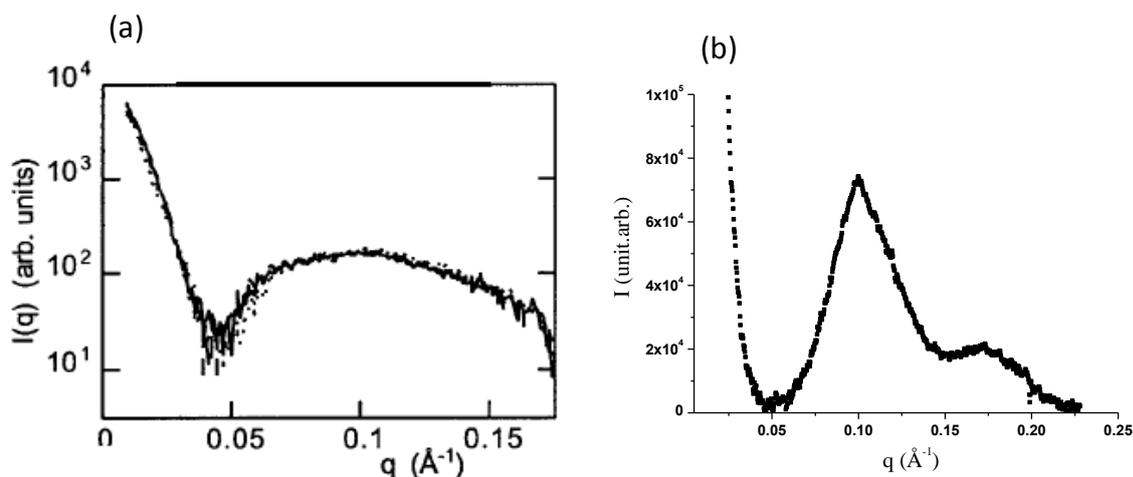


Figure 26: Comparaison en coordonnées linéaires de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour la DPPC d'après Hirai et coll.²⁷ (a) et d'après nos résultats (b).

La Figure 26 met en évidence une différence d'organisation des résultats puisque dans le cas (a) on observe un maximum diffus vers $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, alors que dans le cas (b), on observe un pic vers $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ suivi d'un épaulement aux plus grands q . Ceci pourrait être dû à la présence de vésicules multilamellaires au sein de notre échantillon de DPPC, par opposition à celui de Hirai et coll.²⁷ où la présence de vésicules unilamellaire est caractérisée par la présence d'un maximum diffus. Dans le cas de l'étude d'Hirai, la préparation des vésicules comporte des étapes supplémentaires de filtration à travers des membranes de pores de 0.1 \mu m et une analyse quasiment extemporanée ($t_{\text{analyse}} = t_{\text{préparation}} + 24\text{h}$).

Les données expérimentales des différentes fractions obtenues dans ce travail ont été modélisées d'après le modèle d'Hirai. Un exemple de cette modélisation est représenté ci-dessous (Figure 27).

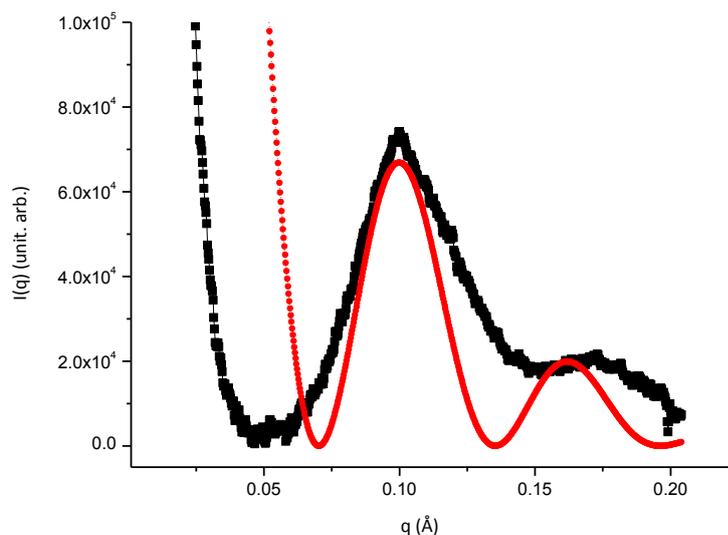


Figure 27 : Intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q en coordonnées linéaires des vésicules de DPPC à une concentration en DPPC de 10 mM dans l'eau (en noir) et modélisation des résultats par le modèle d'Hirai et coll.²⁷ (en rouge).

La présence des vésicules multilamellaires de différentes tailles semble jouer un rôle sensible sur le diagramme de diffusion. D'après les résultats expérimentaux obtenus ici, il semblerait qu'un pic fin soit présent vers $q \sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ et soit représentatif de la contribution des vésicules multilamellaires. Les fractions de DPPC/GlcC12 à 99/1 ; 95/5 ; 90/10 et 50/50 présentent toutes une allure proche et aucune des fractions n'a été correctement modélisée par le modèle d'Hirai et coll.²⁷. De ce fait, il a été mis en évidence que l'utilisation du modèle d'Hirai et coll.²⁷ ne s'applique pas aux vésicules multilamellaires de DPPC.

Les données expérimentales ont permis de déterminer la distance de répétition $D_{(hkl)}$ entre deux lamelles au sein de l'assemblage⁵⁰. Celle-ci est similaire pour les fractions 100/0, 99/1, et 95/5.

DPPC/GlcC12	100/0	99/1	95/5	90/10	50/50
$D_{(hkl)}$ (Å)	62.8	62.8	63.3	/	62.8

Ainsi, la distance de répétition n'est pas significativement influencée par l'ajout de GlcC12 jusqu'à une composition de 50/50%.

II.4.1.2. Modélisation selon le modèle de micelle sphérique ou ellipsoïdale

Précédemment, nous avons montré que la modélisation du GlcC12 en solution aqueuse avec un modèle de micelle de type ellipsoïdale donnait des résultats corrects. C'est pourquoi nous avons choisi d'observer l'évolution de l'ajout de DPPC aux mélanges DPPC/GlcC12 au travers de ce modèle. En outre, la MET a permis de mettre en évidence que les assemblages présentaient une variété de forme importante dans la gamme de tailles caractéristiques supérieure à 100 nm, ce qui ne sera pas abordé ici. De ce fait, nous avons effectué une convolution à partir des modèles de micelle sphérique et ellipsoïdale. Les résultats sont présentés uniquement pour les fractions 90/10 ; 50/50 ; 10/90 étant donné que les assemblages 100/0 ; 99/1 et 95/5 semblent être plutôt de type vésiculaire.

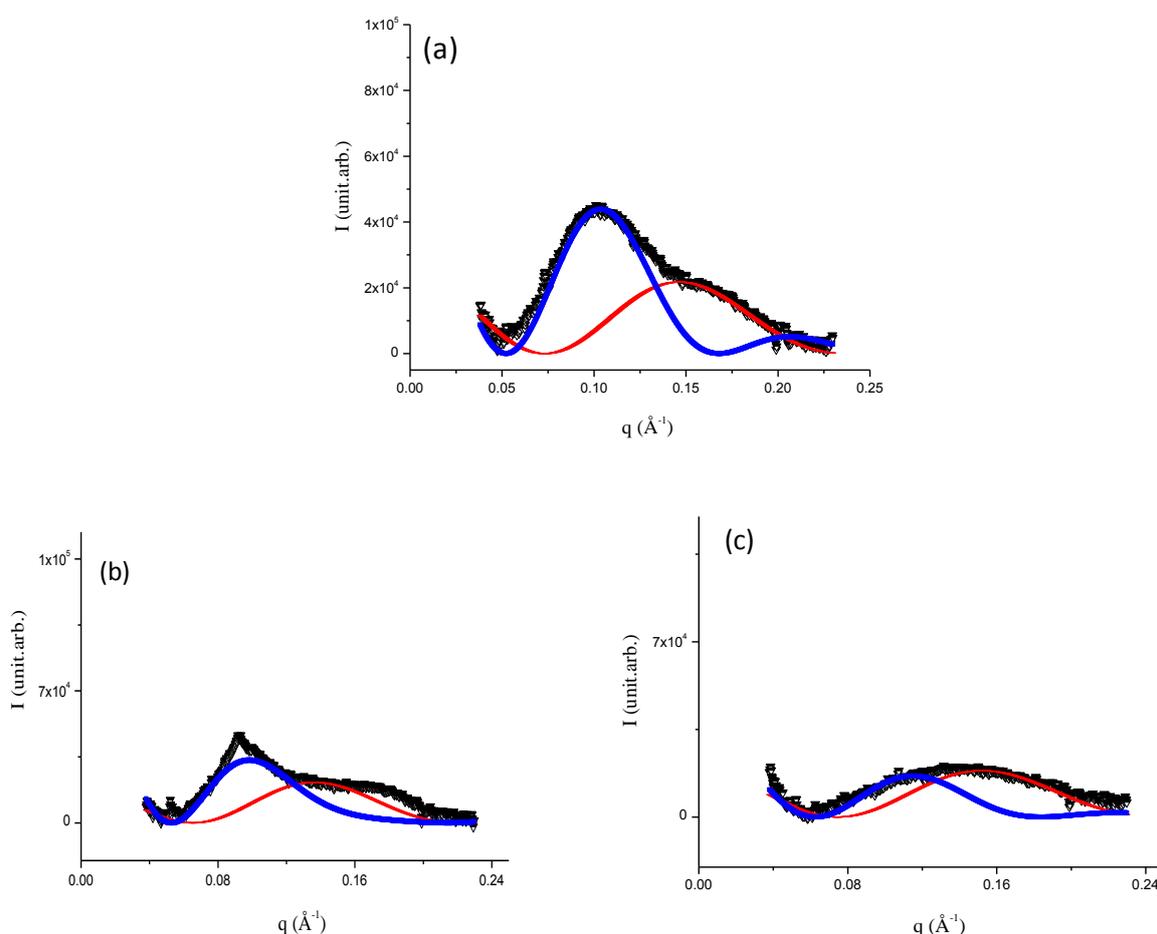


Figure 28 : Comparaison en coordonnées linéaires de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q pour les mélanges de DPPC/GlcC12 à une concentration de 10 mM (en noir) et modélisation des résultats par le modèle de micelle sphérique (en rouge) et ellipsoïdale (en bleu). Les mélanges sont (a) 90/10 ; (b) 50/50 ; (c) 10/90 dans l'eau.

Ces représentations graphiques mettent en évidence l'impact du pourcentage de molécule amphiphile et de DPPC sur la nature des assemblages formés en solution. Les résultats des modélisations pour les mélanges de DPPC/GlcC12 sont listés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Résultats de la modélisation des mélanges de DPPC/GlcC12

DPPC/GlcC12 (mol./mol.)	0/100	10/90	50/50	90/10
<i>Modèle de micelle sphérique</i>				
R _c (nm)	-	1.89	2.11	1.96
E _c (nm)	-	1.11	1.21	1.18
<i>Modèle de micelle ellipsoïdale</i>				
R _{ca} (nm)	1.59	2.41	2.37	2.69
R _{cb} (nm)	1.65	3.09	4.28	3.37
R _{cb} /R _{ca}	1.03	1.28	1.81	1.25
E _c	1.23	1.21	1.20	1.20

Mis à part pour le mélange 50/50, les résultats semblent révéler une tendance à l'augmentation du rayon du cœur de l'assemblage avec l'ajout de DPPC. De plus, l'évolution du facteur R_{cb}/R_{ca} correspondrait à un allongement de la forme de la micelle par rapport à la distance R_{cb}. Il est possible que les assemblages soient formés de micelles sphériques et ellipsoïdales pour les fractions 90/10 et 10/90. Cependant, pour la fraction 50/50 (Figure 28b), la présence de vésicules caractérisées par un pic fin vers $q \sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ indique que le modèle de micelles n'est pas représentatif de l'ensemble de l'échantillon.

II.4.2. Effet de la température sur les assemblages

Les courbes représentatives des échantillons mesurés à différentes températures pour quatre fractions DPPC/GlcC12 (100/0 ; 90/10 ; 10/90 ; 0/100) sont représentées sur la Figure 29.

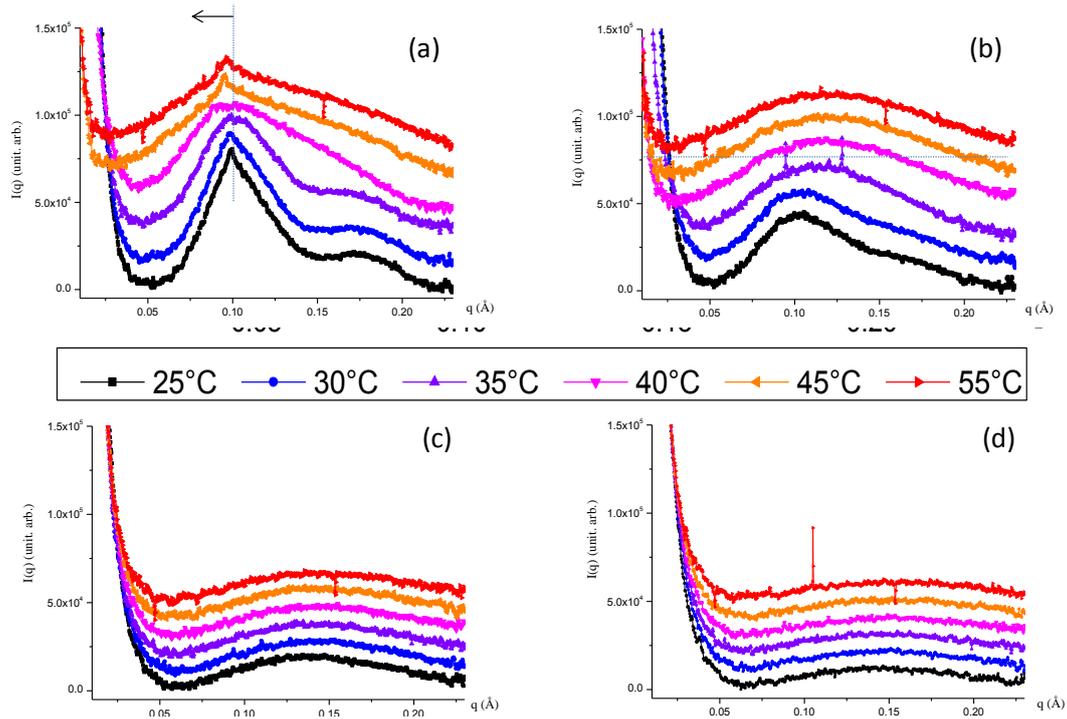


Figure 29: Dépendance des courbes de l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q par rapport à la température pour DPPC/GlcC12 (a) 100/0; (b) 90/10; (c) 10/90; (d) 0/100. Les courbes ont toutes été décalées avec un terme additif pour une meilleure lisibilité.

Concernant les résultats obtenus pour la DPPC (Figure 29a), on a obtenu des résultats similaires à ceux de Denisov et coll.⁵¹. A savoir que, lorsque la température augmente, la position du premier maximum se décale vers les plus petits angles et l'intensité aux petits angles diminue. Les courbes représentatives des assemblages de GlcC12 (Figure 29d) et de DPPC/GlcC12 10/90 (Figure 29c) ne semblent pas évoluer avec l'augmentation de la température, et sont parfaitement superposables pour les grands q . Concernant le mélange DPPC/GlcC12 à 90/10 (Figure 29b), il semblerait qu'une transition structurale soit présente entre 35°C et 40°C qui entraînerait la disparition de vésicule au profit de micelles. Deux transitions sont observées pour la DPPC pure entre 35°C et 40°C et entre 40°C et 45°C. Dans la littérature, il a été montré que ces transitions ($t_1 = 35.3^\circ\text{C}$ et $t_2 = 40.7^\circ\text{C}$) sont caractéristiques de changement de phase pour la DPPC multilamellaire⁵².

II.5. Influence de la longueur de chaîne de la molécule amphiphile dans les mélanges avec la DPPC

II.5.1. Mélange avec le N-hexyl-1-amino-désoxy-D-glucitol (GlcC6)

La Figure 30 représente l'évolution de la distribution de taille des assemblages de mélanges de DPPC/GlcC6 à 100/0 ; 90/10 ; 50/50 ; 0/100 ; mesurée par QELS.

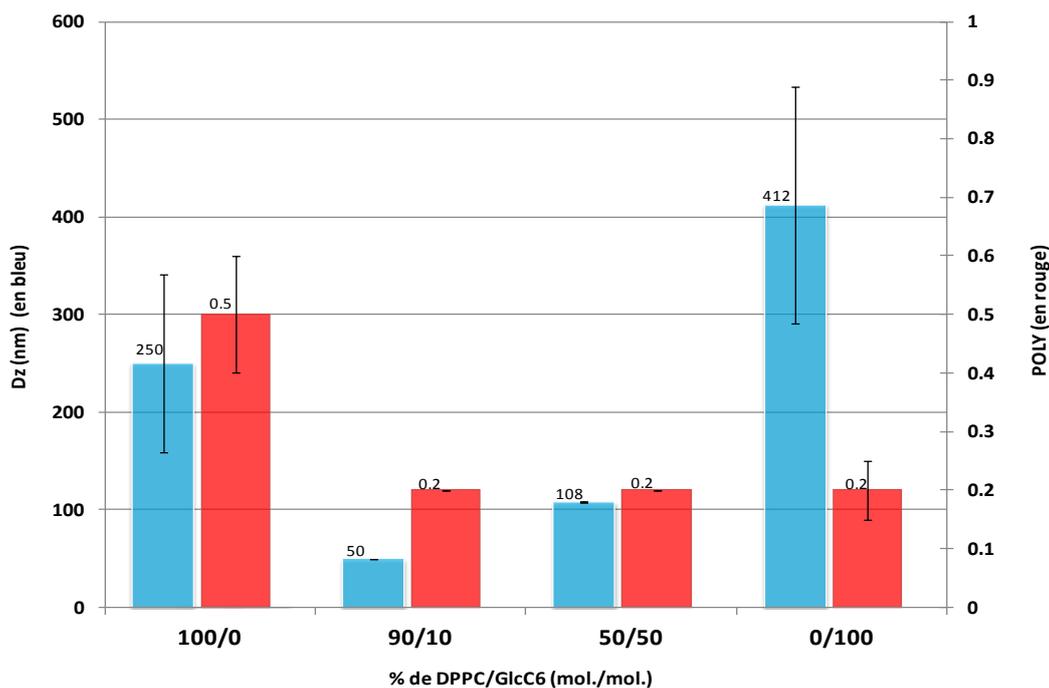


Figure 30: Représentation par histogramme de la taille (en bleu) des assemblages de DPPC/GlcC6 à une concentration de 1mM dans l'eau pour des ratios de DPPC/GlcC6 égaux à 100/0; 50/50; 10/90; 0/100.

Là encore, les résultats montrent que l'ajout de GlcC6 à la DPPC entraîne une modification de la taille des assemblages formés dans une gamme de tailles caractéristiques de l'ordre de 50 nm et au-delà. Il est en effet possible que la structure vésiculaire des assemblages formés par la DPPC soit aussi altérée par la présence de ces molécules amphiphiles. Ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné la valeur de POLY élevée, en particulier pour le GlcC6 100/0. Ces observations ont été complétées par les clichés de microscopie électronique en transmission (Figure 31).

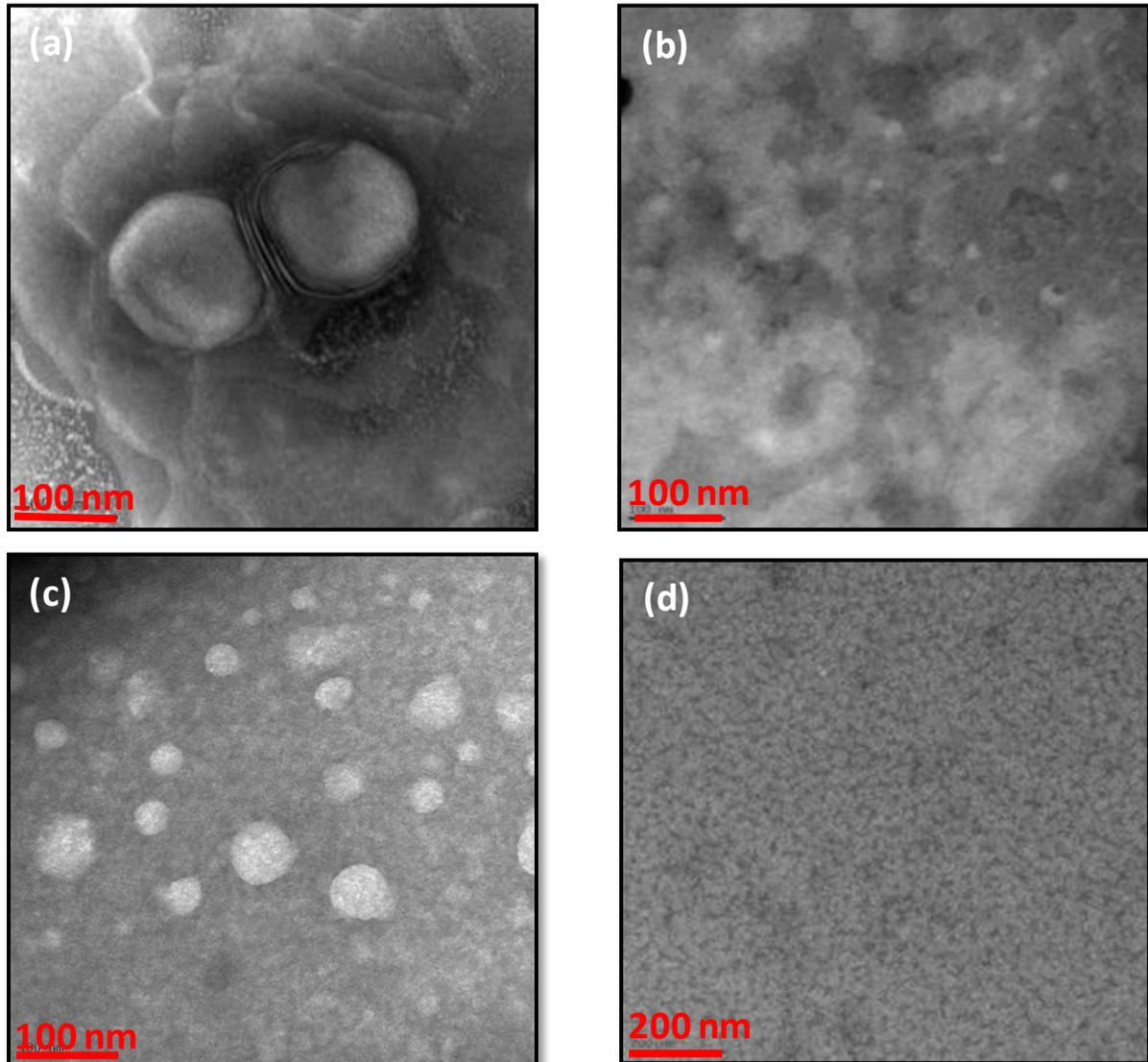


Figure 31 : Clichés obtenus par MET pour les assemblages formés par les mélanges de DPPC/GlcC6: (a) 100/0 ; (b) 90/10; (c) 50/50; (d) 0/100, pour des grilles préparées à partir de solutions aqueuses en molécules amphiphiles de concentration de 10 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant.

Par comparaison avec le cliché représentant les assemblages de DPPC, il est délicat de mettre en évidence une évolution systématique du système en fonction de l'ajout de GlcC6. Pour une fraction de 50/50 (mol./mol.) (Figure 31c), la présence d'objet de taille plus faible est observée, de type sphériques. Aucune conclusion n'a cependant pu être obtenue pour

les autres fractions. Ces mesures devront être répétées par la suite afin de pouvoir confirmer ces résultats préliminaires.

II.5.2. Mélange avec le N-hexadécyl-1-amino-désoxy-D-glucitol (GlcC16)

La Figure 32 représente l'évolution de la distribution de taille des assemblages de mélanges de DPPC/GlcC16 mesurée par QELS.

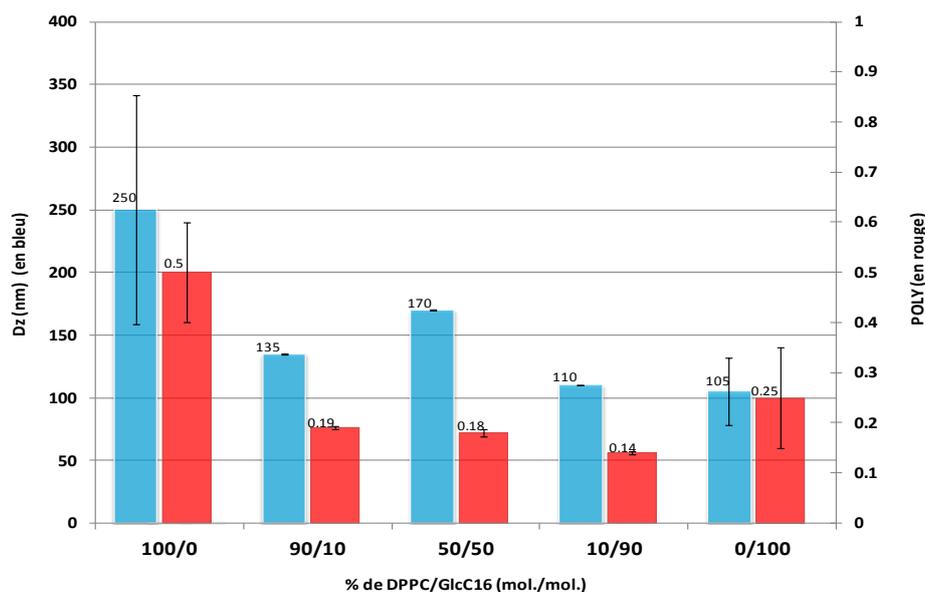


Figure 32: Représentation par histogramme de la taille (en bleu) des assemblages de DPPC/GlcC16 à une concentration de 1 mM dans l'eau pour des ratios de DPPC/GlcC16 égaux à 100/0; 90/10 ; 50/50; 10/90; 0/100.

L'ajout de GlcC16 dans la formulation DPPC entraîne une faible diminution de la taille des assemblages formés. Il est possible que la structure vésiculaire des assemblages formés par la DPPC, possédant deux chaînes hydrophobes à 16 atomes de carbone, ne soit que faiblement altérée par la présence de molécules amphiphiles dont la partie hydrophobe est une chaîne contenant 16 atomes de carbone. Cependant, les valeurs de POLY allant jusque 0.5 dénotent d'une distribution en taille relativement large pour toutes les fractions. Les résultats sont donc à interpréter de nouveau avec précaution. La stabilité des assemblages formés a été étudiée après une conservation à 4°C à une concentration de 10mM au bout de 7 jours. La taille des assemblages de DPPC /GlcC16 à 50/50 a augmenté de 75 %. La taille des autres assemblages de DPPC/GlcC16 90/10 ; 10/90 et 0/100 n'a pas évolué significativement.

Tout comme pour les assemblages de GlcC12, les assemblages formés par les molécules amphiphiles GlcC16 seraient plus stables que ceux formés par la DPPC. De plus, l'évolution de la morphologie des assemblages avec DPPC/GlcC16 a été partiellement confirmée par les clichés de microscopie électronique en transmission (Figure 33).

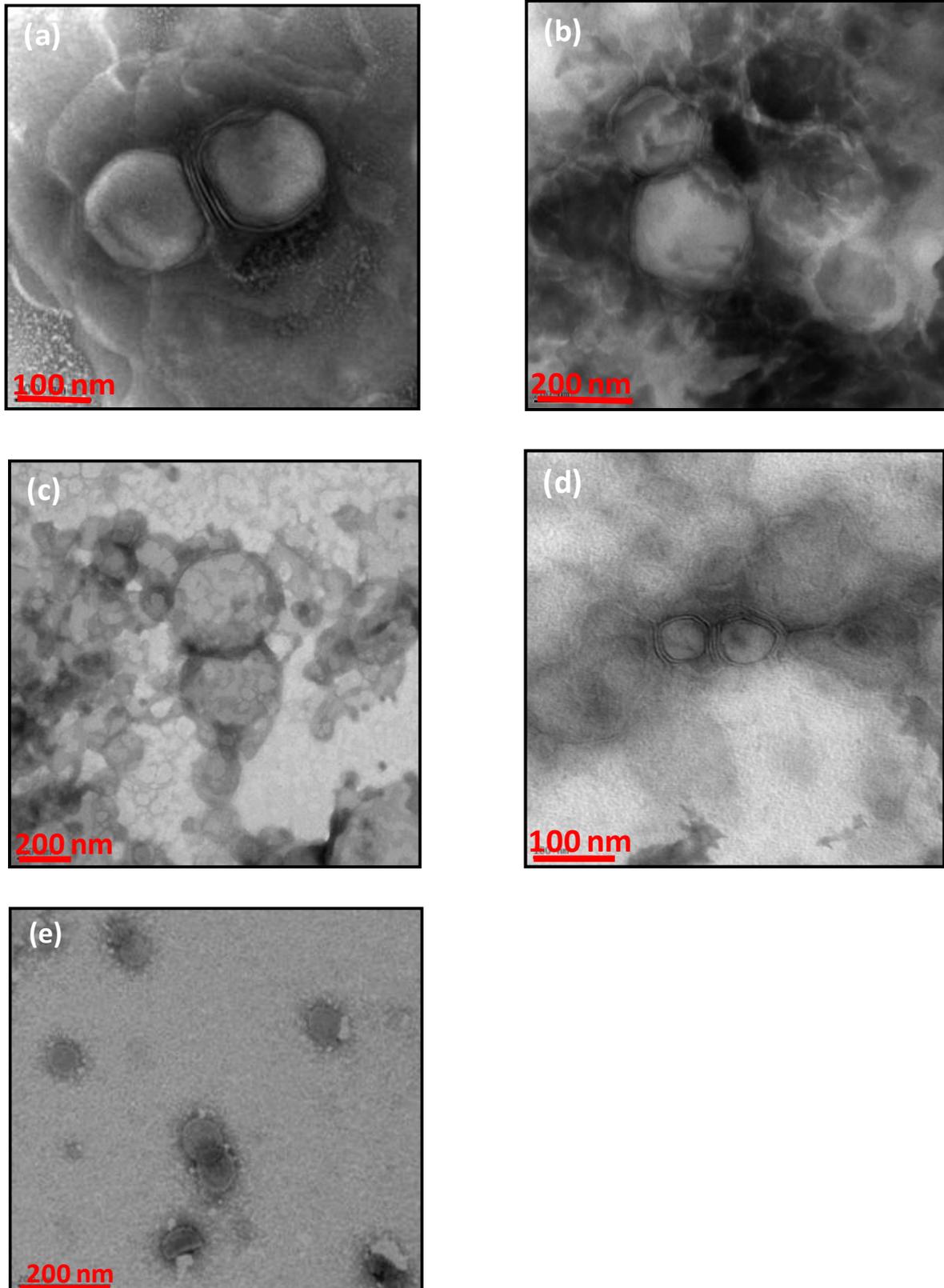


Figure 33: Clichés obtenus par MET pour les assemblages formés par les mélanges de DPPC/GlcC16: (a) 100/0 ; (b) 90/10 ; (c) 50/50 ; (d) 10/90 ; (e) 0/100, pour des grilles préparées à partir de solutions aqueuses en molécules amphiphiles de concentration de 10 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant.

La plupart des assemblages semblent conserver une structure vésiculaire avec l'addition de GlcC16. Notons toutefois que le cliché représentant l'assemblage de DPPC/GlcC16 à 50/50 (Figure 33c) présente des objets de forme variée et assez différente de celles rencontrées pour les autres assemblages.

II.6. Conclusion

Dans cette partie, l'étude de l'influence du pourcentage molaire de molécule amphiphile sur la formation d'assemblages de DPPC/molécule amphiphile a été étudiée. Même si la compréhension de l'organisation à différentes échelles de taille est délicate, une tendance générale a été mise en évidence. Il a été montré que l'ajout de la molécule amphiphile dans les mélanges DPPC/molécule amphiphile entraînait une diminution de la taille des assemblages formés dans la gamme de tailles de l'ordre de 100 nm, et cela pour les trois longueurs de chaîne. A partir de 10% (mol.), la taille des assemblages reste relativement constante. De plus, un comportement particulier a été mis en évidence pour la fraction 50/50 pour laquelle les assemblages sont de taille très élevée. Ces observations sont à considérer en se rappelant que la distribution des systèmes est relativement large tant au niveau de la taille que parfois au niveau de la forme.

Conclusion

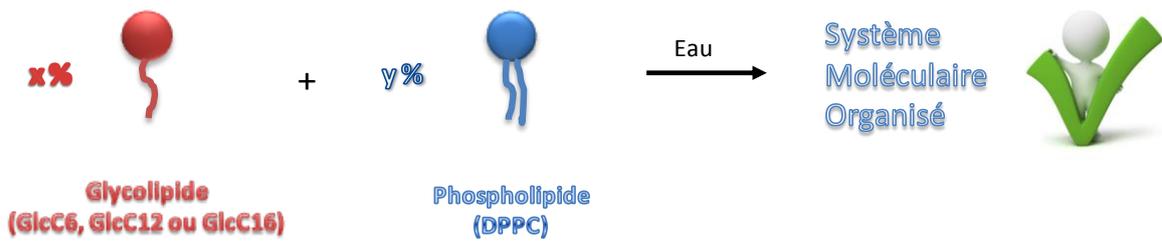
Ce troisième chapitre a été consacré à l'étude des propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles dont le travail de synthèse a été présenté dans le chapitre précédent.

Dans la première partie de ce chapitre, l'étude des propriétés physico-chimiques du GlcC12 synthétisé a été réalisée. Son comportement tensioactif a été mis en évidence par des mesures en tensiométrie. L'utilisation de la MET a permis d'observer la présence d'assemblages de taille d'environ 100 nm, avec une distribution en taille relativement large et une variété de forme. La modélisation des données expérimentales en SAXS a complété cette observation et il semblerait que les assemblages formés en solution comprennent également des micelles de type ellipsoïdales de taille d'environ 3 nm de rayon. Une des perspectives de ce travail est de complexifier la modélisation en SAXS en introduisant la distribution en taille des assemblages micellaires et d'ajouter la contribution des objets de plus grande taille visibles en QELS. Ainsi, il serait possible de prendre en compte l'organisation à différentes échelles avec des objets de grande taille qui ont été observés par MET. Par ailleurs, une étude préliminaire a été effectuée afin de constater l'influence de la longueur de chaîne de la molécule amphiphile sur la nature des assemblages formés en solution aqueuse. A la différence du GlcC12, les assemblages formés par le GlcC16 seraient de taille plus élevée (entre 25 nm et 100 nm) et de forme moins variée. Aucune certitude n'a pu être établie quant à la nature des assemblages réalisés par le GlcC6 et le GlcC8.

Dans la seconde partie de ce chapitre, l'impact de la formulation du GlcC12 avec un phospholipide modèle (la DPPC) a été examiné. Il semblerait que l'ajout de ce composé amphiphile permette de solubiliser les vésicules multilamellaires formées par la DPPC pure, et ce dès une fraction molaire de 10 % (mol.). La QELS a permis de mettre en évidence la diminution de la taille des assemblages formés tout en considérant la distribution en taille élevée des assemblages. La MET a quant à elle permis de confirmer la présence de vésicules multilamellaires pour des assemblages de DPPC/GlcC12 à 100/0 et 99/1 et d'assemblages de nature différente pour les autres fractions. Par SAXS, il a été constaté que l'ajout de molécule amphiphile au sein de la DPPC semble engendrer une diminution de la taille des assemblages micellaires. Graphiquement il a été possible d'observer la solubilisation des vésicules multilamellaires par le GlcC12 grâce à la disparition du maximum vers $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, et

à l'apparition d'un maximum plus diffus vers $q = 0.11 \text{ \AA}^{-1}$. En outre, il a été montré par toutes les techniques de caractérisation que les assemblages formés à partir d'un mélange équimolaire des deux constituants possédaient un comportement particulier.

Cette partie a permis de montrer la possibilité d'auto-association de systèmes moléculaires organisés en milieu aqueux pour les molécules amphiphiles seules ou en mélange avec la DPPC.



Cet objectif étant atteint, il est maintenant nécessaire d'approfondir la connaissance de ces assemblages, notamment en reproduisant les résultats obtenus.

Partie expérimentale

A. Produits commerciaux utilisés

Les solvants proviennent de chez Sigma Aldrich. Ils ont été utilisés sans purification supplémentaire.

La 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) est fournie par Sigma Aldrich (CAS : 63-89-8, pureté environ 99%). Le 1-désoxy-1-(octylamino)-D-glucitol (appelé GlcC8 dans ce document) provient de Sigma Aldrich (CAS : 23323-37-7, pureté 98 %).

B. Réalisation des mélanges des molécules amphiphiles synthétisées

Les pesées sont effectuées sur une balance de précision Mettler Toledo® AB135-S, dont la capacité maximale est de 31 g (± 0.01 mg) ou de 120 g (± 0.1 mg).

Une solution mère de DPPC ($M = 734.00$ g/mol) à 5 g/L dans le chloroforme et une solution mère de molécule amphiphile ($M_{\text{GlcC6}} = 265.35$ g/mol ; $M_{\text{GlcC8}} = 293.40$ g/mol ; $M_{\text{GlcC12}} = 349.51$ g/mol ; $M_{\text{GlcC16}} = 405.61$ g/mol) à 5 g/L dans le méthanol sont réalisées. En fonction du mélange réalisé, x mL de la solution de DPPC et y mL de la solution de molécule amphiphile sont mis dans un ballon de 50 ml. Les solvants sont évaporés sous pression réduite pendant 30 minutes à une température de 70°C. Le film formé sur les parois du ballon est alors hydraté par ajout de 1 ml d'eau pure (Versol®) et le ballon est agité pendant 10 minutes à 70°C. Ensuite, la solution est mise dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes à 69°C puis refroidie. Ainsi, un échantillon comportant une concentration totale de 10 mM est préparé.

C. Techniques de caractérisation physico-chimique

▪ Mesure de tension de surface

Les mesures de tension de surface ont été réalisées avec un tensiomètre KRUSS K100 par la méthode de la lame de Wilhelmy. La méthode de mesure « CAC étendue » a été utilisée car

elle permet de rester à volume constant tout au long de la mesure, ce qui permet d'augmenter la gamme de concentration lors de la dilution. Les différentes concentrations sont automatiquement générées avec un système de dosage Dosimat contrôlé par ordinateur. Après la mesure, la CAC a été déterminée en utilisant le module « CMC » du logiciel Labdesk.

Les solutions ont été préparées par dissolution dans de l'eau ultra-pure de la molécule amphiphile à température ambiante sous agitation pendant 48 heures. Les mesures ont été effectuées dans un cristalliseur de 50 mL à 25°C et la concentration initiale a été différente selon la solubilité du molécule amphiphile à cette température ($C_{\text{GlcC6}} = 1 \text{ mM}$; $C_{\text{GlcC8}} = 1 \text{ mM}$, $C_{\text{GlcC12}} = 0.07 \text{ mM}$).

▪ Diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS)

Les études de diffusion quasi-élastique de la lumière ont été réalisées avec un appareil ZetaSizer NanoSeries de Malvern à un angle de 173°. L'appareil dispose d'un laser He-Ne dont la longueur d'onde est de 633 nm. La gamme de taille pouvant être mesurée par cet appareil est d'après Malvern® de 0.3 nm à 10 µm.

Les mesures ont été réalisées à 25°C, pour une concentration de 1 mM (eau préalablement filtrée sur 0.22 µm), et la stabilité des échantillons a été étudiée avec une conservation à 4°C à une concentration de 10 mM. Les résultats ne sont pris en compte que si les critères de validité fournis par Malvern® sont atteints (« expert advice »).

▪ Microscopie électronique en transmission (MET)

Les études ont été réalisées au Centre Technologique des Microstructures (CTµ) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, avec un microscope Philips CM120 à 80 kV, possédant les caméras GATAN Orius200 2Kx2K et ULTRASCAN 1000 2Kx2K. La résolution théorique maximale est de 0.34 nm en mode point.

Les suspensions de molécules amphiphiles ont été préparées à une concentration de 10 mM. Concernant la méthode de préparation, la solution à observer (5 μ L) a été déposée sur une grille de cuivre (200 mesh) recouverte d'un film de carbone appelée « Formvar » (fournie par SPI supplies, USA). Après 5 minutes de pose, l'excédent de solution est absorbé par capillarité par un papier filtre. Ensuite, la grille est mise en contact avec une goutte de contrastant (acétate d'uranyle 2 wt%, filtré à 0.22 μ m) pendant 20 secondes. L'excédent de contrastant est de nouveau absorbé par capillarité par un papier filtre, puis la grille est séchée à l'air libre. Les observations ont été répétées au moins deux fois pour chaque échantillon.

▪ Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Les mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été réalisées à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble (France), avec une énergie de 16 et 18 keV ($\lambda = 0.6889 \text{ \AA}$). La ligne de lumière utilisée a été BM-02 D2AM. Le détecteur CCD-2D (Ropper Scientific) est placé à environ 1.60 m de l'échantillon. L'appareil est étalonné avec les valeurs de diffusion du bécénate d'argent dont le vecteur d'onde $q = 0.1076 \text{ \AA}^{-1}$. Les diagrammes sont obtenus après soustraction de la cellule remplie d'eau.

Les mesures ont été répétées au moins deux fois pour chaque échantillon de molécule amphiphile pour une concentration de 1mM, 4 mM et 10 mM. Les échantillons ont été conservés à 4°C pendant 5 à 6 jours avant observation. La température de mesure a évolué entre 25°C et 55°C.

Références

1. Warwel, S.; Bruse, F.; Schier, H. Glucamine-based gemini surfactants I: Gemini surfactants from long-chain *N*-alkyl glucamines and α,ω -diepoxides. *Journal of Surfactants and Detergents* **2004**, *7* (2), 181-186.
2. Dupuy, C.; Auvray, X.; Petipas, C.; Anthore, R. Small angle X-ray and neutron scattering study of the micellization of (N-alkylamino)-1-deoxylactitols in water. *Langmuir* **1996**, *12* (13), 3162-3172.
3. Hill, K.; Von Rybinski, W. Alkyl polyglycosides - Properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37* (10), 1328.
4. Abdelrahim, A. S.; Ziora, Z. M.; Bergeon, J. A.; Moss, A. R.; Toth, I. Design and synthesis of a series of novel, cationic liposaccharide derivatives as potential penetration enhancers for oral drug delivery. *Tetrahedron* **2009**, *65* (45), 9436-9442.
5. Ross, B. P.; Braddy, A. C.; McGeary, R. P.; Blanchfield, J. T.; Prokai, L.; Toth, I. Micellar Aggregation and Membrane Partitioning of Bile Salts, Fatty Acids, Sodium Dodecyl Sulfate, and Sugar-Conjugated Fatty Acids: Correlation with Hemolytic Potency and Implications for Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2004**, *1* (3), 233-245.
6. Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. Sugar-derived tricatener cationic surfactant: Synthesis, self-assembly properties, and hydrophilic probe encapsulation by vesicles. *Langmuir* **2008**, *24* (6), 2326-2330.
7. Pasc-Banu, A.; Stan, R.; Blanzat, M.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Labrot, T.; Oda, R. Microstructures in aqueous solutions of hybrid fluorocarbon/hydrocarbon cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *242* (1-3), 195-201.
8. Consola, S.; Blanzat, M.; Perez, E.; Garrigues, J. C.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. Design of original bioactive formulations based on sugar-surfactant/non-steroidal anti-inflammatory cationic self-assemblies: A new way of dermal drug delivery. *Chemistry-A European Journal* **2007**, *13* (11), 3039-3047.
9. He, L.; Garamus, V.; Funari, S.; Malfois, M.; Willumeit, R.; Niemeyer, B. Comparison of Small-Angle Scattering Methods for the Structural Analysis of Octyl-beta-maltopyranoside Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (31), 7596-7604.
10. Nilsson, F.; Soderman, O.; Johansson, I. Physical-Chemical Properties of the n-Octyl B-d-Glucoside/Water System. A Phase Diagram, Self-Diffusion NMR, and SAXS Study. *Langmuir* **1996**, *12* (4), 902-908.
11. He, L. Z.; Garamus, V.; Niemeyer, B.; Helmholz, H.; Willumeit, R. Determination of micelle structure of octyl-B-glucoside in aqueous solution by small angle neutron scattering and geometric analysis. *Journal of Molecular Liquids* **2000**, *89* (1-3), 239-249.
12. Moller, A.; Lang, P.; Findenegg, G. H.; Keiderling, U. Location of Butanol in Mixed Micelles with Alkyl Glucosides Studied by SANS. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (45), 8958-8964.

13. Lopez, O.; Cocera, M.; Parra, J.L.; De la Maza, A. Influence of the alkyl chain length of alkyl glucosides on their ability to solubilize phosphatidylcholine liposomes. *Colloids and Surfaces A* **2001**, *193*, 221-229.
14. Rosen, M. J.; Cohen, A. W.; Dahanayake, M.; Hua, X. Y. Relationship of structure to properties in surfactants. 10. Surface and thermodynamic properties of 2-dodecyloxypoly(ethenoxyethanol)s, C₁₂H₂₅(OC₂H₄)_xOH, in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (4), 541-545.
15. Matsumura, S.; Kawamura, Y.; Yoshikawa, S.; Kawada, K.; Uchibori, T. Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of glucosamine derivatives containing alkyl chains. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1993**, *70* (1), 17-22.
16. Abla, M.; Durand, G.; Pucci, B. Glucose-Based Surfactants with Hydrogenated, Fluorinated, or Hemifluorinated Tails: Synthesis and Comparative Physical-Chemical Characterization. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (21), 8142-8153.
17. Kruss The plate method. *Kruss website* **2011**.
18. Le Neindre, B. Tensions superficielles et interfaciales. *Techniques de l'ingénieur* **2011**.
19. Kruss Surface tension. *Kruss website* **2012**.
20. Pestman, M. *Carbohydrate-derived surfactants containing an N-acylated amine functionality: fundamental aspects and practical applications*; Rijksuniversiteit Groningen ed.; 1998.
21. Latge, P.; Rico, I.; Garelli, R.; Lattes, A. Synthesis of Long-Chain N-Alkylactylamines from Unprotected Lactose A New Series of Nonionic Surfactants. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1991**, *12* (3-4), 227-237.
22. Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Synthesis of new sugar-based surfactants having biological applications: key role of their self-association. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, *123-124*, 37-48.
23. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13*, 238-252.
24. Pedersen, J. S. Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting. *Advances in Colloid and Interface Science* **1997**, *70*, 171-210.
25. Konidala, P.; He, L.; Niemeyer, B. Molecular dynamics characterization of n-octyl-β-D-glucopyranoside micelle structure in aqueous solution. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2006**, *25* (1), 77-86.
26. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley-Interscience: 1973.
27. Hirai, M.; Iwase, H.; Hayakawa, T.; Koizumi, M.; Takahashi, H. Determination of Asymmetric Structure of Ganglioside-DPPC Mixed Vesicle Using SANS, SAXS, and DLS. *Biophysical Journal* **2003**, *85* (3), 1600-1610.

28. Van Doren, H. A.; Terpstra, K. R. Structure-Property relationships in D-glucitol derivatives with two geminal hydrocarbon chains. *J. Mater. Chem.* **1995**, *5* (12), 2153-2160.
29. Kartha, K. P. R.; Jennings, H. J. A Simplified, One-Pot Preparation of Acetobromosugars from Reducing Sugars. *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9* (5), 777.
30. Faivre, V.; Rosilio, V. Interest of glycolipids in drug delivery: from physicochemical properties to drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, 1031-1048.
31. Queneau, Y.; Chambert, S.; Besset, C.; Cheaib, R. Recent progress in the synthesis of carbohydrate-based amphiphilic materials: the examples of sucrose and isomaltulose. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (12), 1999-2009.
32. Castro, M. J. L.; Kovensky, J.; Fernandez, C. Ecologically safe alkyl glucoside-based gemini surfactants. *Arkivoc* **2005**, (12), 253-267.
33. Lorin, A.; Flore, C.; Thimas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**, *8* (3), 163-176.
34. Balazs, D. A.; Godbey, WT. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery* **2011**, 2011.
35. Ulrich, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports* **2002**, *22* (2), 129-150.
36. Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J. C. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research* **2000**, *39* (5), 409-460.
37. Langner, M. Effect of liposome molecular composition on its ability to carry drugs. *Pol J Pharmacology* **2000**, *52* (1), 3-14.
38. McManus, J.; Radler, J. O.; Dawson, K. A. Phase Behavior of DPPC in a DNA-Calcium-Zwitterionic Lipid Complex Studied by Small-Angle X-ray Scattering. *Langmuir* **2003**, *19* (23), 9630-9637.
39. Cinelli, S.; Onori, G.; Zuzzi, S.; Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S.; Diociaiuti, M. Properties of Mixed DOTAP/DPPC Bilayer Membranes as Reported by Differential Scanning Calorimetry and Dynamic Light Scattering Measurements. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (33), 10032-10039.
40. Takeda, K.; Sano, Y.; Ichikawa, S.; Hirata, Y.; Matsuki, H.; Kaneshina, S. Effect of a Local Anesthetic Lidocaine Hydrochloride on the Bilayer Structure of Phospholipids. *Journal of Oleo Science* **2009**, *58* (7), 369-377.
41. Dahbi, L.; Arbel-Haddad, M.; Lesieur, P.; Bourgaux, C.; Ollivon, M. A long ripple phase in DLPC-decylglucoside mixture evidenced by synchrotron SAXS coupled to DSC. *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *139* (1), 43-53.
42. Balgavy, P.; Uhríkova, D.; Karlovská, J.; Dubnicková, M. X-ray diffraction and neutron scattering studies of amphiphile-lipid bilayer organization. *Cellular & molecular biology letters* **2001**, *6*, 283-290.

43. Przystalski, S.; Sarapuk, J.; Kleszczynska, H. Influence of amphiphilic compounds on membranes. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, *47*, 627-638.
44. Kleszczynska, H.; Sarapuk, J.; Rozycka-Roszak, B. Modification of mechanical properties of model membranes by some bifunctional surfactants. *Cellular & molecular biology letters* **2000**, *5*, 67-73.
45. Hildreth, J. E. K. N-d-Gluco-N-methylalkanamide compounds, a new class of non-ionic detergents for membrane biochemistry. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 363-366.
46. Caussanel, F.; Andre-Barres, C.; Lesieur, S.; Rico-Lattes, I. A comparative study of sugar-based surfactants for the solubilization of phosphatidylcholine vesicles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2001**, *22* (3), 193-203.
47. Kumar, V. V. Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 444-448.
48. Rosen, MJ.; Wang, H.; Shen, P.; Zhu, Y. Ultralow Interfacial Tension for Enhanced Oil Recovery at Very Low Surfactant Concentrations. *Langmuir* **2005**, *21*, 3749.
49. Bota, A.; Varga, Z.; Goerigk, G. Biological systems as nanoreactors: anomalous small-angle scatterind study of the CdS nanoparticle formation in multilamellar vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 1911-1915.
50. Nagle, J.; Tristram Nagle, S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1469*, 159-195.
51. Denisov, I. G.; Mclean, M. A.; Shaw, A. W.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. Thermotropic phase transition in soluble nanoscale lipid bilayers. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (32), 15580-15588.
52. Oszlanczi, A.; Bota, A.; Czabai, G.; Klumpp, E. Structural and calorimetric studies of the effect of different aminoglycosides on DPPC liposomes. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2009**, *69* (1), 116-121.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Ce travail de thèse a porté sur l'étude de systèmes moléculaires organisés modèles dont les molécules amphiphiles sont constituées d'une tête polaire dérivée d'un monosaccharide, le D-glucose ou la *N*-acétyl-D-glucosamine, et d'une queue hydrophobe possédant une chaîne hydrocarbonée de longueur variable (6, 12 ou 16 atomes de carbone). Le travail entrepris a tout d'abord consisté en la synthèse des molécules amphiphiles par la réaction d'amination réductrice d'une alkylamine sur un monosaccharide, avant de les formuler avec un phospholipide modèle afin d'obtenir des systèmes moléculaires organisés de structure variable.

Dans une première partie, la synthèse de molécules amphiphiles possédant une tête polaire à base de monosaccharides a été réalisée. Au cours de cette synthèse, la présence de la fonction aldéhyde en position anomère des monosaccharides réducteurs utilisés a été mise à profit pour le greffage par réaction d'amination réductrice d'alkylamines de différentes longueurs de chaînes hydrocarbonées (6, 12 ou 16 atomes de carbones). Cette méthode de greffage a l'avantage d'être régiosélective et, par conséquent de ne pas nécessiter de réactions multi-étapes de protection/déprotection. L'amination réductrice est réalisée en présence de l'agent réducteur NaBH_4 , qui permet d'obtenir les composés attendus. Un traitement en milieu acide est utilisé pour éliminer les résidus de bore, entraînant la formation des composés isolés sous forme chlorhydrate, puis une neutralisation du milieu permet d'obtenir les molécules amphiphiles sous forme neutre. Les conditions expérimentales de synthèse ont été adaptées de celles décrites précédemment dans la littérature par Tokuda et coll.¹ pour la synthèse de composés analogues.

Indépendamment de la longueur de la chaîne alkyle, il a été montré que ces conditions de réaction d'amination réductrice permettaient d'obtenir des molécules

amphiphiles à base de de D-glucose avec des rendements satisfaisants (60% pour le composé GlcC6 à 6 atomes de carbone, 70% pour le composé GlcC12 à 12 atomes de carbone et 65% pour le composé GlcC16 à 16 atomes de carbone), supérieurs à celui obtenu par Tokuda et coll.¹ pour le composé à 12 atomes de carbone (52%). La caractérisation structurale des composés synthétisés par spectroscopie RMN (¹H, ¹³C et corrélation proton/carbone) a permis d'attribuer précisément les différents signaux correspondant à la partie saccharidique et au groupe alkyle.

Cette méthode de synthèse par amination réductrice d'une alkylamine sur un saccharide a également été employée pour accéder aux molécules amphiphiles dérivées de *N*-acétyl-D-glucosamine. Les composés ont été obtenus sous forme de bruts réactionnels. En effet, le traitement en milieu acide suivi d'une neutralisation utilisé pour obtenir les molécules amphiphiles dérivées de D-glucose n'est pas envisageable pour les dérivés de *N*-acétyl-D-glucosamine. Par exemple, l'essai du traitement acide réalisé sur le composé possédant une chaîne alkyle à 12 atomes de carbone a engendré la *N*-désacétylation du composé, formant le 1-*N*-dodécyl-1,2-diamino-1,2-didésoxy-D-glucitol à la place du *N*-dodécyl-1-amino-1-désoxy-2-acétamido-2-désoxy-D-glucitol. Afin d'éviter cette *N*-désacétylation, il serait envisageable d'utiliser une voie de synthèse par réaction d'amination réductrice en utilisant cette fois une hydrogénation catalytique comme méthode de réduction. Ainsi, le traitement en milieu acide ne serait pas nécessaire pour obtenir des composés purs.

Dans une seconde partie, les propriétés d'auto-association des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose, seules, puis formulées avec un phospholipide modèle ont été étudiées. Différents ratios molaires phospholipide/molécule amphiphile ont été utilisés afin de déterminer la nature des systèmes moléculaires organisés obtenus en milieu aqueux. La caractérisation des ces systèmes a été possible par une utilisation conjointe de techniques de diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS), microscopie électronique en

transmission (MET) et de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Cette dernière a notamment permis de mettre en évidence que les assemblages formés par les molécules amphiphiles à 12 atomes de carbone étaient plutôt des micelles de type ellipsoïdal (~3nm de rayon) grâce à la modélisation des données expérimentales. En outre, une tendance générale a été mise en évidence : l'ajout de la molécule amphiphile dans les mélanges DPPC/molécule amphiphile a entraîné une diminution de la taille des assemblages formés, et cela pour les trois longueurs de chaîne, par rapport aux assemblages formés par la DPPC seule. De plus, à partir de 10% molaire en molécule amphiphile, la taille des systèmes moléculaires organisés formés reste relativement constante mis à part pour les assemblages pour la fraction 50/50 qui présentent un comportement singulier non encore élucidé à ce jour. Toutefois, la distribution des systèmes est relativement large tant au niveau de la taille que parfois au niveau de la forme, ce qui rend la mise en évidence de tendance relativement délicate. Cette étude a toutefois permis de montrer la possibilité d'auto-association des molécules amphiphiles dérivées de D-glucose seules ou en mélange avec la DPPC. En perspectives, il est envisagé de reproduire cette série d'analyse pour les molécules amphiphiles dérivées de *N*-acétyl-D-glucosamine, afin de connaître la nature des systèmes moléculaires organisés seuls ou en mélange avec la DPPC, et d'évaluer ainsi l'impact d'une modification de la tête polaire.

L'ensemble de ce travail a ainsi démontré que la stratégie d'amination réductrice d'une alkylamine sur un monosaccharide permettait d'obtenir des molécules amphiphiles ayant une longueur de chaîne ajustable. Celles-ci ont pu être formulées avec un phospholipide afin d'étudier les propriétés d'auto-association de ces molécules en milieu aqueux. Ce modèle validé, il serait intéressant d'appliquer cette méthodologie pour la synthèse de molécules amphiphiles dont la tête polaire serait dérivée d'oligomères de glycosaminoglycanes et d'étudier la capacité d'auto-association ainsi que les propriétés biologiques de tels systèmes.

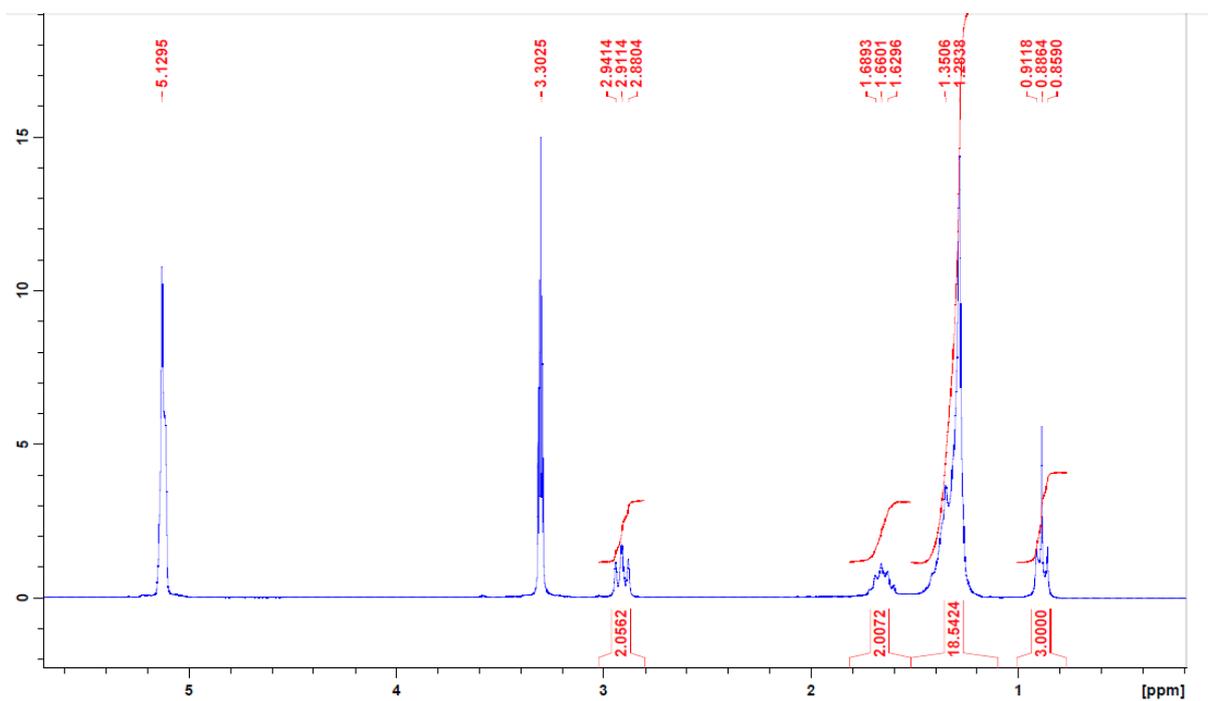
ANNEXES

ANNEXES

Sommaire

Annexe 1 : Spectre RMN ¹H de la dodécylamine	214
Annexe 2 : Comparaison des méthodes de l'anneau de DuNoüy et de la lame de Wilhelmy	215
Annexe 3 : Technique de la goutte pendante	216
Annexe 4 : Cliché d'une grille nue par MET	217
Annexe 5 : SAXS	218
Annexe 6 : Clichés supplémentaires du GlcC16 par MET	222
Annexe 7 : Paramètre d'empilement des molécules amphiphiles	223
Annexe 8 : Notions sur les phases cristallines	224
Annexe 9 : Clichés supplémentaires de la DPPC par MET	225
Références.....	226

Annexe 1 : Spectre RMN ¹H de la dodécylamine



Spectre à 300 MHz, réalisé dans le méthanol deutéré, en présence d'une goutte de HCl

Annexe 2 : Comparaison des méthodes de l'anneau de DuNoüy et de la lame de Wilhelmy

Référence¹

Les méthodes de l'anneau de DuNoüy et de la lame de Wilhelmy permettent d'étudier le comportement de la surface d'un liquide en fonction de la quantité de molécules amphiphiles présentes en solution.

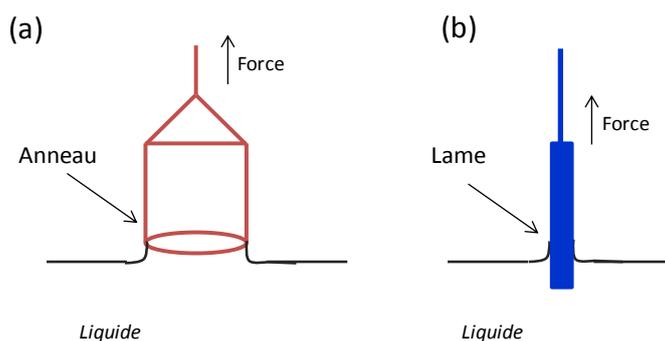


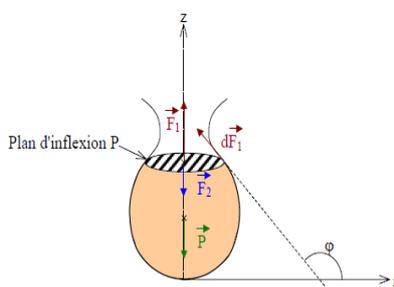
Schéma de la méthode de l'anneau de DuNoüy (a) et de la lame de Wilhelmy (b)

La méthode de l'anneau présente l'avantage d'avoir une meilleure sensibilité de mesure étant donné le grand périmètre de mouillage (3 fois plus grand que celui de la lame). Cependant, contrairement à la méthode de l'anneau, la méthode de la lame ne nécessite pas de connaître la densité des liquides. De plus, la méthode de la lame étant une mesure statique, aucune source d'erreur n'est possible lors de la mesure. En effet, la lame ne se déplace plus après avoir détecté la surface alors que dans le cas de l'anneau, celui-ci reste en mouvement pendant la mesure (ce qui entraîne un renouvellement permanent de la surface de mesure). En outre, les mesures réalisées par la méthode de l'anneau vont nécessiter des corrections inhérentes à sa forme. La première est liée au poids du volume de liquide soulevé au dessus de l'anneau qui doit être déduit de la force maximale étant donné qu'il est aussi mesuré par la balance. La seconde est directement liée au rayon de courbure du ménisque qui est plus important à l'intérieur de l'anneau qu'à l'extérieur. Ainsi, la force maximale mesurée ne correspond exactement à la valeur réelle. Les méthodes de corrections sont à appliquer au logiciel lors des mesures.

Annexe 3 : Technique de la goutte pendante

Référence²

Cette technique permet de déterminer la tension superficielle d'une solution en fonction de sa concentration et ainsi d'accéder graphiquement à la valeur de sa CAC. Une goutte pendante est créée avec une seringue positionnée à la verticale, puis une caméra et un système d'acquisition enregistrent le profil de la goutte (angle, volume, diamètre) et calculent à partir de ces grandeurs caractéristiques la tension superficielle de la solution.



F₁ est la résultante des forces de tension superficielles **dF₁** agissant sur le contour du plan P (**dF₁** est la force de tension superficielle agissant sur l'élément infinitésimal de contour du plan P). **F₁** = $(2 \cdot \pi \cdot r) \cdot \gamma \cdot \sin \varphi$ (avec **r** : rayon de la goutte au point d'inflexion ; φ : Angle entre l'horizontale et la tangente au point d'inflexion).

F₂ : Résultante des forces de pression agissant sur le plan P. **F₂** = $\pi \cdot r \cdot \gamma \cdot \sin \varphi$

P : Poids de la partie de la goutte située sous le plan d'inflexion. **P** = $m \cdot g = V \cdot \Delta \rho \cdot G$ (avec **V** : volume de la goutte sous le plan d'inflexion ; $\Delta \rho$: différence de masse volumique entre le liquide et l'air ; **g** = intensité de la pesanteur $9.81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$).

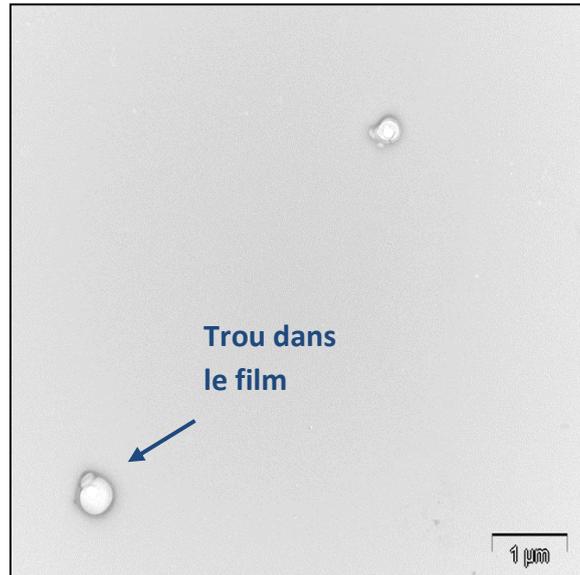
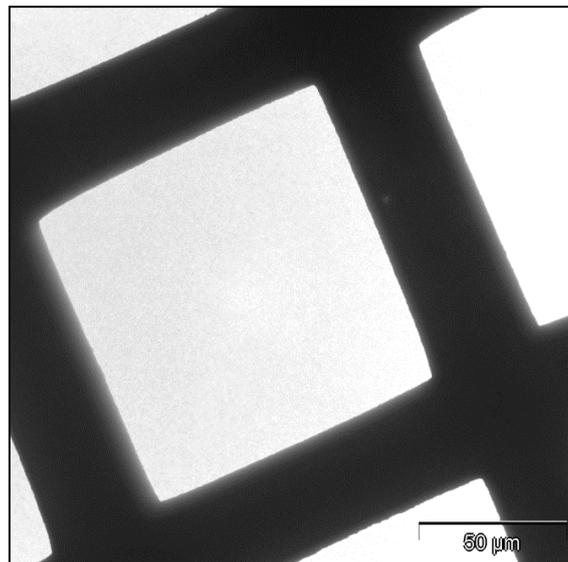
A l'équilibre statique, la somme des forces agissant sur le plan P est nulle ($F_1 = F_2 + P$). Ainsi, la tension superficielle γ est égale à :

$$\gamma = \frac{V \times \Delta \rho \times g}{\pi \times r \times \sin \varphi}$$

✓ Cette méthode présente l'avantage d'utiliser une très petite quantité de solution et de pouvoir mesurer des tensions superficielles faibles.

Annexe 4 : Cliché d'une grille nue par MET

Cliché obtenu en microscopie électronique en transmission, d'une grille de Formvar avec contrastant (acétate d'uranyle 2 wt%), sans échantillon à analyser.



Annexe 5 : SAXS

Présentation de l'ESRF (Référence³)

L'ESRF (European Synchrotron Research Facility, à Grenoble) est un accélérateur circulaire d'électrons qui crée des rayons X extrêmement intenses, utilisés dans divers domaines (physique, chimie, biologie, géologie...) pour observer et tenter de comprendre les propriétés de la matière.



Photo aérienne de l'ESRF de Grenoble

Des paquets d'électrons sont accélérés progressivement dans un accélérateur linéaire (linac) puis dans un accélérateur circulaire (booster synchrotron) jusqu'à une énergie de 6 giga électronvolts (6 GeV). Ils sont alors transférés dans un anneau de stockage où ils circulent pendant des heures à énergie constante. Ils produisent alors des faisceaux de lumière synchrotron, très intenses, qui alimentent environ 40 lignes de lumière dans le hall d'expériences.

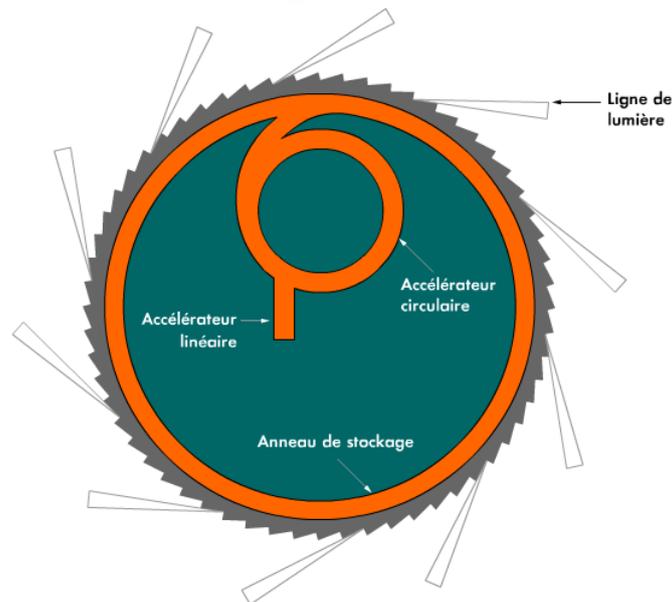


Schéma du synchrotron de l'ESRF

Les lignes de lumière sont les stations d'expériences où travaillent les équipes de chercheurs invitées à l'ESRF. Il y a une quarantaine de lignes de lumière au total, spécialisées soit dans un domaine de recherche, soit dans une technique particulière. Après traitement par des instruments d'optique (miroirs, monochromateurs) dans la cabine optique, la lumière synchrotron éclaire l'échantillon de matière à étudier, positionné dans la cabine d'expérience. Un détecteur recueille les données au cours de l'expérience. Les lignes de lumière fonctionnent 24 heures sur 24, 7 jours sur 7, sauf pendant les périodes d'arrêt prévues pour la maintenance de l'équipement.

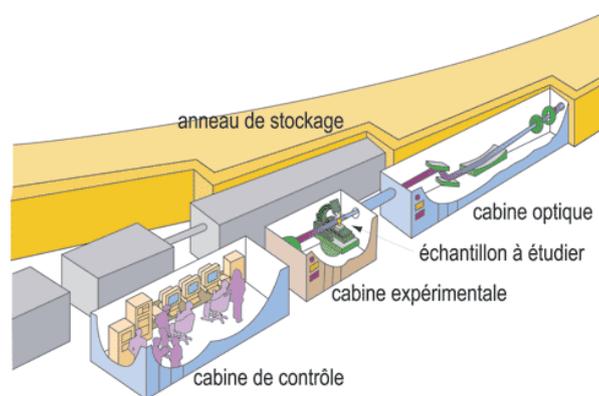


Schéma d'une ligne de lumière à l'ESRF

A l'ESRF, la lumière synchrotron couvre un spectre d'énergies très large, allant des micro-ondes jusqu'aux rayons gamma. L'ESRF est spécialisé dans la production de rayons X dits très durs, dont l'énergie s'étend de 10 à 100 keV. La longueur d'onde associée est de l'ordre du dixième de nanomètre, ce qui correspond à la taille des atomes. Les rayons X sont donc un excellent outil d'investigation de la matière à l'échelle des atomes et des molécules. De plus la lumière synchrotron est extrêmement brillante (dix mille milliards de fois plus intense que les rayons X à l'hôpital), ce qui ouvre la voie à des expériences inaccessibles par d'autres techniques.

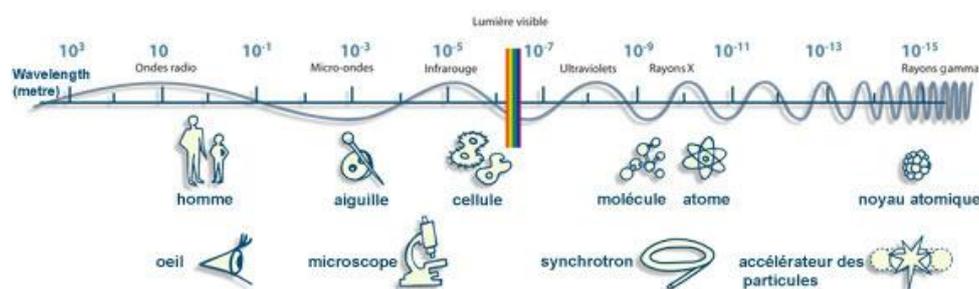
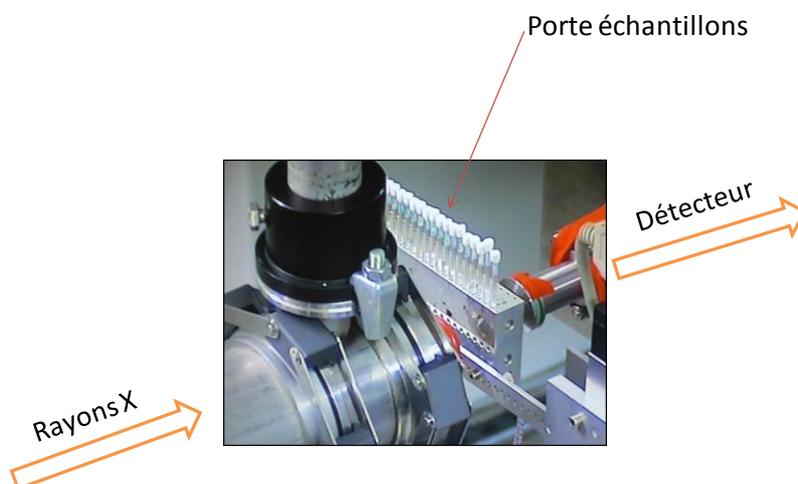


Schéma du spectre d'énergie des micro-ondes aux rayons gamma

Principe d'une analyse SAXS (Référence⁴)

La diffusion des rayons X aux petits angles permet l'étude de la nanostructure des matériaux dans une gamme typique de 10 à 500 Å. L'échantillon à analyser est soumis au rayonnement synchrotron au sein de la cabine expérimentale. Par exemple, dans notre étude, chaque échantillon liquide a été placé dans un capillaire sur un porte-échantillon.



Photographie du montage de SAXS dans notre étude réalisé à l'ESRF

Les rayons X qui atteignent l'échantillon sont alors transmis, absorbés ou encore ré-émis dans une direction différente de la direction incidente, c'est-à-dire diffusé, soit sans changement de longueur d'onde (diffusion élastique) ou avec changement de longueur d'onde (diffusion inélastique). Dans le cas de la diffusion élastique, les rayonnements permettent d'avoir des informations sur la structure de l'échantillon dans une gamme de taille dépendamment de la longueur d'onde incidente et de l'angle de diffusion.

$$d \sim \lambda / 2 \sin(\theta)$$

Avec : d la taille caractéristique ; λ la longueur d'onde incidente ; 2θ l'angle de diffusion

L'expérience de diffusion élastique de rayonnement permet de mesurer l'intensité diffusée I en fonction du vecteur de diffusion q .

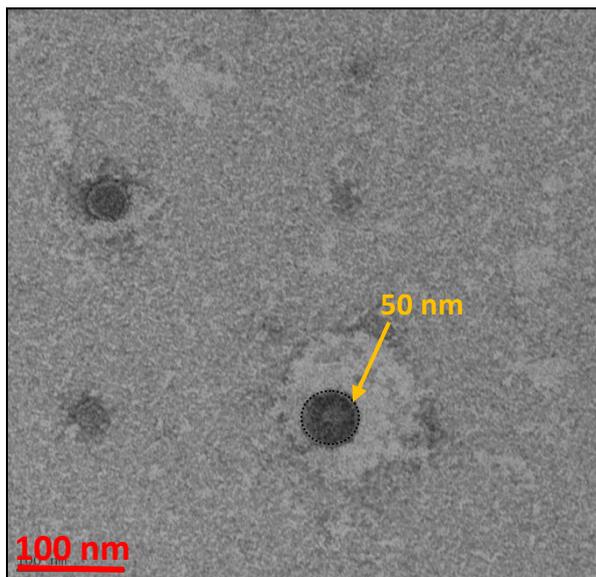
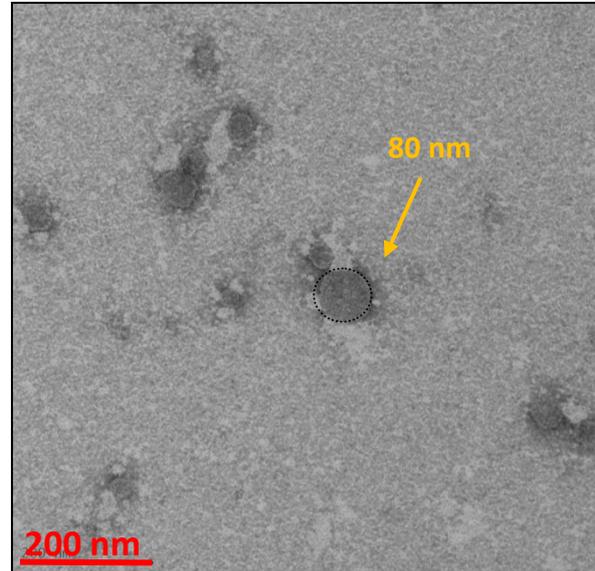
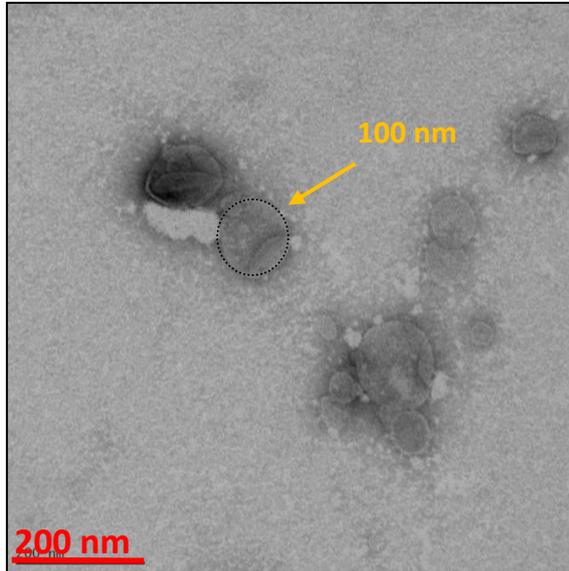
$$q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$$

En fonction de la concentration de l'échantillon, le système peut être classé en deux catégories. D'une part, les systèmes « non corrélés », qui sont formés de particules éloignées les unes des autres, incluses dans une matrice par ailleurs homogène. D'autre part, les systèmes « denses ou corrélés », dans lesquels les particules sont en contact ou proches les unes des autres. La distance entre particules diffusantes (d_{inter}) est estimée par la relation suivante lorsque la loi $I(q)$ passe par un maximum :

$$d_{inter} = 2\pi / q_{max}$$

avec q_{max} correspondant à la valeur du vecteur de diffusion q au maximum du pic ou de la bosse de corrélation.

Annexe 6 : Clichés supplémentaires du GlcC16 par MET



Clichés obtenu par MET pour une grille préparée à partir d'une solution aqueuse en GlcC16 de concentration égale à 1 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit au chapitre 3 dans le paragraphe 1.2.2.

Annexe 7 : Paramètre d'empilement des molécules amphiphiles

Pour rappel, le calcul du paramètre d'empilement⁵ s'effectue par la formule suivante :

$$P = \frac{V_{GlcCx}}{l_{c,GlcCx} \times a_{0,GlcCx}}$$

avec

x 6, 8, 12 ou 16 atomes de carbone (n_c) au sein de la chaîne hydrophobe

V volume occupé par la chaîne hydrocarbonée⁶ ($V = 27.4 + 26.9 \cdot n_c$) (nm^3)

lc longueur de la chaîne hydrocarbonée⁶ ($l_c = 1.54 + 1.265 \cdot n_c$) (nm)

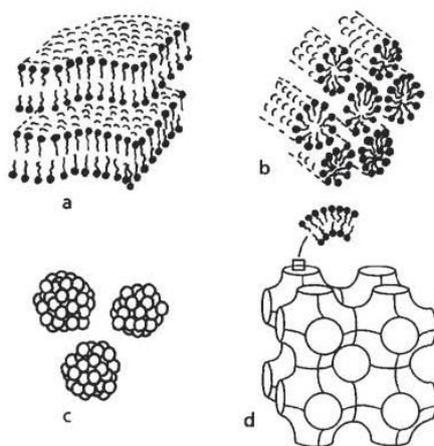
a_0 aire occupée à l'interface par la tête polaire (nm^2)

	V (nm^3)	lc (nm)	a_0 (nm^2)	P
GlcC6	0.189	0.92	0.62	0.33
GlcC8	0.243	1.17	0.62	0.33
GlcC12	0.351	1.68	0.63	0.33
GlcC16	0.459	2.19	0.63	0.33

D'après le calcul du paramètre d'empilement, les molécules amphiphiles sont attendues sous forme de micelles, quelle que soit le nombre d'atomes de carbone au sein de la chaîne hydrocarbonée.

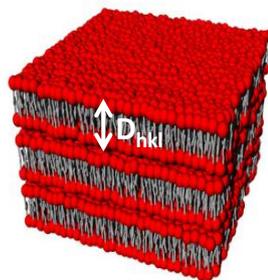
Annexe 8 : Notions sur les phases cristallines

Les assemblages de type micelles ou vésicules se forment à des concentrations en molécules amphiphiles relativement faibles en solution. A plus haute concentration, il se forme des phases cristal liquide lyotropes qui sont sensibles à la concentration et à la température⁷⁻¹⁰. Quatre phases sont couramment décrites : lamellaire (a) ; hexagonale (b) ; cubique (c) et nématique (d).



Représentation d'une phase lamellaire (a) ; d'une phase hexagonale (b) ; d'une phase cubique (c) et d'une phase nématique (d)

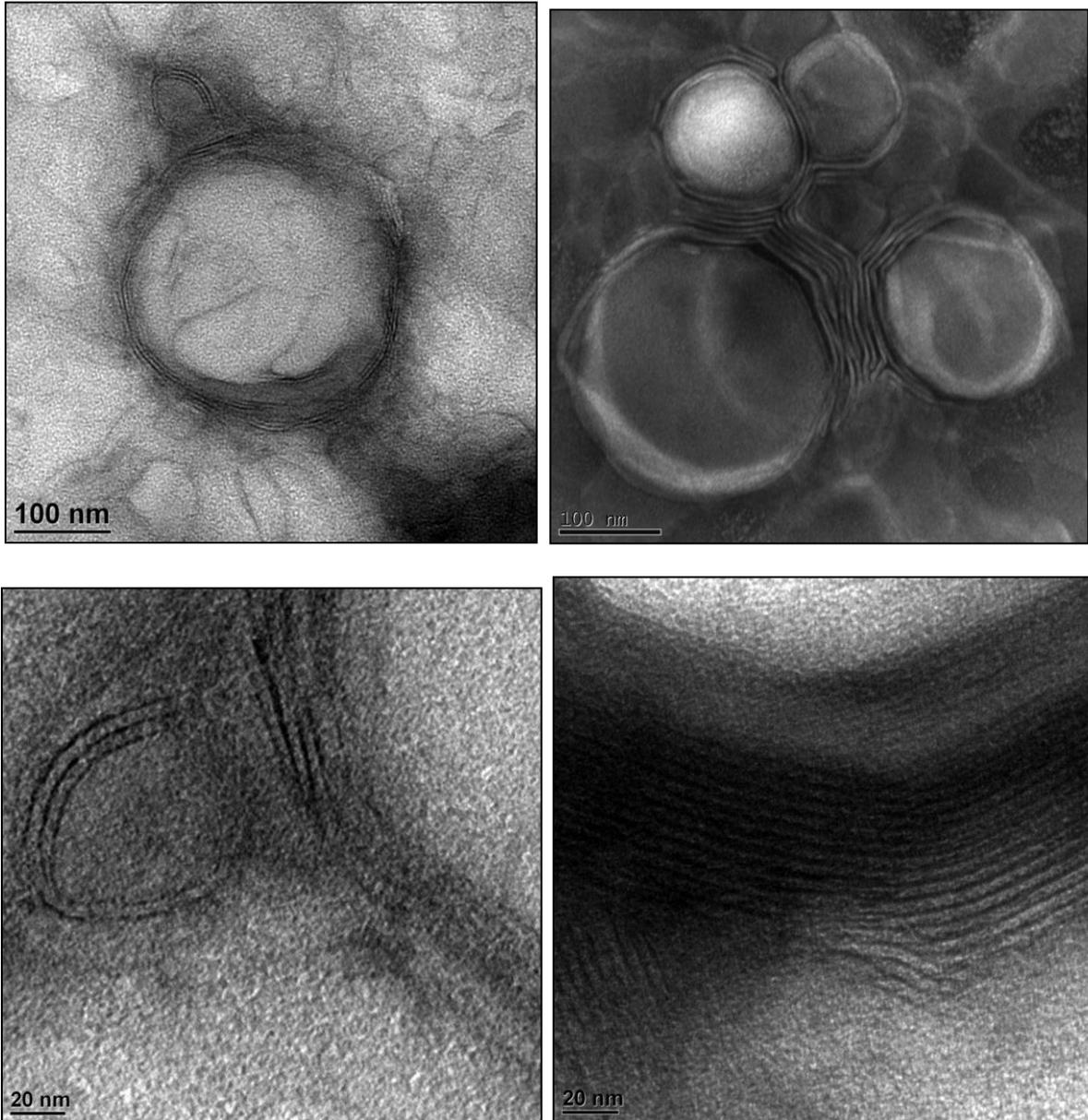
Lors d'analyse de solutions concentrées par SAXS, la présence de ces phases induit l'apparition d'un pic fin pour les hautes valeurs de q . Le maximum d'intensité de ce pic peut être attribué à la longue période $D_{(hkl)} = 2\pi/q_{\max}$, qui est la distance de répétition entre deux feuillettes au sein du cristal.



Représentation de D_{hkl} dans une phase lamellaire

Annexe 9 : Clichés supplémentaires de la DPPC par MET

Observation de vésicules multilamellaires :



Clichés obtenu par MET pour une grille préparée à partir d'une solution aqueuse en DPPC de concentration égale à 1 mM. L'acétate d'uranyle 2 wt% a été utilisé comme contrastant. Les assemblages ont été observés après avoir réalisé le protocole décrit au chapitre 3 dans le paragraphe I.2.2.

Références

1. Kruss The plate method. *Kruss website* **2011**.
2. Société française de physique Expériences autour de la goutte. 2006.
3. L'ESRF Comment ca marche? *esrf. eu* **2012**.
4. Montembault, A. Elaboration d'hydrogels physiques de chitosane :application a l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage. 2004.
5. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1977**, 470 (2), 185-201.
6. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley-Interscience: 1973.
7. Daoud, M.; Williams, C. *La juste argile*; Les éditions de Physique ed.; 1995.
8. Auvray, X.; Petipas, C.; Dupuy, C.; Louvet, S.; Anthore, R.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. Small-angle X-ray diffraction study of the thermotropic and lyotropic phases of five alkyl cyclic and acyclic disaccharides: Influence of the linkage between the hydrophilic and hydrophobic moieties. *European Physical Journal* **2001**, 4 (4), 489-504.
9. Bleadsdale, T. A.; Tiddy, G. J. T. The structure, dynamics and equilibrium properties of colloidal systems. 1990.
10. Pestman, M. *Carbohydrate-derived surfactants containing an N-acylated amine functionality: fundamental aspects and practical applications*; Rijksuniversiteit Groningen ed.; 1998.

Synthèse et étude des propriétés d'auto-association de molécules amphiphiles dérivées de D-glucose

Cette thèse s'inscrit dans une thématique de recherche visant à synthétiser des molécules amphiphiles présentant des propriétés bioactives, pouvant être mises à profit dans diverses applications biomédicales ou encore dans le domaine de l'agrochimie. Les molécules amphiphiles sont alors les propres actrices de leur formulation de par leurs propriétés d'auto-association et de bioactivité (concept dit « d'économie moléculaire »). Dans ce contexte, la première partie de ce travail a été consacrée à la synthèse de molécules amphiphiles modèles dérivées de D-glucose et de *N*-acétyl-D-glucosamine. La voie de synthèse choisie pour les obtenir a été une amination réductrice régiosélective à partir de chaînes alkylamine de différentes longueurs (6, 12 et 16 atomes de carbone). Leur caractérisation a été réalisée par RMN et spectrométrie de masse. La deuxième partie de ce travail a été orientée vers l'étude du comportement auto-associatif des molécules à base de D-glucose en solution aqueuse, seules, ou en mélange avec un phospholipide modèle. Une organisation à différentes échelles de taille a été mise en évidence par les techniques de diffusion de la lumière, microscopie électronique en transmission et grâce à la modélisation de données expérimentales obtenues en diffusion des rayons X aux petits angles.

Synthesis and study of the self-assembly properties of amphiphilic molecules based on D-glucose

This work is part of a research program on the synthesis of amphiphilic molecules having bioactive properties, which could be used in biomedical applications or in agrochemistry. Amphiphilic molecules could be the own actor of their formulation because of the dual property of bioactivity and self-assembly. In this context, the first part of this work concerns the synthesis of model amphiphilic molecules derived from D-glucose and *N*-acetyl-D-glucosamine. The chosen way to synthesize these molecules was a regioselective reductive amination from alkylamine chains of different lengths (6, 12 and 16 carbon atoms). Compounds were characterized by NMR and Mass Spectrometry. The second part of this work was oriented towards the study of the self-assembly properties of molecules derived from D-glucose in an aqueous solution, alone, or mixed with a model phospholipid. An organization with different sizes was shown with several techniques: light diffusion, transmission electronic microscopy, and thanks to the establishment of a model from experimental small-angle X-ray scattering data. When the amphiphilic molecule with 12 atoms of carbon on this hydrocarbonated chain is studied alone in a solution, ellipsoidal micelles seem to be present, mixed with bigger aggregates (~100 nm). However, when this same amphiphilic molecule is used in a mix with a model phospholipid, a size diminution of the assembly was observed with the increase of amphiphilic molecules in the formulations.

Ecole Doctorale Matériaux de Lyon, « Spécialité Chimie et Physico-Chimie »

Mots-clés: Synthèse; Auto-association; Molécules Amphiphiles; Saccharides

Keywords: Synthesis; Self-assembly; Amphiphilic molecules; Saccharides

Ingénierie des Matériaux Polymères, IMP@Lyon1 – UMR CNRS 5223

Université Claude Bernard Lyon 1 – Bâtiment EPUL 15, Boulevard Latarjet, 69622 Villeurbanne
