



HAL
open science

Glycolipides fluorescents et gouttelettes glycosylées

Pascal Matton

► **To cite this version:**

Pascal Matton. Glycolipides fluorescents et gouttelettes glycosylées. Chimie organique. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. ⟨NNT : 2017PSLEE037⟩. ⟨tel-02161481⟩

HAL Id: tel-02161481

<https://theses.hal.science/tel-02161481v1>

Submitted on 20 Jun 2019

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.



HAL Authorization

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université Paris Sciences et Lettres
PSL University

Préparée à l'École Normale Supérieure

Glycolipides fluorescents et gouttelettes glycosylées

Ecole doctorale n°406

CHIMIE MOLÉCULAIRE DE PARIS-CENTRE

Spécialité CHIMIE ORGANIQUE

COMPOSITION DU JURY :

Dr. Chrystel LOPIN BON
Université d'Orléans
Rapporteur

Pr. José KOVENSJY
Université Picardie Jules Verne
Rapporteur

P. Solange LAVIELLE
Université Pierre et Marie Curie
Présidente du jury

Dr. Kawthar BOUCHEMAL
Université Paris-Sud
Examinatrice

**Soutenue par Pascal MATTON
le 15 décembre 2017**

Dirigée par **Jean-Maurice MALLET**
Codirection : Jacques FATTACCIOLI



Remerciements

Comme un rituel mainte fois répété, les premiers mots lus sont les derniers écrits. Bien après que la verrerie et que les produits soient rangés dans leur boîte, il faut finir sa thèse. Commencer puis finir sa rédaction. Et tourner la page de trois années de chimie.

Je voudrais donc commencer par remercier les personnes qui vont m'aider à mettre un point final à ces années en acceptant de juger cette thèse. Tout d'abord, Mme Lopin Bon et Mr. Kovensky, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs du manuscrit. Mme Bouchemal et Mme Lavielle ensuite, pour l'intérêt qu'elles ont témoigné à mon travail en acceptant de faire partie du jury.

S'il y a une fin c'est qu'il y a eu un départ et cette thèse ne serait rien sans mes directeurs de thèse, Jean Maurice Mallet et Jacques Fattaccioli. Merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire alors que je cherchais une équipe d'accueil. Tous les deux ont été constamment disponibles quand j'avais des questionnements scientifiques.

Je tiens aussi à remercier les différents collaborateurs que j'ai rencontrés au fur et à mesure de ces années et qui ont supporté mes questions naïves (sans se moquer) en continuant leurs explications. Merci donc à Laurent Cattiaux, Sandine Quignard et Diana Molino.

Que seraient trois années, seul dans son laboratoire, sans contact avec l'extérieur ? Un enfer. C'est pourquoi il me faut maintenant remercier la fine équipe qui s'est succédé pendant ces trois années au sein du laboratoire en partant des stagiaires jusqu'aux post docs sans oublier les thésards qui me survivront au labo et pour qui je compatis pour tout le travail qui leur reste à accompli

Résumé

Certains agents pathogènes ou cellules tumorales échappent au système immunitaire parce que les cellules immunitaires ne reconnaissent pas les peptides ou protéines présents à leur surface. Les approches thérapeutiques favorisant la reconnaissance de ces peptides ou protéines faiblement immunogènes sont donc très attractives. Pour ainsi forcer l'activation des cellules presentatrices d'antigenes, plusieurs systèmes ont été décrits, à base de liposomes ou de nanoparticules inorganiques. Nous proposons ici d'utiliser un système à base de gouttelettes d'huile.

Les micro ou nanogouttelettes d'huile végétale présentent de nombreux avantages par rapport aux microparticules solides inorganiques. Faites de triglycérides naturels, elles sont biocompatibles et biodégradables tout en étant plus robustes que les liposomes. Ce sont des plates-formes idéales pour construire des assemblages multifonctionnels pour la vectorisation.

La première partie du projet traite de la synthèse de glycolipides nécessaires pour avoir une reconnaissance des gouttelettes par les lectines présentes dans le système immunitaire (DC-sign).

La seconde partie du projet traite de la fabrication des gouttelettes d'huile fonctionnalisées avec les glycolipides précédemment synthétisés et la mise en évidence de leurs interactions avec des lectines.

Abstract

Some pathogens or tumour cells escape the immune system because the immune cells misrecognize their surface peptides or proteins. Therapeutic approaches, promoting the recognition of these poorly immunogenic peptides or proteins are thus very attractive. The strategy is then to process directly peptides or proteins through cell presenting cells. To this end, some systems have been described, based on liposome or nanoparticles. We propose to use an oil droplet based system.

Among the microparticles, vegetal oil microdroplets have numerous advantages over solid microparticles. Made of natural triglycerides, they are biocompatible and biodegradable. They are ideal platforms to build multifunctional assemblies for vectorization.

In this project, we aim to design and address lipid (soya oil) droplet to dendritic cells via the lectin DC -sign. The first part deals of the synthesis of glycolipids necessary for the recognition by lectins. The second part presents the fabrication of functionalized oil droplets with previously synthesized glycolipids and their interaction with lectins.

Abréviations

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
CD : Cellule Dendritique.
CMC : Concentration micellaire critique
ConA : Concanavaline A
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CuAAC : Copper (I) Catalysed Azide Alkyne Cycloaddition
DC : Cellule dendritique
DCC : N,N' Dicyclohexylcarbodiimide
DCM : Dichloromethane
DC-Sign : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DIEA : N,N-Diisopropyléthylamine
DMF : N,N-diméthylformamide
EDC : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
FDA : Food and Drug Administration
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HBTU : (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate)
LUV : Large unilamellar vesicles
MS : Tamis moléculaire
MLV : Multilamellar vesicles
NIS : n-iodosuccinimide
NMP : N-méthyl-2-pyrrolidine
NMM : N-méthylmorpholine
PBS : Phosphate Buffer Saline
PEG : Polyéthylène glycol
PNA : Peanut agglutinin
PS : Polystyrène
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SUV : Small unilamellar vesicles
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane

Communication/publication

Communications

Orales

Journée de l'Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire ED406, UPMC, Paris, 2015,

Journée des jeunes chercheurs, ENS, Paris, 2015

Journée bibliographique de l'Ecole doctorale de Chimie Moléculaire ED406, UPMC, Paris, 2016

Posters

Glycolipid functionalized microdroplets for cells vectorization. Pascal Matton, Jacques Fattaccioli, Jean-Maurice Mallet. **52èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique RITC**, Caen, 6-8 juillet 2017 (P193)

Conformational study of fluorescent oligopeptides: the repairing of tyrosine by adjacent tryptophan. Cristian Tirapegui, Jean-Maurice Mallet, Pascal Matton, Solange Lavielle, Pablo Barrias, Daniel Zuniga, Horacio Poblete, Alexis Aspee. **Congrès CHITEL**, Paris 4-7 juillet 2017

Publication

Protecting group strategies towards sulfated glycosaminoglycans Hélène Ledru, Pascal Matton, Jean-Maurice Mallet and Chrystel Lopin-Bon, Chapter 10 in **Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry** ed/ Sebastien Vidal Wiley, ISBN: 978-3-527-34010-1

Table des matières

Table des matières.....	13
Chapitre 1 : Introduction et état de l'art.....	15
I. Lectines et multivalence.....	16
A. Les lectines.....	16
B. Multivalence.....	20
II. Structures glycosylées multivalentes.....	23
A. Historique sur les particules pour la vectorisation.....	23
B. Structures glycosylées multivalentes.....	24
III. Un autre type de particules à interface fluide : les émulsions.....	29
A. Généralités sur les émulsions.....	29
B. Tensioactifs : structure et classification.....	30
C. Fabrication et stabilité des émulsions.....	32
D. Tension interfaciale : définition et mesure.....	35
IV. Emulsions : état de l'art sur leur utilisation en pharmaceutique et biophysique.....	39
A. Administration de principes actifs avec des émulsions.....	40
B. Les émulsions fonctionnalisées comme un outil biophysique.....	41
V. Objectifs du travail de doctorat.....	43
Chapitre 2 : Conception et synthèse des glycolipides.....	47
I. Le choix des structures initiales.....	48
A. Le choix des sucres.....	48
B. Le choix des fluorophores.....	48
II. Synthèse des Monobriens.....	49
A. Synthèse des fluorophores.....	49
B. Synthèse des glycolipides α -D-mannosides.....	50
C. Synthèse du glycolipide β -D-galactoside.....	55
D. Synthèse du glycolipide galactitol.....	58
III. Évolution de la structure de base : un raft de glycolipide.....	60
A. Choix de la structure.....	60
B. Synthèse du raft.....	61
IV. Synthèses de composés d'intérêts non abouties.....	65
A. Synthèse d'un glycolipide monochaîne avec un espaceur PEG.....	65
B. Synthèse d'un glycolipide portant un dimannoside.....	68
Chapitre 3 : Fonctionnalisation des gouttes par les glycolipides.....	75
I. Caractéristique physico chimique.....	77
A. Fluorescence.....	77
B. Détermination de la CMC des glycolipides par les isothermes de Gibbs.....	79
II. Préparation des gouttes d'émulsions fonctionnalisées.....	81
A. Choix des matériaux utilisés.....	82
B. Fabrication d'émulsions polydisperses au mortier.....	83

III. Mise en contact avec des lectines.....	88
A. Optimisation des conditions expérimentales	88
B. Études sur la spécificité de la reconnaissance des gouttes par les lectines.....	90
Chapitre 4 : Préparation des sondes pH et propriétés.....	93
I. Des sondes fluorescentes déjà disponibles	94
A. BCECF un fluorophore pH sensible très largement utilisé	94
B. Le phénol : détecteur du pH	96
II. Le choix des sondes pH.....	97
A. Sonde DCNQ	99
B. Sonde hydroxynaphtalimide.....	101
Conclusion.....	105
Partie expérimentale	107
I. Synthèse organique.....	108
II. Protocoles de physicochimie relatifs aux émulsions.....	135
A. Fabrication des émulsions au mortier	135
B. Protocole de mise en contacts avec les lectines	135
Bibliographie	137

Chapitre 1 : Introduction et état de l'art

Bien que parmi les microparticules, les gouttelettes d'huile en émulsion aqueuse présentent de nombreux avantages sur les microparticules solides, elles sont cependant encore trop peu exploitées en biologie et médecine. Constituées de triglycérides naturels, elles sont, comme les liposomes, biocompatibles et biodégradables, tout en étant plus robustes. Elles constituent des plateformes intéressantes pour construire de nouveaux assemblages plurifonctionnels pour la vectorisation.

Ce projet est basé sur une utilisation innovante d'émulsions fonctionnalisées (huile dans l'eau) comme vecteur glycosylé visant des cellules dendritiques via les lectines.

I. Lectines et multivalence

A. Les lectines

Les lectines ont été décrites comme des protéines d'origine non-immune qui se lient spécifiquement et de façon totalement réversible aux sucres sans avoir aucune activité enzymatique [1]. Les lectines sont des macromolécules que l'on retrouve dans tous les organismes : microorganismes (virus, bactéries), plantes, insectes et animaux supérieurs. Elles peuvent être parfois appelées agglutinines car elles sont capables d'agglutiner les cellules (comme les globules rouges) via les glycoconjugués de surface. Cette caractéristique des lectines est due au fait que ces protéines sont multivalentes. Elles sont ainsi impliquées dans de nombreux processus d'adhésion entre cellules animales ou entre microorganisme et cellules animales [2,3].

Les anciennes méthodes utilisées pour les identifier consistaient à mélanger un extrait (ex : d'un tissu ou d'une plante) avec des érythrocytes en solution. Si une agglutination ou une précipitation des cellules étaient observées cela signifiait que l'échantillon contient une ou des molécules agglutinantes. Les premières lectines ont été identifiées chez les plantes, la toute première lectine isolée étant la ricine dans le travail de thèse de Peter Hermann Stillmark 1888 Tartu, Estonie mais un véritable intérêt n'y sera porté qu'à partir des années soixante, en même temps que le développement de la glycobiologie. L'intérêt d'utiliser ces lectines est la détection, l'isolement et la caractérisation d'oligosaccharides, comme la détermination des groupes sanguins et la caractérisation de glycoconjugués. Maintenant, les lectines sont considérées comme des molécules bioactives et de nombreux groupes se sont intéressés aux rôles biologiques de ces molécules [4–6].

Les lectines sont en fait des récepteurs spécifiques (Tableau 1) pour les interactions protéine-sucres qui jouent des rôles importants ou indispensables dans les processus de reconnaissance et de signalisation cellulaire. Par exemple, l'hémagglutinine du virus de la grippe reconnaît et se lie spécifiquement aux oligosaccharides terminés par un acide sialique situés sur les cellules épithéliales des voies aériennes [7]. De même, les lectines situées sur les bactéries, et les virus reconnaissent les glycoconjugués présents sur la surface des cellules épithéliales et donc permettent les processus de colonisation et d'infection.

Sigle	Noms de la lectine	motif ligand
Lectines spécifiques du Mannose		
ConA	Concanavaline A, Lectine du haricot sabre	résidus α -D-mannosyl and α -D-glucosyl structures ramifiées d' α -mannosyl (type riche en α -mannose, ou type hybride et bi-antennaire de N-Glycans complexes)
LCH	Lectine de la lentille	région de base fucosylée des N-Glycans complexes bi- et tri-antennaires
GNA	(Snowdrop lectin)	structures riche en mannose liés α 1-3 et α 1-6
Lectines spécifiques du Galactose / N-acetylgalactosamine		
RCA	PhytoAgglutinine, Toxoalbumine, ricine, RCA120	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R
PNA	Lectine de l'arachide (Peanut Agglutinin)	Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (T-Antigen)
AIL	Jacaline	(Sia)Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (T-Antigen)
VVL	(Hairy vetch lectin)	GalNAc α -Ser/Thr (Tn-Antigen)

Tableau 1 : Exemple de lectines connues et de leurs spécificités vis-à-vis des oligosaccharides. [Source : Wikipedia]

1. Les cellules dendritiques et la lectine DC-SIGN

a) Les cellules dendritiques

La réponse immunitaire spécifique est différente de la réponse immunitaire innée car elle est spécifique d'un antigène. Les principales cellules impliquées dans cette réponse sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes qui sont activés par la reconnaissance de l'antigène. Trois types de cellules ont des propriétés de présentation de l'antigène: les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

Cependant, les cellules dendritiques sont les plus efficaces et elles sont appelées cellules présentatrices professionnelles. Ce sont les seules capables de stimuler des lymphocytes T naïfs.

Les cellules dendritiques représentent une population hétérogène de cellules ayant comme origine des précurseurs médullaires. Il existe deux grands sous-types : les cellules

dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les cellules dendritiques ont pour rôles de capturer, le transporter, apprêter et la présenter des antigènes aux lymphocytes T. Elles sont présentes dans tout l'organisme, peuvent migrer, et de ce fait elles se déplacent du site où elles ont capturé des antigènes vers les sites d'interactions cellulaires. Les cellules dendritiques ont la capacité de déclencher une réponse immunitaire, qui est la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques représentent d'ailleurs le lien entre l'immunité innée et l'immunité spécifique adaptative.

b) DC-SIGN

L'efficacité des cellules dendritiques à déclencher une réponse immunitaire est due à la grande diversité des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés à leur surface. Hormis les récepteurs de type Toll, les cellules dendritiques possèdent des lectines de type C (CLRs) dédiées spécifiquement à la reconnaissance de pathogènes ayant des motifs glycosylés. Parmi eux, DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) a attiré beaucoup d'attention durant la décennie passée pour son rôle dans les infections HIV mais aussi dans la réponse antivirale [8,9].

DC-SIGN, est une protéine transmembranaire de type II de 44kDa comportant 404 acides aminés, organisée en domaines et distribuée aléatoirement sur la surface des cellules dendritiques. DC-SIGN est composée de trois parties (Figure 1) : un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Le domaine extracellulaire est divisé en deux domaines : un domaine de reconnaissance de sucre (CRD) et le domaine Neck.

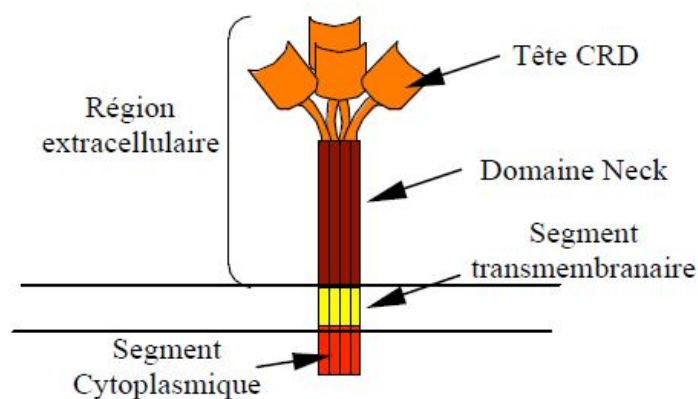


Figure 1 : Domaines d'organisation de DC - SIGN [10].

Le CRD de DC-SIGN dispose d'une structure globulaire et est composée de 2 hélices alpha, 12 feuillets beta, et 3 ponts disulfures (Figure 2) [11]. Une boucle dépasse de la surface de la protéine et participe à la formation des 2 sites de fixation au Ca^{2+} . Le premier site est responsable du maintien de la structure du CRD et le second est responsable de l'interaction

avec les structures glycosylées, c'est ce site qui permet la spécificité de la reconnaissance de DC-SIGN pour les groupes mannosylés (Man), N-acétylglucosamines (GlcNAc), glucosylés (Glc) et L-fucosylés (Fuc) [11].

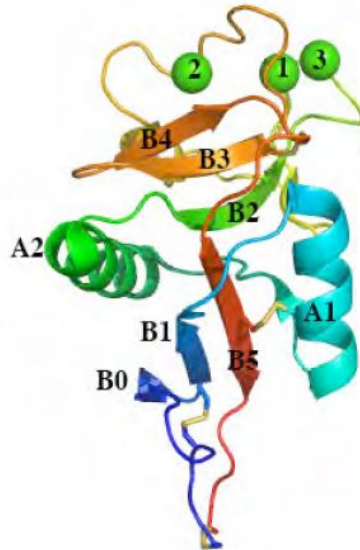


Figure 2 : Les lettres A et B représentent respectivement les hélices alpha et les feuillets beta, les 3 ponts disulfures sont présentés en traits de couleur orange [11]

DC-SIGN est exclusivement exprimé par les cellules dendritiques interstitielles immatures et matures [12]. Elle n'est pas exprimée sur les monocytes, les lymphocytes T, lymphocytes B, et les cellules de la moelle osseuse.

L'affinité pour un résidu mannose de DC-SIGN est faible (le K_d est de l'ordre de 2 mM) [13]. Cependant l'oligomérisation de la lectine en tétramère et les ligands hautement glycosylés permettent d'avoir une avidité plus importante (K_d de l'ordre du nM). La multivalence est donc nécessaire dans la reconnaissance des ligands.

2. Concanavaleine A

La concanavaleine A (Figure 3) va nous servir de premier modèle, c'est une lectine accessible commercialement et particulièrement étudiée. Comme DC-Sign, la ConA est un homotétramère : chaque sous-unité (de 26.5KDa, 237 amino-acides, fortement glycosylée) lie deux atomes, un Ca^{2+} et un métal de transition (Mn^{2+}). Sa structure tertiaire a été élucidée, et l'on connaît bien les bases moléculaires de ses interactions avec les métaux qui la composent, et de son affinité pour le mannose et le glucose.

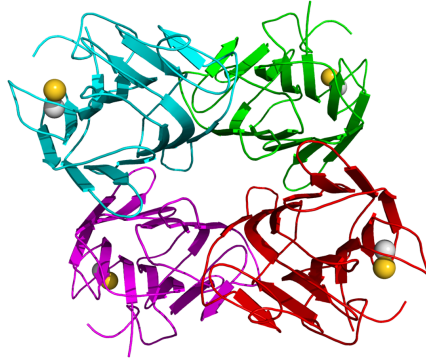


Figure 3 : Structure de la Concanavalin A [14]

3. Peanut agglutinin (PNA) ou lectine d'arachide

La PNA (Figure 4) va nous servir de second exemple de lectine, c'est une lectine à beta-D-galactose qui ne reconnaît pas l'alpha D-galactose, ni le mannose. La PNA est une lectine tétramérique (100 kDa) constituée de quatre protomères identiques (25 kDa) associés par des liaisons faibles mais en nombre suffisant pour assurer la cohésion de l'édifice moléculaire. Chaque protomère possède un site de reconnaissance des glycanes : c'est une lectine tétravalente (à quatre possibilités de liaison aux glycanes) [15]. Cette lectine tétramérique aussi est aussi beaucoup étudiée en particulier pour son utilisation sur des asialo protéines portant la séquence terminale Gal-β(1-3)-GalNAc [16].

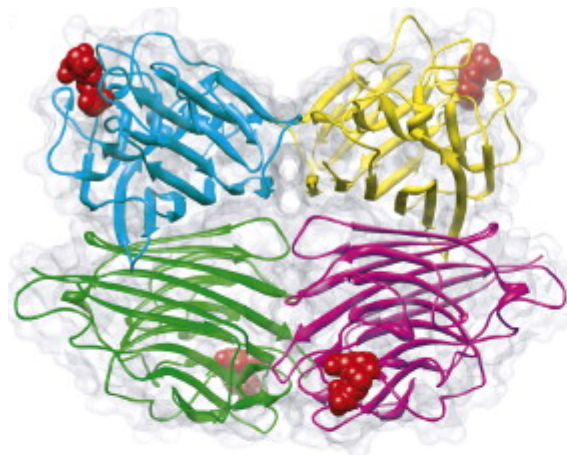


Figure 4 : Structure de la PNA. Source : pdb 1TEP

B. Multivalence

La reconnaissance spécifique de saccharides par des protéines est essentielle à la régulation de l'activité cellulaire telle que l'endocytose [17]. Comme vu précédemment dans le cas de DC-Sign, cette interaction est faible ($K_d \cong 1 \text{ mM}$) [13]. mais cette faible interaction est améliorée par des interactions multivalentes [18].

Les interactions entre récepteurs et ligands multivalents résultent en une augmentation de l'affinité. Cette augmentation d'affinité est un effet multivalent si l'affinité pour un système comportant X unités est au moins X fois supérieure à celle du ligand monovalent. De façon intuitive on pourrait penser que l'affinité est la somme des contributions individuelles de chaque ligand monovalent. Cependant la réalité est tout autre. La multivalence met en jeu des interactions simultanées entre ligands et récepteurs tous deux multivalents [19].

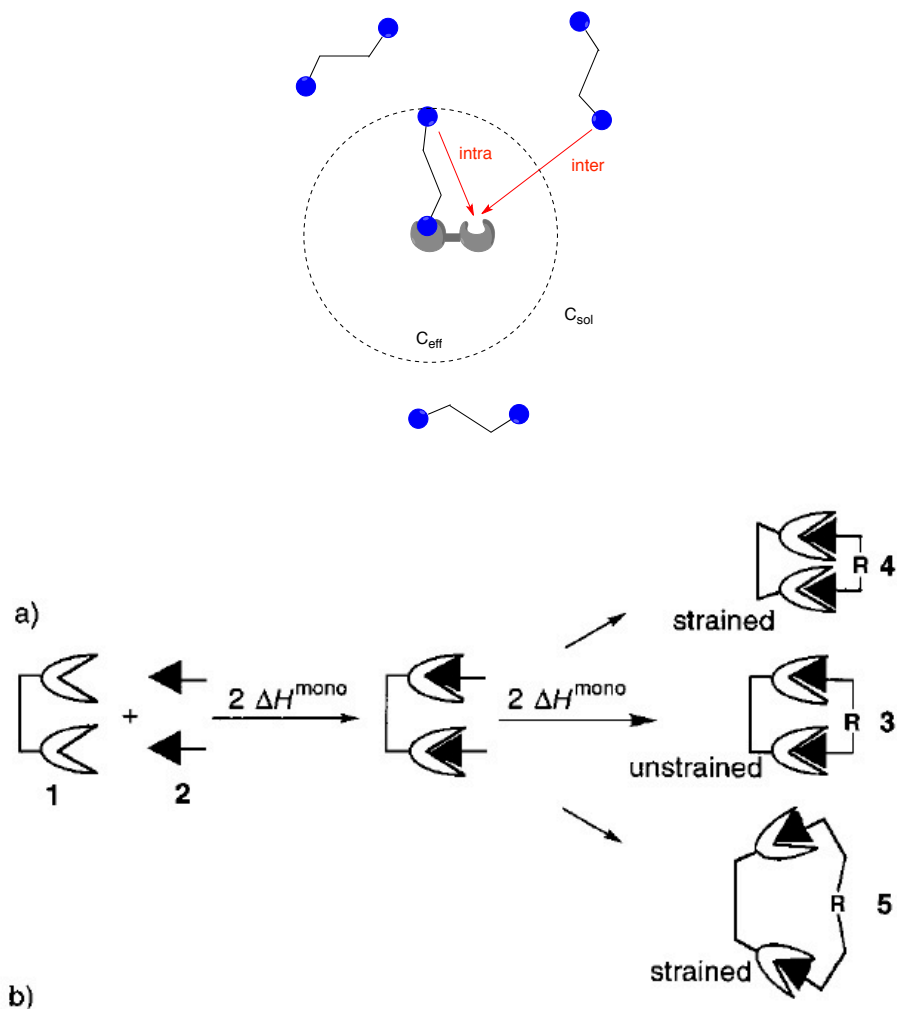


Figure 5 : Principe de l'effet de concentration [20]

1. Effet de la concentration

Le concept de concentration effective (C_{eff}) a été proposé pour expliquer l'effet chélate de complexes métalliques observé. Il n'a été appliqué aux interactions multivalentes que plus tard. [21–23]

L'effet de concentration fait la différence entre les interactions inter- et intramoléculaires et tient compte de la proximité ligands/récepteurs dans l'interaction de deux entités

multivalentes. La molarité effective est le terme plus général utilisé, représentant le ratio des constantes d'association des processus intra- sur intermoléculaire [24].

La première interaction entre les deux entités est forcément intermoléculaire. La deuxième interaction est soit intermoléculaire avec un autre ligand soit intramoléculaire avec le second épitope. Suivant l'espaceur entre les deux épitopes, la concentration locale autour du récepteur, c'est-à-dire la concentration effective, peut être plus importante que la concentration globale de la solution (C_{sol}).

Cependant cette explication même si elle est intuitive ne tient pas compte de l'espaceur. Depuis la mise au point de Whitesides [20], on sait que la rigidité de l'espaceur est un point clé (si c'est un polymère c'est la longueur de persistance) : un lien rigide ou les deux ligands sont déjà bloqués à la bonne distance est le plus favorable. Un espaceur trop long ou trop court créer une tension défavorable (Figure 5).

2. L'effet "chélate" et « cluster »

L'association chélate ou effet chélate est l'interaction simultanée de plusieurs épitopes d'un ligand multivalent avec un récepteur grâce à l'orientation semblable entre les deux [25].

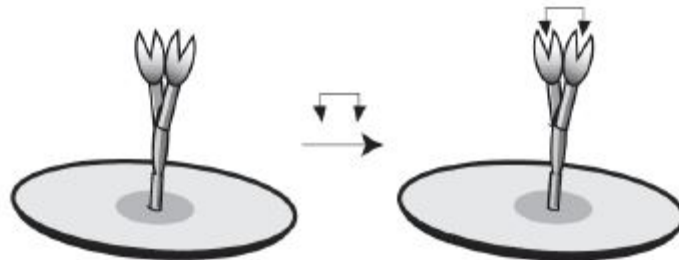


Figure 6 : Effet Chélate

Dans cet effet seule la première interaction (intermoléculaire) coûte de l'entropie, les suivantes, intramoléculaires, se font sans coût additionnel. Cette entropie favorable n'est que partiellement compensée par le coût énergétique dû à la rigidité conformationnelle du ligand, il en résulte un gain d'affinité non-négligeable [26].

L'effet cluster se base sur le fait que les récepteurs sont libres de diffuser le long de la paroi membranaire. Du fait de cette mobilité, lorsqu'un ligand se lie à un récepteur, les autres récepteurs du même type peuvent venir et former un cluster, favorisant ainsi l'interaction avec des ligands supplémentaires (Figure 7) [27].

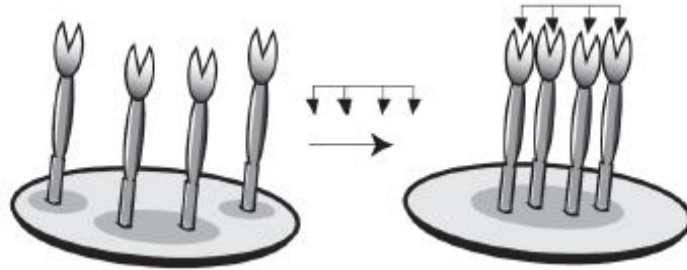


Figure 7 : Effet cluster

II. Structures glycosylées multivalentes

Notre but est de vectoriser via les reconnaissances multivalentes sucres/ lectines des micro ou nanoparticules contenant un antigène (ou un précurseur) vers des cellules dendritiques

A. Historique sur les particules pour la vectorisation

Il existe trois générations de particules. La première génération correspond à des nanoparticules stables emprisonnant des molécules actives, le but recherché étant de limiter leur élimination par le corps. Un exemple est le liposome, qui est une nanoparticule limitée par une bicouche lipidique. Même si ces particules sont à une échelle microscopique cela n'est pas suffisant pour permettre rester longtemps dans le milieu sanguin. Elles sont généralement considérées comme étant étrangers par notre corps, elles sont alors reconnues par les défenses immunitaires (par des opsonines) qui les éliminent.

Dans le but d'augmenter leur durée de vie dans le circuit sanguin afin d'atteindre la zone ciblée, la surface des nanoparticules a été fonctionnalisée pour obtenir des nanoparticules dites « furtives », elles constituent la seconde génération. Les « éléments » de furtivité, permettent d'avoir une couche protectrice qui diminue la probabilité de la fixation des opsonines (substance qui se lie à des antigènes et induit leur phagocytose) et permet ainsi d'échapper aux cellules du système immunitaire [28,29]. Le PEG (polyéthylène glycol) est probablement le plus utilisé à cet effet car il est entre autre biocompatible, non toxique et faiblement immunogène, de plus, son injection à l'homme est approuvée par l'ANSM (Agence Française de Sécurité Sanitaire Produits de Santé) et par la FDA (Food and Drug Administration).

Afin de pouvoir cibler précisément un tissu, des nanoparticules de troisième génération, dites « furtives et ciblantes », ont été fabriquées. Ces nanoparticules ont vu leur surface fonctionnalisée par des ligands biologiques reconnus de façon spécifique par les cellules visées. Les ligands pouvant être utilisés sur les nanoparticules sont variés : anticorps [30], peptides [31], des oligonucléotides [32] ou des saccharides [33,34].

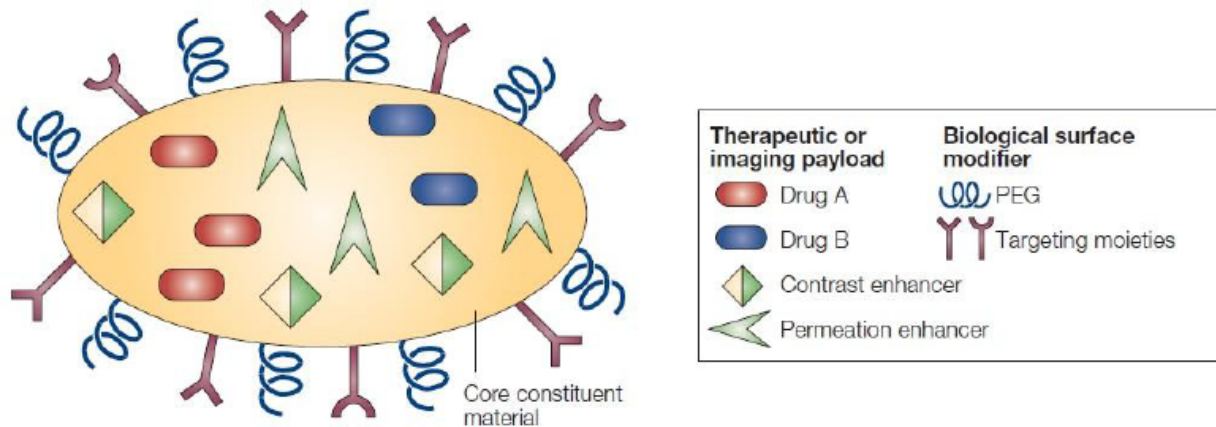


Figure 8 : Nanoparticule multifonctionnelle [35].

B. Structures glycosylées multivalentes

1. Les particules solides

La littérature décrit une très grande variété de structures glycosylées multivalentes et synthétiques cherchant à mimer les architectures naturelles. La structure de ces entités, c'est-à-dire leurs valences, leurs densités et leurs topologies, influence significativement les caractéristiques de l'interaction (affinité et mécanisme).

Elles peuvent être catégorisées en Glycocluster, Glycodendrimère, Glycopolymère, Glyconanoparticule (figure 9). Seulement quelques exemples significatifs seront discutés.

a) Glycoclusters

Les glycoclusters sont des structures multivalentes qui ne présentent pas d'unités de répétition. Les antennes glycosylées sont accrochées sur des molécules multifonctionnelles formant ainsi le coeur. Parmi ces structures, les cyclodextrines [36,37] et les calixarènes ont été très exploités du fait de la variabilité de la taille de leur cycle et de la possibilité de l'inclusion de molécules organiques dans leurs cavités [38].

b) Glycopolymères

Les glycopolymères sont des polymères auxquels sont accrochés des éléments glycosylés. Malgré un contrôle de la taille des entités via le ratio monomère/catalyseur, la distribution reste statistique. Plus le polymère a une masse importante, plus il est difficile à purifier et à analyser par MALDI-TOF. A cause de cette limitation, l'application thérapeutique de ce type de structure reste limitée.

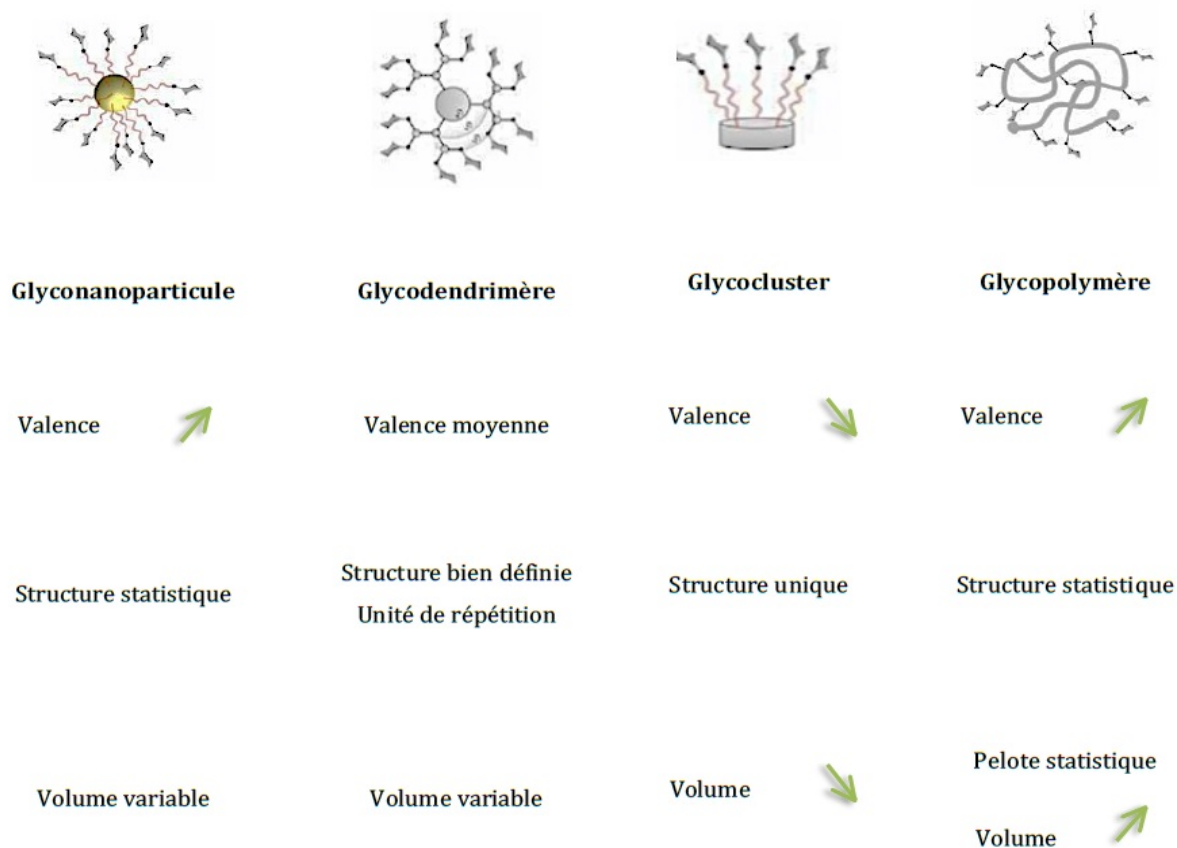


Figure 9 : Différentes catégories de structures glycosylées multivalentes. [39]

Deux façons peuvent être utilisées pour la synthèse : fonctionnaliser avant (glycomonomère) [40] ou après [41] la polymérisation. Contrairement à ce dernier, les glycomonomères permettent une architecture mieux définie mais ils présentent l'inconvénient d'être moins faciles à caractériser structurellement en fin de polymérisation.

Les nanoparticules à base de polymères sont constituées de polymères biocompatibles et biodégradables. Les polymères les plus utilisés actuellement pour la formulation de nanoparticules sont le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique) et le poly(acide lactique/glycolique), respectivement abrégés PLA, PGA et PLGA en anglais. [42].

c) Glyconanoparticules (GNP)

En plus des nanoparticules organiques (glycopolymère), des nanoparticules inorganiques ont été largement étudiées. Les nanoparticules inorganiques utilisent un large éventail de matériaux. On peut citer : les nanoparticules d'or, d'argent, d'oxyde de gadolinium, des nanoparticules magnétiques et des nanoparticules de silice. Parmi les nanoparticules inorganiques largement utilisées, on peut citer le cas des nanoparticules d'or et celles magnétiques.

Les nanoparticules d'or sont les plus utilisées du fait de leur stabilité, de leur homogénéité en taille et de la corrélation entre les propriétés optiques et électroniques avec la taille des nanoparticules [43]. L'application des nanoparticules à ce domaine date seulement de 2001 [44] avec la fonctionnalisation de nanoparticules d'or avec des glycoconjugués d'intérêt biologique, comme le disaccharide lactose ou le trisaccharide Lewis X.

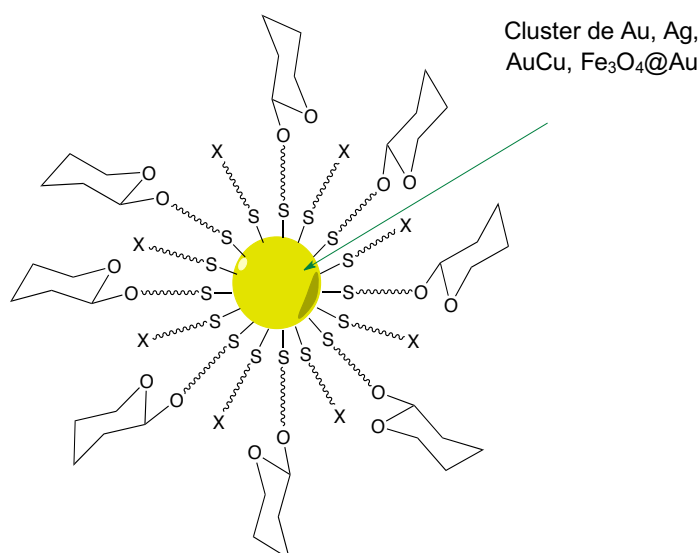


Figure 10 : SAM (self assembled monolayer) d'oligosaccharides thiolés sur des nanoparticules de différente sorte (X= peptides, protéines, anticorps, sondes fluorescentes, complexes de gadolinium).

Le coeur Au peut être modifié pour obtenir des glyconanoparticules ayant des propriétés semi-conductrices et magnétiques pour l'imagerie moléculaire bien que peu d'exemples existent encore [45]. Ainsi, le coeur inorganique peut être préparé en argent métallique ou en maghémite (Fe₃O₄) recouvert d'or (Fe₃O₄@Au). Celles comportant de l'oxyde de fer permettent d'avoir des applications dans l'imagerie par résonance magnétique (IRM), le traitement de tumeurs et la délivrance ciblée de médicaments. Le rendement, la taille et la distribution de ces tumeurs sont contrôlés en partie par la manière de les synthétiser (co-précipitation, décomposition thermique,...) [46].

d) Glycodendrimères

Les dendrimères ont été synthétisés pour la première fois en 1985 par deux groupes indépendants: Tomalia *et al.* [47] et Newkome *et al.* [48]. Depuis ce jour, l'intérêt dans les structures dendritiques n'a fait qu'augmenter.

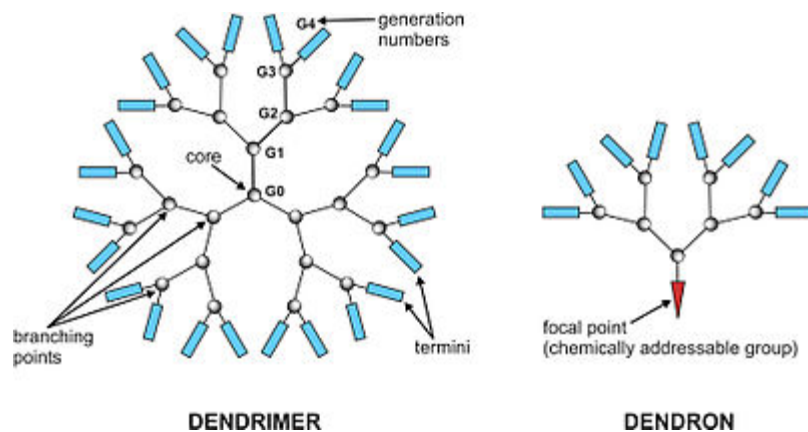


Figure 11 : structure d'un dendrimère [49].

Les dendrimères sont des structures monodisperses avec des unités qui sont répétées, permettant à leur structure d'être très bien définie même pour les dendrimères présentant beaucoup de générations. Ils sont composés d'un coeur multifonctionnel permettant l'ajout d'une nouvelle ramification, appelée génération (figure 11). Les glycodendrimères sont des structures analogues comportant des éléments glycosylés. Ces structures présentent l'avantage d'être hautement glycosylées et avec une structure définie chimiquement. En général les dendrimères sont utilisés comme vecteurs de drogues ou de marqueurs d'imagerie [50]. Cependant, leur synthèse reste complexe et leur capacité de chargement de médicament ou autre est faible [51].

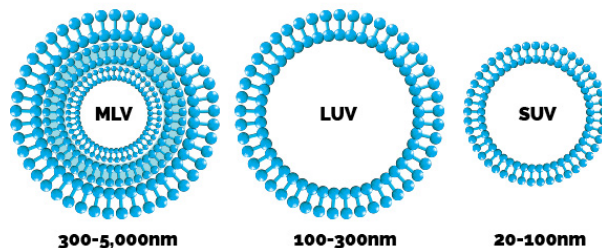


Figure 12 : Représentation schématique de diverses sortes de liposomes : les liposomes multilamellaires (MLV) et les liposomes unilamellaires de type LUV (Large) ou SUV (Small) en fonction de leur taille [52].

2. Particules à interface fluide : liposomes

Les liposomes sont des vésicules unilamellaires ou multilamellaires dont la membrane est constituée d'une bicouche ou un empilement de bicouches de lipides [53], et sont schématiquement représentés comme sur la Figure 12. On classe généralement les liposomes en trois catégories distinctes correspondant à des domaines de tailles différents [54] (SUV : quelques dizaines de nanomètres, LUV : quelques centaines de nanomètres, GUV : quelques dizaines de microns). Les plus petites, aussi appelées SUV pour Small Unilamellar Vesicles, sont commercialement utilisées comme vecteurs

thérapeutiques de principes actifs [55]. Seules les plus grosses, les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) sont observables en microscopie optique.

Les lipides entrant dans leur composition sont souvent des molécules amphiphiles à double chaîne aliphatique (C8 à C16) : leur CMC est très faible (de 10^{-6} à 10^{-10} mol/L respectivement [56]) et leur courbure spontanée est proche de zéro. En volume, les lipides s'autoassemblent en bicouches fermées, multiples (phases multilamellaires) ou simples (liposomes). Au sein d'une même bicouche, les parties hydrophobes des lipides se font face alors que les parties hydrophiles sont dirigées vers le solvant aqueux. On trouve dans le commerce une quantité importante de lipides naturels ou synthétiques, dont certains ont été modifiés de manière à présenter des ligands de type biotine ou du polyéthylène glycol. Contrairement aux émulsions où la monocouche d'amphiphiles sépare une phase huile et une phase eau, une bicouche lipidique sépare deux phases aqueuses. Toutefois, elle est quasiment imperméable aux molécules de taille moyenne, comme les sucres par exemple, mais est perméable à l'eau. Il est donc possible de produire des vésicules dont la phase interne et la phase externe n'ont ni la même densité ni la même osmolarité, et ainsi jouer sur la rigidité de membrane lors d'expériences [57].

Les propriétés de diffusion bidimensionnelle sont semblables pour des protéines ou des lipides incorporés dans la membrane : dans le cas où la bicouche est liquide, le coefficient de diffusion est presque toujours compris entre 10^{-8} et 10^{-7} $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ [58].

Midoux *et al.* ont d'ailleurs utilisé de tels objets, dans le cadre de la vaccination des souris contre le mélanome B16F10 [59]. En effet ils ont utilisé des liposomes fonctionnalisés avec des mannolipides contenant de l'ARNm. Leur fonctionnalisation permettait d'avoir une reconnaissance et internalisation du liposome par les cellules dendritiques et d'obtenir ainsi une réponse immunitaire chez les souris.

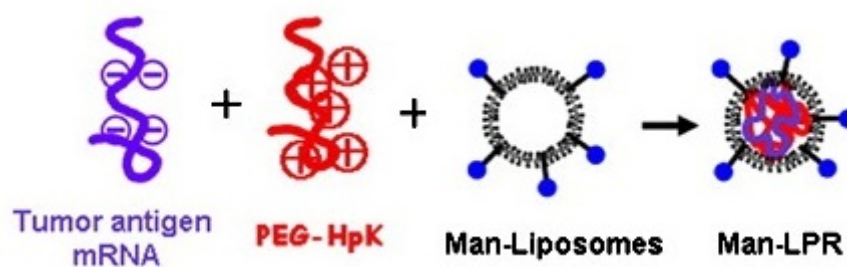


Figure 13 : Liposomes mannosylé développé par Midoux *et al.* [59]

Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont une stabilité limitée dans le corps humain et un relargage précoce d'agents actifs dans le sang [60].

Dans le cadre de ce travail de doctorat, nous avons voulu explorer la possibilité d'utiliser un autre support colloïdal comme vecteur fonctionnalisable par diverses molécules fonctionnelles, tout en conservant la possibilité pour les molécules glycosylées à l'interface

de pouvoir apparaître comme localement multivalentes au contact de récepteurs ou protéines solubles de la famille des lectines. C'est donc assez naturellement que nous avons cherché à travailler à partir de gouttes d'émulsions huile-dans-eau. Les émulsions sont des mélanges métastables composés de deux liquides non miscibles stabilisés par des émulsifiants ou tensioactifs qui forment un film interfacial facilitant la dispersion durable d'une phase dans l'autre.

Dans la section suivante, nous introduirons des notions générales sur les émulsions, leur composition et la caractérisation de leurs propriétés interfaciales.

III. Un autre type de particules à interface fluide : les émulsions

A. Généralités sur les émulsions

Les émulsions ont été beaucoup étudiées au cours des dernières décennies en raison de leurs larges domaines d'applications industrielles (pharmaceutique cosmétique, alimentaire, peinture...). Leur utilisation croissante est liée à leur préparation souvent facile, à la diversité de matières premières disponibles et aussi à une meilleure compréhension de leur formation et stabilité [61].

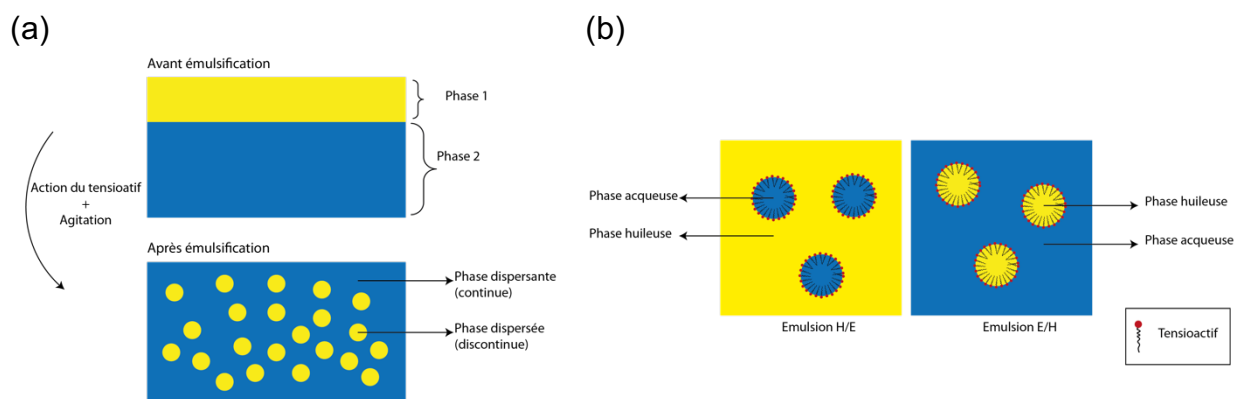


Figure 14 : (a) Représentation schématique de la formation d'une émulsion à partir de deux liquides non miscibles. (b) Représentation schématique des deux types d'émulsions les plus couramment utilisées, indirecte (H/E) et directe (E/H) [61].

L'un des liquides représente la phase continue, l'autre une phase immiscible qui est dispersée dans la première sous forme de petites gouttes allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de microns. Une émulsion est une suspension liquide/liquide métastable, *i.e.* dont la stabilité dans le temps est finie. Cette stabilité peut aller de quelques heures à plusieurs mois. Elle est apportée par la présence de molécules amphiphiles, tensioactives, à l'interface, que l'on appelle surfactants. A la différence des liposomes cités plus haut, qui sont formés d'une bicouche encapsulant une phase aqueuse, les tensioactifs à la surface d'une émulsion forment une monocouche entre les deux phases immiscibles.

On définit deux types d'émulsions selon la nature de la phase dispersée et continue : les émulsions directes appelées « huile dans eau » et notée H/E lorsque l'huile constitue la phase dispersée et les émulsions indirectes ou inverses appelées « eau-dans-huile » et notées E/H lorsque l'huile constitue la phase continue (cf. Figure 14). On peut également trouver des émulsions multiples H/E/H ou E/H/E [61].

B. Tensioactifs : structure et classification

1. Généralités sur les tensioactifs

Afin de stabiliser l'interface entre les deux liquides, l'ajout de surfactants est nécessaire. La Figure 15 montre une représentation schématique de la structure d'un monomère de tensioactif et de ses micelles associées si le tensioactif est par exemple un tensioactif direct courant comme le SDS. La présence de tensioactif à l'interface huile/eau aux émulsions une stabilité cinétique plus ou moins grande, allant de quelques secondes à plusieurs années. Il s'agit de molécules amphiphiles constituées de deux parties d'affinités différentes : l'une est hydrophobe et s'immerge dans le corps gras, l'autre hydrophile est soluble dans l'eau.

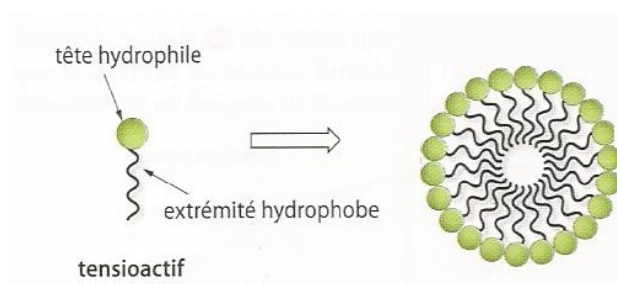


Figure 15 : Représentation schématique d'un monomère de tensioactif composé d'une partie hydrophile polaire ou ionique et d'une partie hydrophobe constituée généralement d'une chaîne carbonée. A droite, la micelle sphérique qui apparaît au dessus de la CMC, dans le cas d'un tensioactif de type SDS [62].

A partir d'une certaine concentration de tensioactifs dans une solution, appelée concentration micellaire critique ou CMC, on observe un auto-assemblage des molécules de tensioactifs pour former des agrégats en solution qu'on appelle micelles. La forme des micelles dépend de la nature du tensioactif, de l'environnement physico-chimique ainsi que de la concentration. Dans le cas de l'existence d'une interface de type eau-huile, la densité de molécules tensioactives à l'interface est constante et correspond à un minimum de la tension interfaciale au delà de la CMC. Pour des tensioactifs classiques moléculaires à simple chaîne lipophile, la CMC varie généralement entre 10^{-5} et 10^{-3} mol.L⁻¹ [62].

2. Classes de tensioactifs

Les tensioactifs sont classés (cf. Figure 16) selon la nature de la partie hydrophile en trois grandes familles : les tensioactifs ioniques (cationiques ou anioniques), les tensioactifs non ioniques ou neutre et enfin les tensioactifs amphotères (zwitterioniques).

Les agents tensio-actifs **anioniques** présentent l'avantage d'être des agents moussants stables et efficaces, cependant ils ont l'inconvénient d'être sensibles à la présence de sels minéraux dans l'eau (dureté de l'eau) ou pour certains à des changements de pH. Ils comprennent entre autres [63] les alkylbenzènesulfonates (détergents), les acides gras (savons), le sulfate de lauryle (agent moussant et détergent), le sulfosuccinate de di-alkyl (agent mouillant), des lignosulfonates (dispersants).

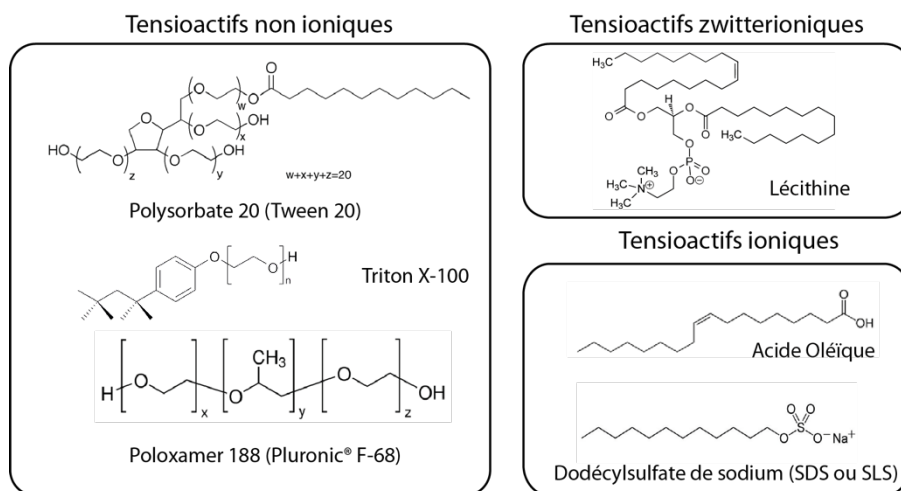


Figure 16 : Représentation de structures chimiques des différentes classes de tensioactifs. Les parties hydrophiles des tensioactifs non-ioniques sont très souvent formées de chaînes de poly(éthylène)glycol.

Une grande partie des tensioactifs **cationiques** est constituée de composés azotés tels que les sels d'amines grasses et les ammoniums quaternaires, avec un ou plusieurs composés à longues chaînes, qui sont dérivés d'acides gras naturels. Des exemples courants de tensioactifs cationiques sont l'hydroxyde de tétraméthylammonium et le chlorure diméthylodioctadécylammonium.

L'association de charges anioniques et cationiques dans une seule et même molécule de tensioactif est appelée **zwitterionique**. C'est le cas des substances naturelles tels que les acides aminés et les phospholipides.

Les tensioactifs **non ioniques** possèdent des têtes hydrophiles non chargées. Une grande partie de ces tensioactifs sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs chaînes polyéthylène glycol, obtenue par polycondensation d'oxyde d'éthylène [64]. Ils représentent une famille importante de tensioactifs qui sont largement utilisés en raison de leurs excellentes propriétés d'interface et de stabilisation, leur faible coût et leur utilisation en tant qu'agents non toxiques et biodégradables [65–67].

Les tensioactifs sont utilisés dans de nombreux protocoles en biologie et biochimie, notamment pour la lyse cellulaire (SDS), la transfection (lipofectamine) [68], la perméabilisation de membrane lors de la fixation (triton-X-100), les expériences de migration

électrophorétique du gel (SDS), la manipulation des protéines membranaire, etc. De manière générale, lorsqu'on veut maintenir l'intégrité cellulaire ou protéique, il faut éviter de travailler avec des tensioactifs chargés car leur pouvoir détergent est très grand. L'utilisation de tensioactifs non-ioniques avec des cellules vivantes peut avoir un effet dommageable sur les membranes, comme dans le cas du Triton [69], mais aussi un effet protecteur comme dans le cas de certains poloxamer [70].

C. Fabrication et stabilité des émulsions

1. Méthodes classiques de fabrication des émulsions

De nombreuses techniques de fabrication d'émulsions ont été développées de manière à répondre à des contraintes de volume de production, de taille de gouttes et de monodispersité. À l'exception de quelques procédés [71], la fabrication d'une émulsion revient à fragmenter une phase immiscible dans une autre, nécessitant l'injection d'une énergie importante dans le système.

Procédé d'émulsification	Tailles obtenues (μm)
Procédés à membrane	0,2 – 100
Microfluidique	1 – 1000
Homogénéisateurs haute pression	0,05 – 5
Emulsificateur de Couette	1 – 10
Ultrasons	0,04 – 200

Tableau 2 : Quelques exemples de procédés de fabrication et les tailles qu'ils permettent d'obtenir.

Les procédés d'émulsification courants peuvent être classés en deux catégories selon le mécanisme mis en jeu : les systèmes qui utilisent un cisaillement mécanique et les systèmes qui font appel au phénomène de cavitation [72]. Le premier groupe comprend les dispositifs à rotor stator (exp : cellule de Couette), les broyeurs colloïdaux (ex. UltraTurrax), les membranes (ex. Shirasu Porous Glass) et les systèmes microfluidiques [73]. Pour le deuxième système on peut citer les techniques de fragmentation par ultrasons et les homogénéisateurs à haute pression (ex. Microfluidizer®). Quelques données numériques relatives aux tailles accessibles par ces procédés sont résumées dans le Tableau 2.

L'émulsification avec des membranes permet d'obtenir des gouttes avec des tailles allant de 0,2 à 100 microns et une bonne monodispersité [74]. Le principe est simple : la phase dispersée est injectée dans la phase continue à travers une membrane dont les pores ont des tailles identiques. Les membranes disponibles peuvent être fabriquées en verre microporeux, en silicium, en polymère ou en céramique [75].

Les homogénéisateurs de type Microfluidizer® consistent à faire passer une pré-émulsion sous haute pression (de 5 à 100 MPa) dans un espace confiné. Le mélange sous pression

est alors soumis à un mélange de turbulence hydrodynamique et de cavitation qui le fragmente en des gouttelettes de plus petite taille allant de 0,05 à 5 μm [74].

Les procédés à ultrasons représentent une alternative aux procédés d'émulsification mécanique. Les émulsions issues de ce type de système peuvent être très petites et très stables [76]. La taille des gouttes obtenues dépend de la puissance ultrasonore, de la tension interfaciale et de la viscosité de chaque phase. Elles peuvent varier entre 40 nm [77] jusqu'à atteindre la centaine de microns [78].

La microfluidique du fait qu'elle permet un très bon contrôle des modes de déstabilisation des gouttes lors de leur formation [79], est la seule technique qui autorise l'obtention de distributions de tailles parfaitement monodisperses en contrôlant les débits et les géométries des systèmes. Du fait des contraintes de microfabrication, les tailles des gouttes varient généralement entre 10 et quelques centaines de microns de diamètre, et les volumes produits sont faibles.

Enfin une dernière technique un peu particulière est d'utiliser l'effet Ouzo. Cette technique est décrite sous différents noms tels que : nanoprécipitation, déplacement de solvant, émulsification spontanée ou encore effet Ouzo. Deux phases sont nécessaires, une phase organique composée d'huile dissoute dans un solvant organique polaire miscible à l'eau (tel que l'acétone ou l'éthanol). Cette phase organique est versée dans une phase aqueuse qui peut contenir des agents stabilisants. Le mélange des deux phases se fait sous agitation [80]. L'émulsion se forme alors instantanément sous l'effet de la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse externe. Le solvant organique est ensuite éliminé avec la phase aqueuse.



Figure 17 : Photographie d'une expérience de fragmentation d'une huile dans une phase continue aqueuse à l'aide d'un mortier en agate lisse.

Dans le cadre de notre étude, comme nous le verrons plus loin dans la description des expériences, nous avons utilisé une méthode que l'on pourrait qualifier de rudimentaire pour produire une émulsion : le cisaillement de la phase huile dans une phase aqueuse contenant un tensioactif à l'aide d'un petit mortier en agate et d'un pilon (Figure 17). Cette technique a l'avantage de produire des gouttes assez facilement, avec une quantité de matières premières très faible, de l'ordre de quelques dizaines de microlitres. Ceci est donc suffisant pour rapidement tester des formulations avant d'éventuellement faire une mise à l'échelle à partir des techniques décrites plus haut.

2. Stabilité des émulsions

Les émulsions sont, comme nous l'avons dit plus haut, des suspensions métastables, i.e. avec une durée de vie finie qui mène peu à peu à la demixion des phases qui la composent [61]. Plusieurs mécanismes de destabilisation ont été identifiés (Figure 18).

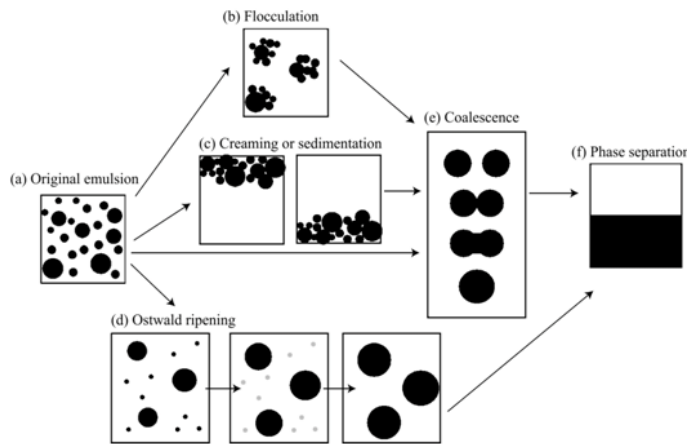


Figure 18 : Schéma récapitulant les mécanismes courants de destabilisation des émulsions : coalescence. Ceux-ci peuvent être irréversibles : (coalescence, mûrissement d'Ostwald) ou réversibles (crémage, sédimentation). Dans le cas de la flocculation, le caractère peut être réversible ou irréversible en fonction du type d'interactions attractives mises en jeu [81].

Les mécanismes de destabilisation irréversible sont couramment au nombre de deux : la coalescence, qui provient de la destabilisation des films interfaciaux au contact entre les gouttes, et le mûrissement d'Ostwald, qui est la conséquence d'une différence de potentiel chimique entre les petites et grosses gouttes dans une émulsion polydisperse. Dans ce second cas, les petites gouttes se vident peu à peu dans les grosses, par transfert de matière à travers la phase aqueuse.

Les mécanismes de destabilisation peuvent être réversibles, comme le crémage ou la sédimentation que l'on rencontre lorsqu'on travaille avec des objets de taille supérieure au micron dont la densité est différente de celle de la phase continue, comme conséquence de l'action de la poussée d'Archimède sur des gouttes qui n'ont plus le caractère brownien suffisant pour les maintenir en suspension homogène. Enfin, un dernier mécanisme, la flocculation, peut être réversible ou irréversible en fonction des interactions colloïdales en présence, comme par exemple des interactions de déplétion [82].

La stabilité de l'émulsion est un point critique pour les applications, la coalescence des gouttelettes en gouttes de plus en plus grosses mène peu à peu à un retour à une séparation des deux phases. Cet effet est accentué par des étapes préliminaires de crémage ou décantation ou flocculation. Alors que le mûrissement d'Ostwald peut être complètement supprimé en fabriquant des gouttes très monodisperses, le contrôle de la coalescence est moins simple car il dépend de la composition de l'émulsion et il est très difficile à prévoir *a priori*.

D. Tension interfaciale : définition et mesure

1. Notion d'interface et de tension superficielle

Une interface est une zone de séparation entre deux phases liquides non miscibles ou une phase liquide et un gaz comme l'air par exemple. Bien que très souvent représentée avec une transition discontinue d'une phase à l'autre, la zone interfaciale a une épaisseur x qui se caractérise par une évolution continue des concentrations, comme schématisé ci-dessous.

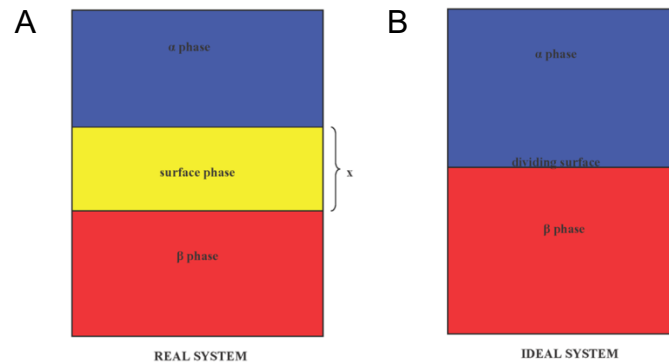


Figure 19 : (A) Schéma représentant la zone interfaciale d'épaisseur finie x qui existe entre deux phases immiscibles α et β . (B) Dans le cadre du modèle de Gibbs, la zone interfaciale est considérée sans épaisseur, et sa position est déterminée arbitrairement.

Du fait de la brisure de symétrie existant pour une molécule de α située à l'interface, se retrouvant au contact de molécules de la phase β , l'existence de l'interface impose la prise en compte d'un terme thermodynamique additionnel [83] dans l'énergie libre du système

$$dG = \gamma dA$$

avec γ la tension interfaciale et A l'aire géométrique entre les deux phases. La tension superficielle peut être vue comme une force tangente à l'interface et tendant à minimiser son étendue. Elle s'exprime J/m^2 mais plus couramment en mN/m pour des raisons historiques. La tension interfaciale entre l'air et l'eau est de $72 mN/m$.

2. Les différentes méthodes de mesure de la tension de surface

Il existe différentes méthodes pour mesurer la tension interfaciale entre deux liquides ou entre un liquide et l'air. Toutes les techniques ont en commun de déduire la tension superficielle par une étude de la forme d'un liquide à l'équilibre avec une composante mécanique connue : gravité, vitesse de rotation, etc [84].

a) Mesure de la tension de surface par l'expérience de la montée capillaire

Lorsque l'extrémité d'un tube capillaire est insérée dans l'eau, on peut observer une ascension du liquide dans le capillaire, si celui-ci est fait d'un matériau mouillant pour l'eau, c'est-à-dire un matériau pour lequel l'eau a une bonne affinité physico-chimique (Figure 20).

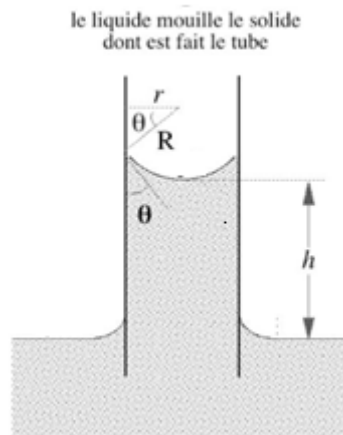


Figure 20 : Schématisation de la mesure de la tension de surface par capillarité en utilisant la loi de Jurin. Dans le cas d'un liquide mouillant le matériau du capillaire, on observe une montée du liquide h. Source : <http://slideplayer.fr/slide/10244992/release/woothee>

La hauteur h de liquide à l'équilibre est définie par l'équilibre mécanique entre les forces interfaciales au niveau du ménisque et le poids de la colonne de liquide. Dans le cas d'un matériau parfaitement mouillant ($\theta=0$), la loi de Laplace au niveau du ménisque, s'écrit:

$$\Delta P = P_{atm} - P_{liq} = \frac{2\gamma}{R}$$

avec R le rayon du tube capillaire et γ la tension interfaciale.

La loi de la statique des fluides établit aussi une relation avec une différence de pression entre deux milieux :

$$\Delta P = \rho_{eau} * g * h$$

avec ρ_{eau} la masse volumique du liquide et g l'accélération de la pesanteur.

En égalant les deux expressions, on retrouve la loi de Jurin :

$$h = \frac{2\gamma}{\rho_{eau} * g * R}$$

Dans la réalité, il faut tenir compte d'un angle de contact du liquide sur le matériau du capillaire. Cet angle varie en fonction de la nature du matériau, mais aussi en présence de la nature et la concentration en tensioactifs dans le liquide. Pour cette raison, la méthode de la montée capillaire est moins aisée à mettre en œuvre que les relations ci-dessus laisseraient à penser.

b) Méthode de la goutte pendante

Une des méthodes les plus courantes pour mesurer la tension interfaciale de liquides est la méthode de la goutte pendante (*pendant drop technique*). C'est la méthode que nous avons mis en œuvre expérimentalement.

Elle est basée sur l'analyse de la forme d'une goutte de liquide de volume V_d , suspendue dans l'air ou dans un liquide à une seringue de diamètre D_n , soumise à la gravité ou à la poussée d'Archimède d'une part, et à la tension interfaciale d'autre part [85]. Comme le montre la Figure 21, la goutte a une forme sphérique pour un petit volume, puis s'allonge lorsque V_d augmente.

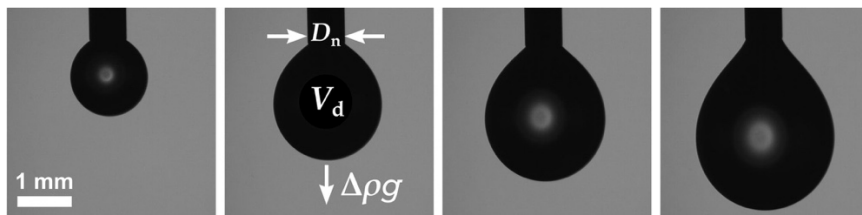


Figure 21 : Images de gouttes de différents volumes V_d suspendus à une seringue d'un tensiomètre de laboratoire. De sphérique (gauche), le profil de la goutte s'allonge peu à peu jusqu'à ce que la goutte soit trop volumineuse pour une tension interfaciale donnée et se détache. Source : [85]

La forme de la goutte à l'équilibre étant minimale d'un point de vue énergétique, le profil peut être calculé analytiquement, et la tension interfaciale peut être déduite de la mesure de deux grandeurs caractéristiques d_e et d_s représentées sur la Figure 22A :

$$\gamma = \Delta\rho \cdot g \cdot d_e^2 \cdot \frac{1}{H}$$

où $\Delta\rho$ est la différence de masse volumique entre les deux fluides, g est l'accélération de la pesanteur et H un facteur correctif tabulé déterminé à partir du rapport d_s/d_e [86]. On comprend intuitivement que la mesure gagne en précision avec l'allongement de la goutte, puisque si celle-ci est sphérique, il est difficile de tenir compte de la composante liée à la gravité.

Aujourd'hui, on procède différemment, et à l'aide d'un matériel de prise et d'analyse d'image, la tension superficielle est déduite directement de l'interpolation du profil exact de la goutte, comme représenté sur la Figure 22B.

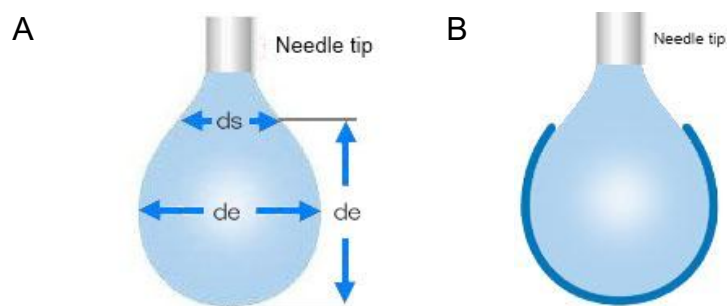


Figure 22 : Représentation schématique des deux méthodes courantes permettant de mesurer la tension de surface par la technique de la goutte pendante. (A) méthode géométrique, basée sur la mesure de la largeur à l'équateur de la goutte de et de la largeur ds à une hauteur de de l'apex de la goutte. (B) méthode de Young-Laplace, basée sur l'interpolation du profil exact de la goutte. Source : <http://www.face-kyowa.co.jp/>

En pratique, nous avons analysé la forme d'une goutte de solution aqueuse en suspension dans l'air. La forme de la goutte est analysée par analyse d'image avec un tensiomètre Krüss (Drop Shape Analyzer – DSA30) présent à l'IPGG (Laboratoire MMN, ESPCI).

3. Détermination de la CMC par mesure de tension interfaciale

Considérons le cas simple d'un volume d'eau au contact avec l'air, dans lequel une concentration volumique C en molécules de surfactant est dissoute. A faible concentration, les tensioactifs sont présents dans la phase liquide sous forme de monomères, et leur caractère amphiphile leur permet de s'adsorber dynamiquement à l'interface air/eau, comme le montre la Figure 23. La tension interfaciale diminue donc avec l'augmentation de la concentration.

Lorsque la concentration C dépasse la concentration micellaire critique (CMC), les molécules amphiphiles s'organisent sous forme de micelles en mettant en commun leur partie hydrophobe de façon à minimiser les contacts avec la solution aqueuse. Le type des micelles varie en fonction de la géométrie et de la concentration en tensioactifs et peuvent avoir des formes très différentes : sphères, lamelles, cylindres, disques, vésicules [83]. Les micelles se caractérisent par un nombre d'aggrégation bien défini pour chaque tensioactif, qui correspond au nombre moyen de monomères qui la composent. Dans le cas d'un tensioactif comme le SDS, ce nombre d'aggrégation est de l'ordre de 40 pour des concentrations correspondant à des micelles sphériques. Au niveau de l'interface, les molécules tensioactives sont en condition saturante à partir de la CMC, impliquant que la tension interfaciale soit constante dans ce régime.

Les méthodes de mesure de la CMC sont nombreuses, et tirent toutes parti de la transition abrupte de la composition physico-chimique ou de grandeurs caractéristiques à partir du seuil d'apparition des micelles [87]: pression osmotique, conductivité pour des tensioactifs ioniques, fluorescence ou absorption si des molécules solvatochromes sont utilisées [88], et l'évolution de la tension interfaciale. C'est cette dernière méthode que nous avons mise en œuvre dans la suite.

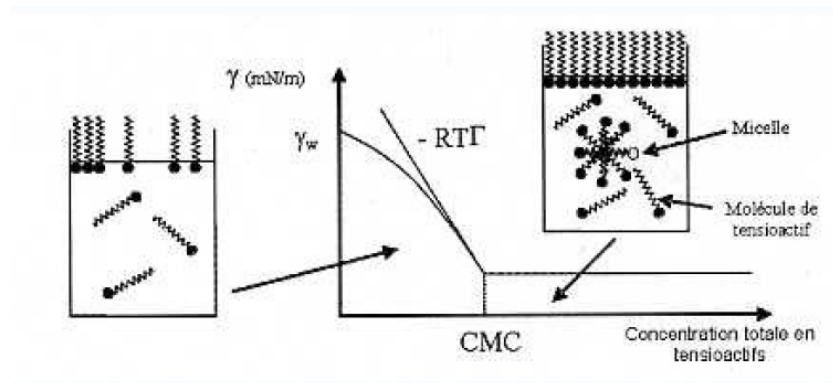


Figure 23 : Evolution de la tension interfaciale d'un système eau/air en fonction d'une concentration croissante en tensioactif. La tension interfaciale diminue jusqu'à obtenir une valeur minimale et constante pour des concentrations supérieures à la CMC. Dans ce graphe, l'axe des concentrations est en échelle logarithmique.

La thermodynamique nous permet d'obtenir une relation mathématique entre l'accumulation des espèces à l'interface et son effet sur la tension superficielle : l'isotherme de Gibbs [83]. La CMC est aisément déterminée en identifiant le point de rupture de pente de la courbe.

Le tracé de l'isotherme permet de plus d'avoir une mesure de la densité surfacique de molécules tensioactives à la surface Γ et ainsi calculer l'aire disponible par amphiphile. Sans rentrer dans le détail des calculs, on montre que

$$\Gamma [\text{m}^{-2}] = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{dC}$$

à temperature et pression constante, avec R la constante des gaz parfaits.

IV. Emulsions : état de l'art sur leur utilisation en pharmaceutique et biophysique

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les émulsions sont des matériaux dont l'usage est très répandu. Dans la suite, nous décrirons succinctement quelques applications pharmaceutiques pour la délivrance de principes actifs et les expériences de recherche pour

lesquelles les émulsions ont été utilisées comme outils pour répondre à des questions biophysiques et/ou biologiques.

A. Administration de principes actifs avec des émulsions

L'utilisation de dispersions lipidiques, telles que des émulsions H/E (Tableau 3), comme vecteurs de principes actifs ou agents thérapeutiques lipophiles suscite un intérêt important depuis plus d'une cinquantaine d'années [89–92]. En effet, de nombreux principes actifs courants comme les molécules anticancéreuses, la prostaglandine E1, le diazépam ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont un caractère lipophile qui nécessite leur encapsulation dans un corps lipidique pour augmenter leur solubilité dans le plasma sanguin et limiter leur élimination par les diverses voies de dégradation de l'organisme. La distribution des principes actifs nécessite donc de considérer plusieurs paramètres tels que la voie d'administration, la taille des particules de transport, la composition lipidique, la diffusion ou relargage des agents d'intérêt ainsi que les propriétés de surface.

Non-exhaustive or selected list of marketed medical and non-medical emulsions

Parenteral fat emulsions (o/w type) for nutrition		Registered emulsions (o/w type) containing drugs			
Product	Producer	Product	Drug	Producer	Application
Abbolipid/Liposyn	Abbott	Diazepam-Lipuro	Diazepam	Braun Melsungen	IV
Intralipid	Pharmacia-Upjohn	Diprivan	Propofol	AstraZeneca	IV
Lipofundin N/Endolipide	B.Braun	Etomidat-Lipuro	Etomidate	Braun Melsungen	IV
Lipofundin MCT/LCT/ Medialipide/Vasolipid	B.Braun	Lipotolon (Limethason)	Dexamethasone Palmitate	Merckle	Intra-arthr. IV
Medianut	B.Braun	Stesolid	Diazepam	Dumex	IV
Lipovenos	Fresenius	Sandimmune	Cyclosporin A	Novartis	Oral
Ivelip/Salvilipid	Clintec/Baxter	Neoral	Cyclosporin A	Novartis	Oral
Clinoleic	Clintec/Baxter	Gengraf	Cyclosporin A	Abbott	Oral
Intralipos	Green Gross	Norvir	Ritonavir	Abbott	Oral
Kabimix	Pharmacia-Upjohn	Restasis	Cyclosporin A	Allergan	Ocular topical use
Trivè 1000	Baxter SA	Refresh Endura	Drug-free	Allergan	Ocular topical use
		Fluad (MF59)	Adjuvant	Chiron	Parenteral use

Perfluorocarbon emulsions (fluorocarbon-in-water emulsions)			Selected topical formulations based on o/w or w/o emulsion	
Product	Producer	Application	Product	Producer
Fuosol DA	Green Gross, Osaka	Blood supplement or O ₂ carrier	Daivonex cream and ointment	Laboratoire Leo
Imagent	Alliance Pharmaceutical Corp	Contrast agent to image heart	Voltaren emulgel	Ciba-Geigy
Oxygent	Alliance Pharmaceutical Corp	Blood supplement or O ₂ carrier	EMLA cream	Astra, Swedan

Tableau 3 : Liste non exhaustive des formulations commerciales d'émulsions disponibles en 2004 sur le marché. Les émulsions à base d'huiles fluorées sont majoritairement utilisées comme sang artificiel ou agents de contraste [93].

Les émulsions peuvent pénétrer dans le corps à travers différentes voies d'administration : par voie topique (à travers la peau), par voie entérale (via le tractus gastro-intestinal), par voie parentérale (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée) et plus rarement par voie respiratoire (aérosols, inhalations). Toutes les émulsions destinées à être administrées par voie intraveineuse (parentérale) sont de type H/E et doivent être stériles, isotoniques, non toxiques, biodégradables, de tailles bien contrôlées et stables d'un point de vue physico-chimique afin de répondre aux exigences de la pharmacopée [94].

Pour les applications pharmaceutiques parentérales (IV) (cf. Tableau 3), on utilise souvent des huiles végétales en raison de leur biocompatibilité et la bonne stabilité de leurs émulsions dans le temps [92]. Les huiles végétales comme l'huile de soja sont riches en triglycérides, biodégradables et connues pour ne pas avoir de pouvoir immunogène [95]. Pour stabiliser les émulsions l'ajout de tensioactif est nécessaire. Le plus souvent des tensioactifs naturels tels que les phospholipides sont utilisés [92] cependant on trouve aussi dans les formulations commerciales des tensioactifs synthétiques non ioniques comme par exemple ceux des séries des Span, Tween ou Poloxamer [96]. Les émulsions correctement formulées restent stables pendant le stockage et ont une capacité de solubilisation des substances actives très élevée, [90].

B. Les émulsions fonctionnalisées comme un outil biophysique

Plusieurs études ont été publiées, relatives à l'utilisation d'émulsions comme outils pour comprendre ou tout du moins questionner certains phénomènes biologiques comme l'adhésion cellulaire, l'activation de lymphocytes ou la génération de forces à l'intérieur de tissus [97].

Fattaccioli *et al.* [98] ont exploré la capacité des émulsions à adhérer de manière spécifique à des surfaces modèles solides et notamment la relation entre le nombre de liens ligand-récepteur entre la goutte et le substrat et la formation d'un angle de contact macroscopique (cf. Figure 24A). Dans ces expériences, des gouttes fonctionnalisées par de la biotine et de la streptavidine adhèrent à des surfaces de verre fonctionnalisées par de la biotine. Cette fonctionnalisation peut se faire directement sur le verre [98] ou sur une bicouche lipidique fluide qui apporte de la mobilité aux ligands de la surface solide [99].

Lors de l'adhésion spécifique au substrat, l'angle de contact et l'énergie d'adhésion augmentent linéairement en fonction de la densité de liens entre la goutte et la lamelle. Les observations microscopiques ont montré qu'indépendamment de la quantité de liens, la streptavidine présente à la surface de la goutte est recrutée dans la zone de contact avec le substrat et que ce recrutement tend à créer une zone dense en protéines par seule diffusion passive bidimensionnelle (cf. Figure 24B).

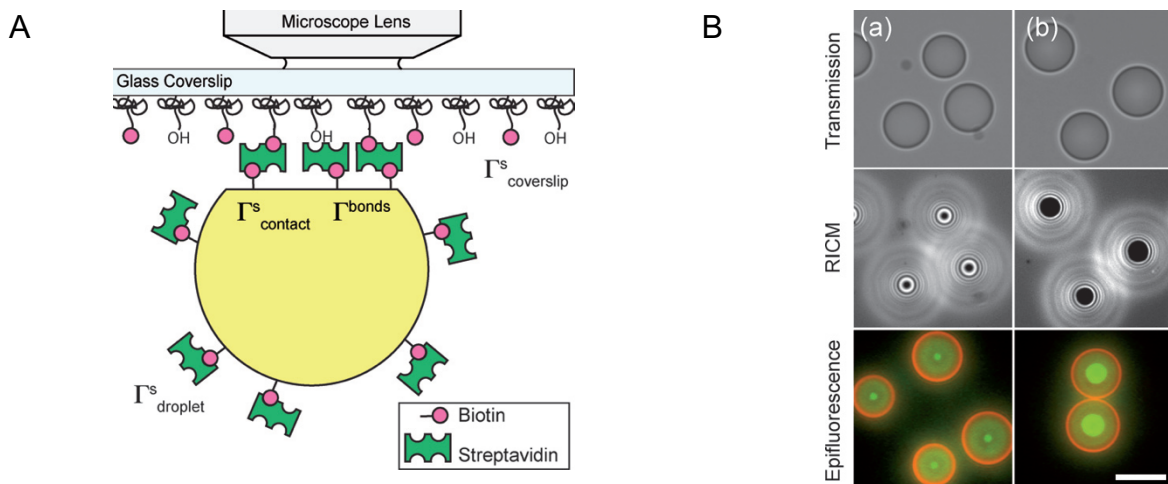


Figure 24 : (A) Schéma représentatif d'une goutte d'émulsion fonctionnalisée par des streptavidines fluorescentes et mobiles sur la surface. La goutte adhère sur une lamelle de verre avec formation d'un angle de contact [98]. (B) Images en transmission, en RICM, et en épifluorescence de gouttes d'émulsion fonctionnalisées avec de la streptavidine fluorescente (vert) et adhérentes à des lamelles de verre (a) non fonctionnalisées et (b) biotinylées. Dans les deux cas, les gouttes adhèrent au substrat avec la formation d'une zone de contact, néanmoins plus dense en (b). Échelle : 5 μm .

Bourouina *et al.* ont étudié l'adhésion entre gouttes fonctionnalisées par des molécules adhésives complémentaires [100]. Les expériences ont là encore montré que l'adhésion s'accompagne d'un recrutement des ligands dans la zone de contact. L'origine du phénomène de recrutement n'est à l'heure actuelle pas totalement élucidée, mais pourrait n'être qu'une conséquence d'un environnement physico-chimique plus favorable dans la zone de contact pour les ligands.

Les émulsions peuvent être utilisées pour des études impliquant des cellules à l'échelle de l'objet unique. En effet, Bourouina *et al.* [101] ont montré que des gouttes fonctionnalisées par des anti-CD3 pouvaient se lier et être internalisées par des lymphocytes T de type Jurkat. L'adhésion des gouttes aux cellules s'accompagne d'un recrutement des anti-CD3 dans la zone de contact qui colocalisent avec les récepteurs de la cellule. Ce recrutement est permis par la fluidité de l'interface et n'est pas observable lorsqu'on utilise des surfaces solides comme des billes de polystyrène.

Plus récemment, K. Ben M'Barek [102] dans son travail de doctorat au laboratoire de Jacques Fattaccioli s'est intéressée à la phagocytose par une lignée de macrophages, de gouttes d'émulsions fonctionnalisées par des immunoglobulines G (igG) (Figure 25).

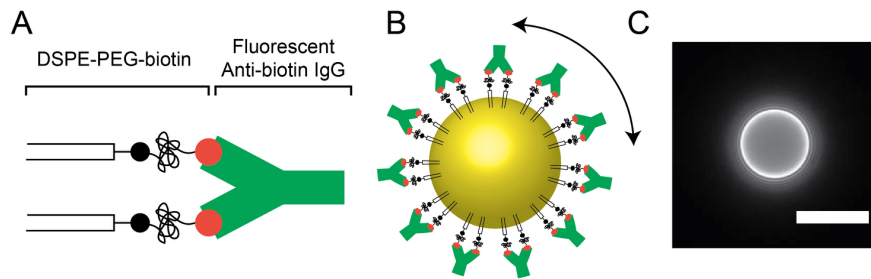


Figure 25 : Représentation schématique de la méthode de fonctionnalisation utilisée permettant d'obtenir des gouttes fonctionnalisées avec des IgGs libres de diffuser à la surface (A et B). La correcte fonctionnalisation de la surface est montrée au microscope grâce aux anticorps fluorescents [102].

Elle a notamment montré que ces matériaux sont facilement et spécifiquement internalisés par les macrophages et leur haut degré de caractérisation permet d'effectuer des mesures quantitatives des phénomènes observés.

De plus la comparaison de ces gouttes fonctionnalisées avec des particules solides fonctionnalisées de manière covalente montre que la mobilité latérale des IgGs permise par la nature fluide des gouttes a une influence sur la reconnaissance et la phagocytose par les macrophages.

En effet K. Ben M'Barek *et al.* [102] ont montré que la densité de fonctionnalisation en biotine a un impact faible sur l'internalisation des gouttes contrairement à ce qui est observé avec des billes de polystyrène (PS). Cette différence de comportement est due à une accumulation des IgGs dans la zone de contact avec le macrophage Ce recrutement permet d'avoir une concentration locale suffisante pour la phagocytose, cette diffusion latérale permettant ainsi de compenser à la dilution. Rien de tel ne se passe avec des billes de PS, pour lesquelles la fixation covalente empêche tout mouvement. Ainsi il a été montré qu'à fonctionnalisation équivalente les gouttes étaient beaucoup mieux internalisées que les billes de PS.

V. Objectifs du travail de doctorat

L'état de l'art présenté ici met en avant l'intérêt à utiliser des gouttelettes d'huile comme vecteur et plus généralement comme structure multivalente glycosylée pour la reconnaissance spécifique en biologie. À notre connaissance de telles gouttes d'huiles fonctionnalisées ne sont pas décrites dans la littérature.

Le but du projet est donc de construire une navette lipidique conçue pour être reconnue de façon spécifiquement par le système immunitaire et pour libérer ensuite in situ un composé actif. Pour cela, nous ajouterons sur les microgouttes d'huile (2 - 5 micromètres de diamètre typique), diverses molécules guidant son trajet et son destin : la microgoutte de par sa taille et ses groupes de surface va pouvoir mimer le comportement d'un microbe. Tous les éléments constitutifs ont été choisis afin que l'ensemble de l'objet et de ses constituants soit

fabricable au laboratoire en plusieurs étapes. Des microgouttes et des objets fluorescents ont été choisis dans un premier temps pour en permettre leur observation facile en microscopie optique. Dans l'application finale, la taille des gouttes sera réduite (< micron) et les fluorophores enlevés pour en faire des formulations injectables.

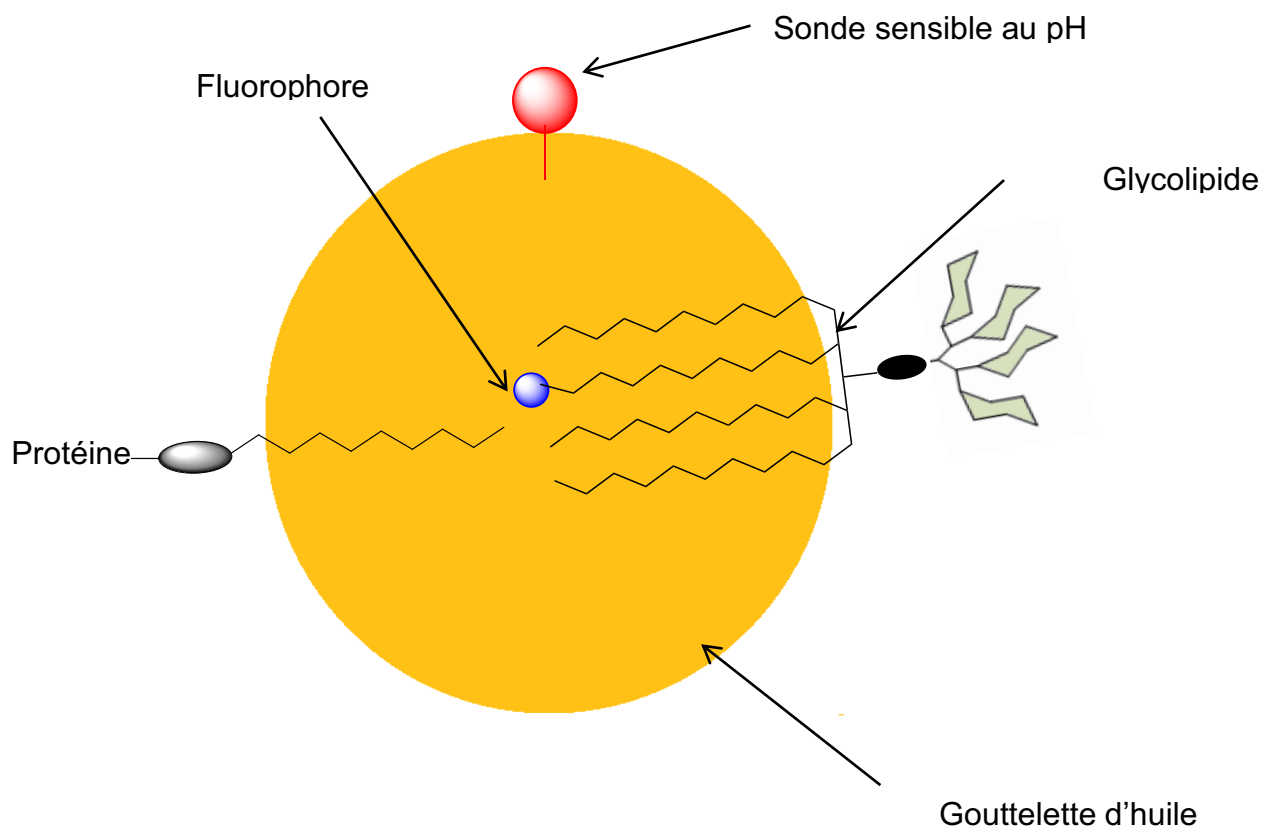


Figure 26 : schéma de la navette lipidique.

Il y aura trois constituants actifs:

- Un ligand de DC-SIGN:

Un mannoside avec un fluorophore permettant ainsi l'observation au microscope. D'autres glycolipides seront synthétisés afin de mettre en avant la spécificité de la reconnaissance lors des études en solutions.

- Une sonde pH :

L'internalisation de la goutte par les cellules du système immunitaire se fait par l'intermédiaire d'endosomes/lysosomes. Il y a alors acidification de l'environnement de la goutte (pH<6) jusqu'à la sortie des endosomes dans le cytoplasme où le pH est proche de 7. Ainsi, afin de

pouvoir suivre l'internalisation des gouttes jusqu'au cytoplasme lors des études initiales, une sonde pH simple à synthétiser avec un pKa proche de 6. Cette sonde pH aura une chaîne hydrophobe afin de pouvoir l'intégrer à la surface des gouttes.

- Enfin la « charge utile »

A cette étape, la « charge utile », un peptide, ou petite protéine est libérée dans le cytoplasme et prise en charge par les transporteurs. Cet aspect ne sera pas détaillé dans le cadre de cette thèse, l'objectif est dans un premier temps, d'utiliser la fluorescence de la goutte pour étudier plus commodément l'internalisation et le trafic intra cellulaire. L'application prévue à moyen terme est une vaccination contre HPV 16 (human papilloma virus, (collaboration avec Francois Lemoine) Les fragments de la protéine d'enveloppe du virus E7 suivants ont été proposés comme antigènes potentiels : HGDTPTLHEY, YMLDLQPETT [103].

Le but étant qu'ils soient synthétisés au laboratoire, couplés à une ancre lipidique, rendus fluorescents et utilisés dans un premier temps. L'utilisation de peptides plus longs ou de la protéine complète E7 sera aussi à considérer en comparaison.

La première partie de cette thèse traite du choix et la synthèse des différents glycolipides ainsi que des différents fluorophores. Dans une seconde partie la synthèse et la caractérisation de sondes pH seront décrites. Enfin la dernière partie est consacrée à la caractérisation des glycolipides ainsi qu'à la fabrication des gouttes fonctionnalisées et leurs études biologiques avec des lectines solubles fluorescent (ConA et PNA)

Chapitre 2 : Conception et synthèse des glycolipides

I. Le choix des structures initiales

A. Le choix des sucres

Dans le cadre de cette étude préliminaire afin que l'accessibilité des protéines et leur pureté ne soit pas un facteur limitant, nous avons retenu deux lectines modèles commerciales et vendue pures à un coût abordable: la ConA (concanavaline A) et la PNA (Peanut Agglutinin) lectines reconnaissant des monosaccharides différents: respectivement spécifique des α -D-Mannosyl et α -D-Galactosyl, permettant ainsi l'utilisation pour la validation de deux séries de glycolipides modèles basées sur le D-mannose et le D-galactose.

La première génération est basée sur des glycolipides monochaîne ne contenant qu'un seul sucre lié à une chaîne en C11: les dérivés undécyl α -D-mannoside seront les glycolipides spécifiques de la ConA, les dérivés undécyl β -D galactoside seront spécifiques de la PNA et le dérivé linéaire undécyl galactitol sera le témoin négatif pour ces deux lectines.

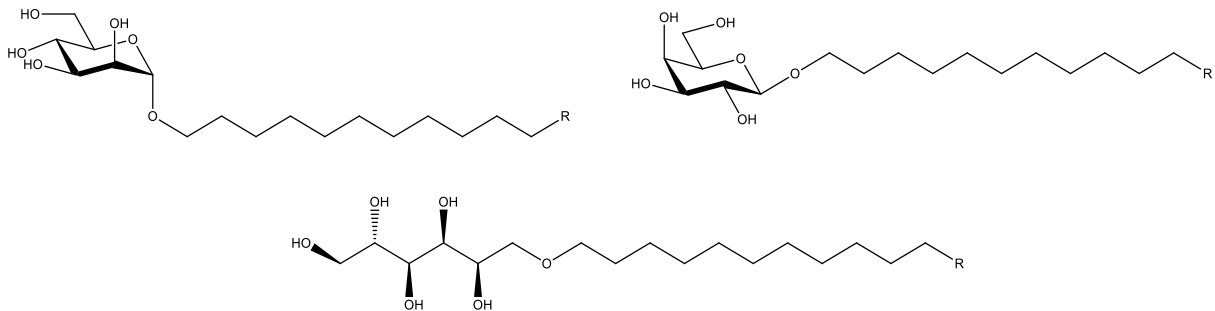


Figure 27 : mannoside, galactoside et galactitol monobrin.

B. Le choix des fluorophores

Afin de pouvoir, par la suite, suivre le devenir du glycolipide au microscope lors de la fabrication des gouttes il est nécessaire d'avoir un fluorophore. Celui-ci sera couplé en bout de chaîne alkyl du glycolipide afin de minimiser son impact sur la partie sucre. Cela impose une première condition sur le fluorophore, celui-ci doit être hydrophobe et fluorescent dans l'huile et idéalement non fluorescent dans l'eau (pour limiter le bruit de fond). L'autre limite est que la longueur d'onde d'excitation du fluorophore soit compatible avec les sources d'excitation du microscope. Nous avons présélectionné deux fluorophores classiques, le nitrobenzoxadiazole NBD (Ex/Em: 463/536) et l'acridone et deux fluorophores moins classiques qui sont le 8-alkylamino naphthalimide et le 8-alkylthio naphthalimide.

Ces fluorophores émettent dans la zone bleu - jaune et laisse la couleur rouge libre (pour la lectine par exemple), de plus, la possibilité d'avoir pour les glycolipides plusieurs fluorophores de couleurs différentes utilisables simultanément pourrait permettre de faire un

marquage spécifique (par exemple galactose en bleu, mannose en vert) et le pouvoir les étudier en même temps.

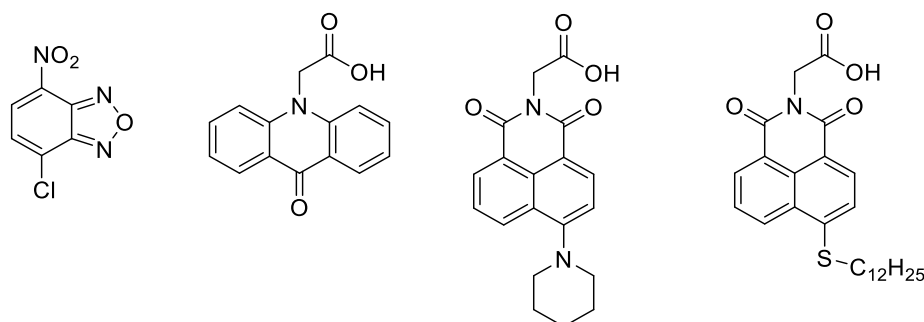


Figure 28 : Fluorophores retenus : Cl-NBD, N-carboxyméthyl acridone¹, 8-amino naphthalimide ainsi que le 8-thio naphthalimide

II. Synthèse des Monobromés

A. Synthèse des fluorophores

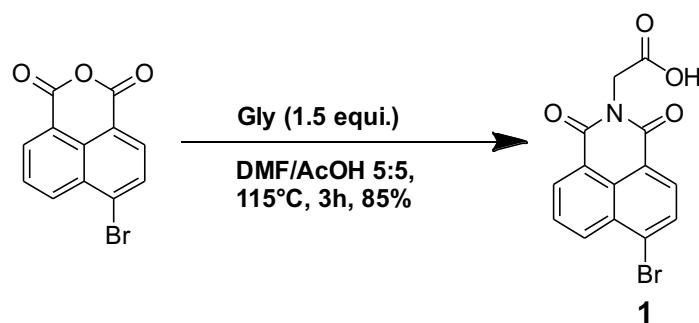


Figure 29 : S

ynthèse de l'intermédiaire commun

La synthèse des fluorophores naphthalimiques se fait avec une première étape commune à partir de l'anhydride 4-bromo-1,8-naphthalique. Cette étape consiste en la réaction de la glycine sur l'anhydride activé par de l'acide acétique dans un premier temps formant une amide intermédiaire qui est cyclisé dans un second temps par l'excès d'acide. La purification se fait par précipitation en fin de réaction par ajout d'un grand volume d'eau pour fournir **1** avec un bon rendement de 85%. [104]

La seconde étape (figure 30) pour obtenir le 4-pipéridyl-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide **2** se fait par substitution nucléophile du brome par la pipéridine utilisée à la fois comme solvant et réactif. Les cycles aromatiques subissent généralement des substitutions électrophiles et il est en général difficile de réaliser des substitutions aromatiques

nucléophiles sauf si le noyau aromatique est suffisamment appauvri en électron. Dans notre cas, trois conditions permettent de la réaliser facilement : un bon nucléophile (pipéridine), un bon groupe partant (bromure) et un groupement électro attracteur en position para du groupement partant. Le traitement de cette réaction se fait par extraction liquide/liquide avec du dichlorométhane en milieu acide (HCl 1M), permettant de séparer la pipéridine et ses sels. Un rendement de 98% est ainsi obtenu.

La formation du 4-thiododécyl-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide **3** se fait selon le même principe dans le DMF en présence de dodécylthiol. La différence par rapport à la réaction précédente est tout d'abord, un temps de réaction plus long du fait que le dodécane thiol est un moins bon nucléophile et l'utilisation d'un large excès de dodécyl-thiol obligeant, à réaliser une colonne sur silice délicate pour obtenir néanmoins un bon rendement de 85%.

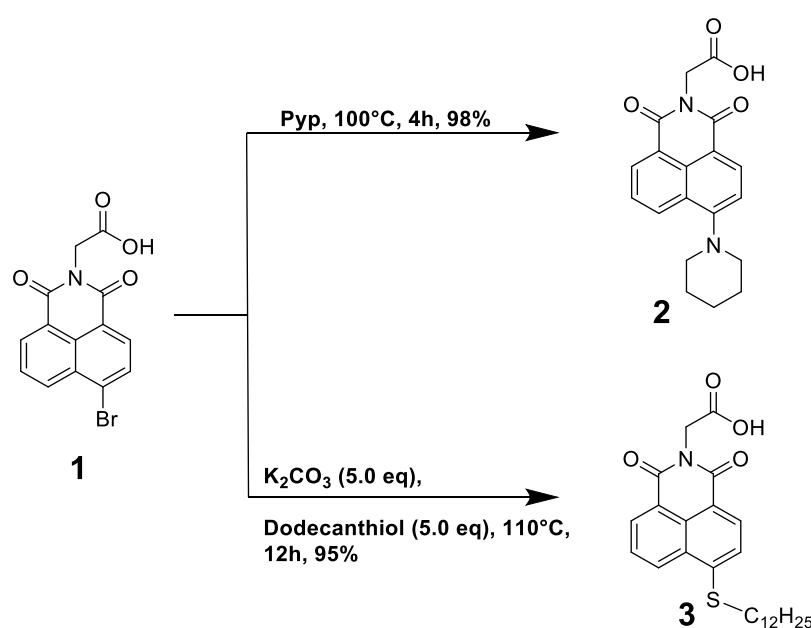


Figure 30 : Substitution nucléophile aromatique permettant d'obtenir les 8-thio et 8-amino naphthalimide.

B. Synthèse des glycolipides α -D-mannosides

La stratégie envisagée dans un premier temps pour la synthèse du glycolipide avec le fluorophore est tout d'abord de réaliser la glycosylation entre un mannose protégé et une chaîne alkyl bi-fonctionnelle puis de coupler le fluorophore par couplage peptidique. Cette approche permet d'introduire le fluorophore en dernier.

1. Synthèse de la partie glycolipide.

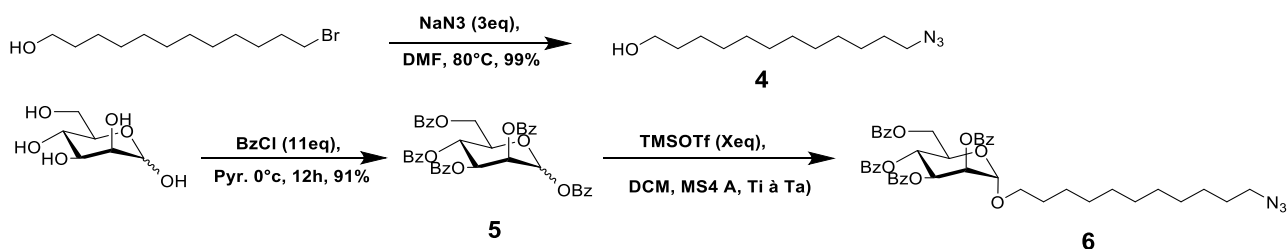


Figure 31 : Synthèse du glycolipide protégé.

Parmi les chaînes alkyl bi-fonctionnelles et longues disponibles sur le marché, nous avons choisi une chaîne en C11, d'une part la chaîne en C11 avec le fluorophore hydrophobe donne une longueur équivalente à une chaîne en C16/C18 et en plus le précurseur le 11- bromo-1-undécanol a un prix abordable. La première étape, très bien décrite dans la littérature, consiste en la substitution nucléophile du bromo par un ion azoture dans le DMF chauffé à 80°C durant une nuit et purifié par simple extraction liquide-liquide pour obtenir le 11-azido undécanol **4** avec un rendement quantitatif de 99%. [105–107]

L'introduction du sucre sur l'azido undécanol peut se faire de différentes façons. En effet il existe de nombreuses méthodes de glycosylation. Parmi celles-ci, on peut citer des méthodes reconnues telles que, les glycosylations de type Koenigs-Knorr utilisant des halogénures de glycoside, les glycosylations de Schmidt utilisant le groupement partant trichloroacetimidate, ou encore des glycosylations utilisant des donneurs stables tels que les thioglycosides. [108] La méthode retenue dans un premier temps est d'utiliser la voie la plus courte : un sucre perbenzoylé comme donneur: Ce donneur est obtenu en une seule étape et possède avec un groupement participant en C_2 nécessaire pour l'obtention de la bonne stéréochimie 1,2-*trans*.

La première étape d'une glycosylation nécessite un promoteur qui permet d'activer le groupement partant et d'obtenir l'oxocarbenium (figure 32). L'étape suivante consiste en l'attaque de l'alcool sur le C_1 avec libération d'un H^+ . En l'absence de groupement particulier ou de solvant particulier il n'y a pas de contrôle sur l'anomérisation du glycoside : une 1,2-*trans* ou une 1,2-*cis* glycosylation. Par contre la présence d'un groupement participant (un ester par exemple) en C_2 permet, comme le montre le schéma 1, d'obtenir de façon sélective une 1,2-*trans* glycosylation *via* un cycle dioxocarbenium stabilisé par effet mésomère et inducteur, qui bloque la face *syn*. L'ouverture de l'intermédiaire cyclique est de type 1,2-*trans* favorisant la formation de l'un ou l'autre anomère selon la stéréochimie du carbone C_2 .

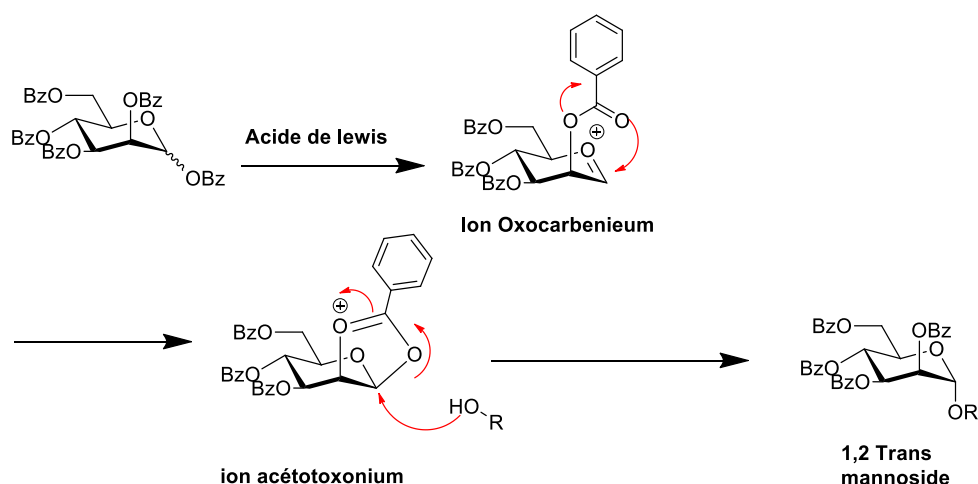


Figure 32 : Mécanisme d'une glycosylation avec groupement participant.

L'étape de glycosylation entre le donneur mannose perbenzoylé **5** et le 16-azido undecanol **4** se fait en présence de TMSOTf (puissant acide de Lewis) et de tamis moléculaire pour éviter l'hydrolyse du donneur. Cependant malgré plusieurs conditions opératoires, où la température et la quantité d'acide de Lewis ont été modifiées (figure 33) le rendement reste médiocre avec un maximum de 37%. Nos observations ont montré que la réaction est lente avec de l'hydrolyse/dégradation du donneur et sans doute du produit dans le temps ce qui plafonne le rendement et qui est expliqué par le fait que le donneur est très désactivé.

Eq de TMSOTf	Ti (°C)	Rdt
0,2	0°C	20%
1	0°C	37%
1	ta	15%

Figure 33 : Condition opératoire de la glycosylation avec le mannose per benzoate

L'alternative est d'utiliser un thioglycoside déjà utilisé au laboratoire et obtenu [109] en une étape à partir du mannose perbenzoate **5** en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ avec un rendement de 90% (figure 31). Le *tert*-butyl méthyl thiophénol a été développé au laboratoire comme alternative sans odeur et peu toxique au thiophénol.

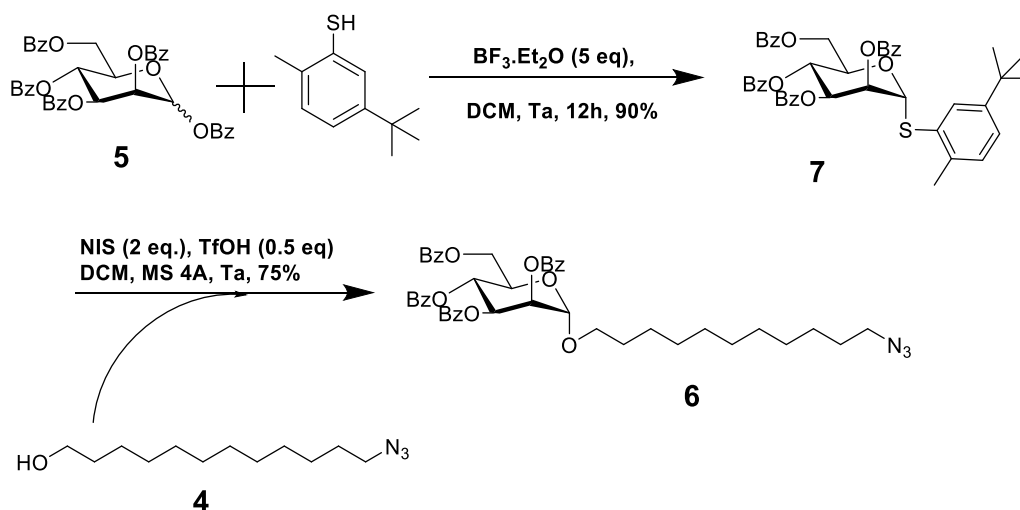


Figure 34 : Synthèse du thioglycoside et glycosylation.

La glycosylation avec l'azido undécanol **4** se fait en présence de N-iodo succinimide (NIS) et d'acide trifluorométhane sulfonique. L'ion iodonium formé réagit sur le soufre et l'intermédiaire sulfonium se fragmente pour donner l'ion oxocarbenium. Dans ces conditions la glycosylation se fait avec un bon rendement de 75%. Le rendement de ces deux étapes est de 68% bien meilleur que les rendements de glycosylation obtenus précédemment avec le donneur perbenzoate.

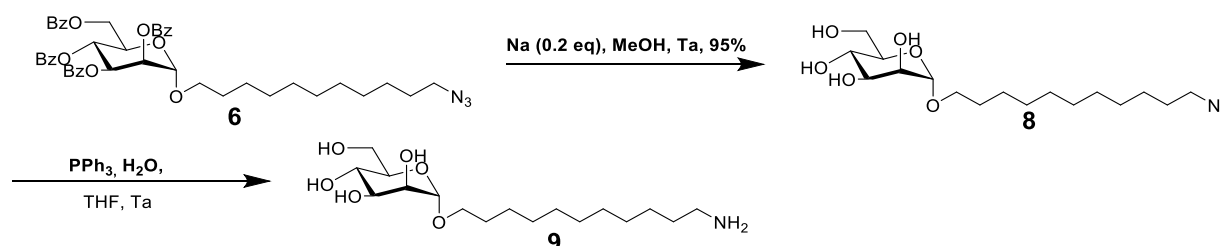


Figure 35 : déprotection et hydrogénation avant couplage avec les fluorophores.

La déprotection des hydroxyles du mannoside **6** se fait dans les conditions de Zemplén avec un rendement de 95% après purification sur colonne. La dernière étape consiste en la réduction de l'azido de **8** par de la triphényl phosphine et d'eau dans le THF pour obtenir l'amino undécyl α -D-mannoside **9**. Compte tenu de la polarité de ce produit, il n'a pas été possible de le purifier sur gel de silice en phase normale et en phase inverse. Étant donné que la triphényl phosphine et l'oxyde de triphényl phosphine sont inertes pour l'étape suivante le brut est engagé directement dans la suite.

2. Couplage avec les fluorophores.

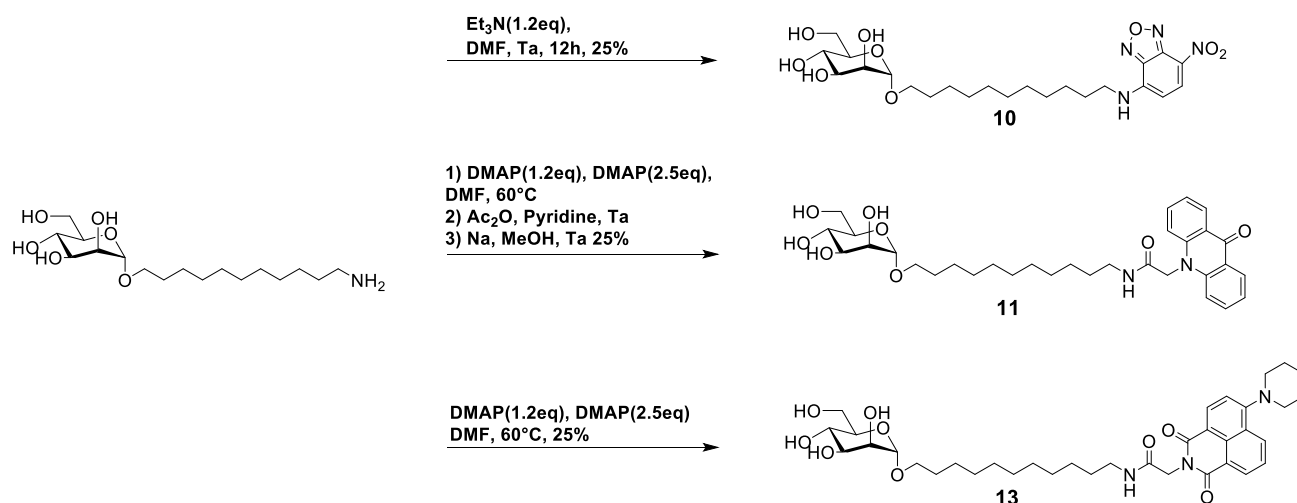


Figure 36 : Réaction de couplage entre l' amino undécyl mannoside

Le couplage de l' amino undécyl mannoside **9** avec le 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (chloro-NBD) se fait en présence de triéthylamine dans le DMF, la réaction n'est pas complète et a donné un rendement faible de 25% après purification.

Le couplage avec la N-carboxyméthyl acridone s'est faite en présence de DMAP et d'EDC et présente de nombreux sous-produits dont un est issu du réarrangement de l'EDC avec le fluorophore. Nous n'avons pas pu séparer le produit formé des nombreux sous-produits sur gel de silice à cause de la forte polarité des molécules formées. Nous avons préféré acétyle le mélange en présence d'anhydride acétique et de pyridine pour pouvoir ainsi purifier les acétates moins polaires. Le produit isolé après colonne est désacétylé dans les conditions de Zemplén puis neutralisé à l'IR120 sans qu'aucune purification supplémentaire ne soit nécessaire. Le rendement moyen de 39% est expliqué par les nombreux sous-produits ainsi que par les deux étapes supplémentaires nécessaires à la purification.

Le couplage de la 4-pipéridyl-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide **2** avec l' amino undécyl mannoside **9** a été fait dans les mêmes conditions et avec les mêmes problèmes pour donner **12** avec un rendement modeste de 25%.

Pour ces trois produits, la quantité obtenue étant suffisante pour les premières évaluations, les étapes de couplage n'ont pas été optimisées comme il sera expliqué dans le prochain chapitre.

C. Synthèse du glycolipide β -D-galactoside

1. Synthèse de la partie glycolipide

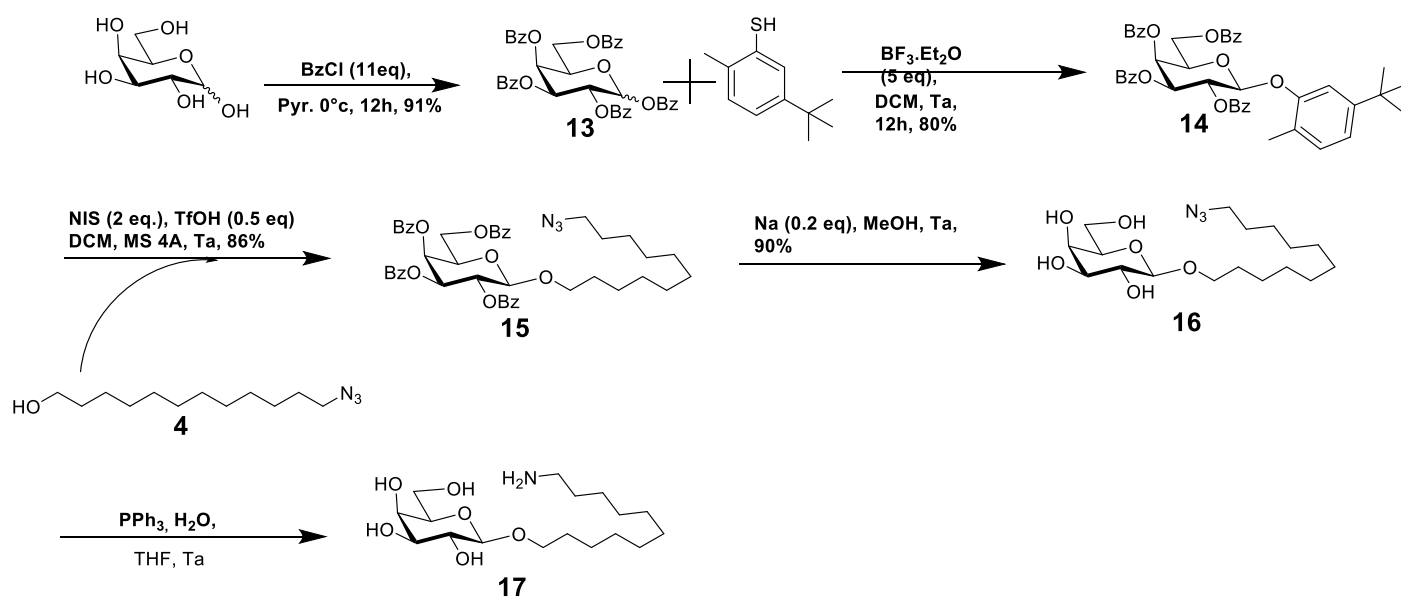


Figure 37 : Synthèse du galactolipide sans fluorophore

La synthèse du galactolipide est réalisée par une méthode de synthèse similaire. Du D-galactose commercial est perbenzoylé avec du chlorure de benzoyle dans de la pyridine puis l'aryl thiogalactoside **14** est obtenu en faisant réagir le galactose perbenzoate **13** avec 2-méthyl-5-tert-butylthiophénol en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.

La glycosylation est réalisée par l'activation de ce thiogalactoside **14** en présence de 11-azidoundécane **4** par NIS et TfOH, puis les hydroxyles du azidoundécyl α -D-galactoside **15** sont déprotégés dans les conditions de Zemplén. Enfin l'azoture **16** est réduite en amine (non purifiable comme pour le mannolipide) qui est engagée directement dans l'étape suivante.

2. Couplage avec le fluorophore : premiers essais

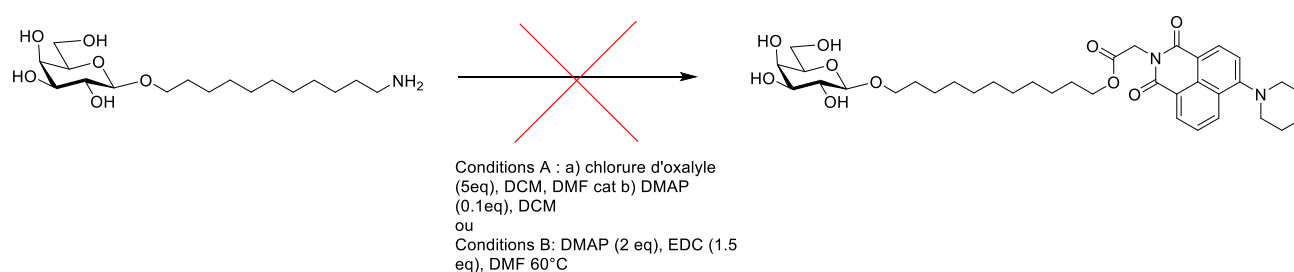


Figure 38 : Réaction de couplage avec le fluorophore naphthalimique

Le couplage de l'aminoundécyl β -D-galactoside **17** avec le fluorophore naphthalimique **2** en utilisant de l'EDC et de la DMAP fournit comme pour le mannolipide, de nombreux sous-produits dont le produit de réarrangement avec l'EDC. Les tentatives de couplages en deux étapes en activant d'abord l'acide carboxylique en chlorure d'acide (préparé par du chlorure d'oxalyle) puis mise en contact avec l'amine en présence de DMAP ne donne pas le produit désiré mais donne entre autre l'anhydride de l'acide carboxylique de départ.

Devant les problèmes répétés rencontrés pour les couplages amide, une nouvelle stratégie de synthèse est envisagée pour le couplage avec le fluorophore: une approche par 'click-chemistry CuAAC.

3. Couplage alternative par chimie click

Depuis sa description en 2001 par K.B. Sharpless [110], la chimie « click » suscite beaucoup d'intérêt. Il s'agit d'un concept représentant un ensemble de réactions ayant ces spécificités : de hauts rendements, une grande stéréospécificité, avec obtention de sous-produits éliminables par des méthodes non chromatographiques, et facile à mettre en œuvre.

a) Cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne azoture (AAC)

Les azotures ont une grande stabilité envers une grande quantité de conditions opératoires en synthèse organique, cependant ils ne font que peu d'apparitions en synthèse avant le développement de la chimie « click ». Avant cela leur principale utilisation était l'introduction d'un atome d'azote dans une molécule via une azidation (S_N2 avec NaN_3 par exemple comme nous l'avons fait) puis une réduction en amine. Cela peut s'expliquer par un manque de sécurité lors de leurs manipulations. Effectivement les azotures métalliques sont sensibles aux chocs et certains azotures organiques sont aussi explosifs. De façon pratique, l'azoture de sodium est aussi toxique mais présente peu de danger quand il est manipulé correctement et tant qu'il n'est pas mis en contact avec de l'acide qui entraînerait la formation de HN_3 , un gaz très toxique.

Huisguen [111] a augmenté sa notoriété [112–114] en découvrant une nouvelle réaction en 1962 : une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne pour former un 1,2,3-triazole. Dans ses conditions, le système doit être chauffé à de hautes températures (140°C) entraînant une faible régiosélectivité avec un mélange de 1,4 et 1,5 triazoles.

Une variante de cette réaction, appelée « Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAC), fait son apparition en 2002 parmi les réactions « click ». Elle utilise une catalyse au cuivre I pour diminuer l'énergie d'activation de la réaction de telle sorte que cette dernière se réalise à température ambiante [115] (Figure 39).

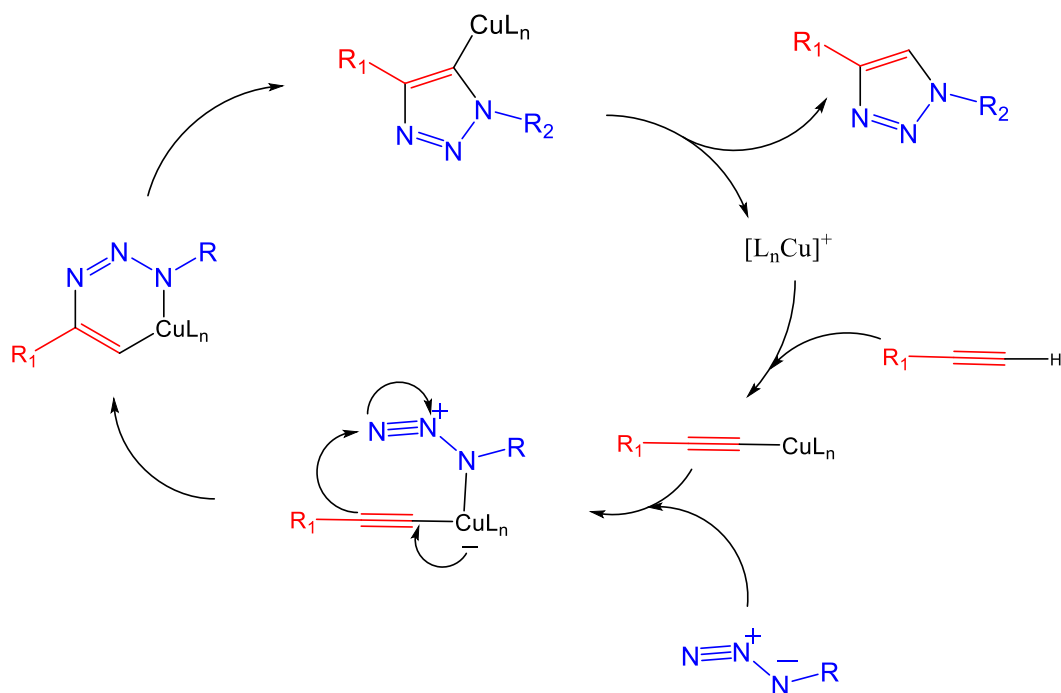


Figure 39 : Mécanisme de la CuAAC

Bien que seul le cuivre I soit catalytiquement actif, différentes sources de cuivre peuvent être utilisées, à savoir du Cuivre 0 en présence de sulfate de cuivre, ou du Cuivre I (CuI) en présence d'une base (Et_3N , pyridine, $iPrEt_2N$) sous atmosphère inerte, ou du Cuivre II ($CuSO_4$, $Cu(OAc)_2$) en présence d'un réducteur tel que l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium pour obtenir l'état d'oxydation du cuivre. [116]

La réaction catalysée au cuivre présente l'avantage de donner un seul triazole contrairement à la réaction thermique. Les conditions et les solvants utilisables sont adaptés à nos molécules polaires et amphiphiles.

b) Utilisation pour le mannolipide et galactolipide

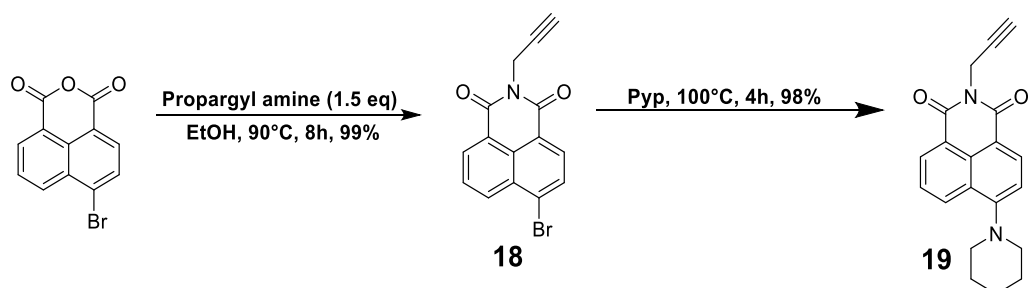


Figure 40 : synthèse du 4-pipéridinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide

La stratégie par CuAAC nécessite de préparer un nouveau bloc fluorophore 8 – amino naphthalimide avec une connectique propargyl. La stratégie est de faire réagir de la propargyl

amine sur l'anhydride 4-bromo-1,8-naphthalique dans l'éthanol à reflux pour donner la 4-bromo-N-propargyl-8-naphthalimide, purifiée par simple extraction liquide-liquide pour donner un rendement quantitatif de 99%. La seconde étape est la substitution nucléophile aromatique comme décrit précédemment dans la pipéridine comme solvant à chaud.

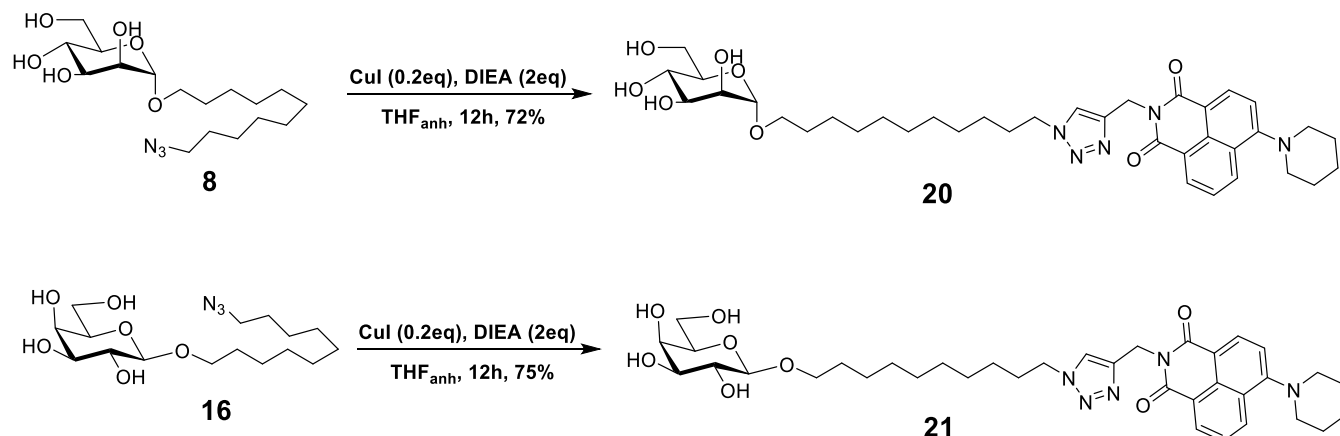


Figure 41 : Réaction de click pour introduire le fluorophore

Les conditions pour la réaction CuAAC décrites dans la littérature sont très diverses, avec des résultats variables et il est difficile d'y faire son choix. Les produits n'étant pas solubles dans l'eau, il nous faut utiliser un solvant organique compatible. L'utilisation de CuI comme source de cuivre (I) en présence de DIEA comme base est probablement l'une des méthodes les plus décrites dans la littérature et donnant de bons résultats.

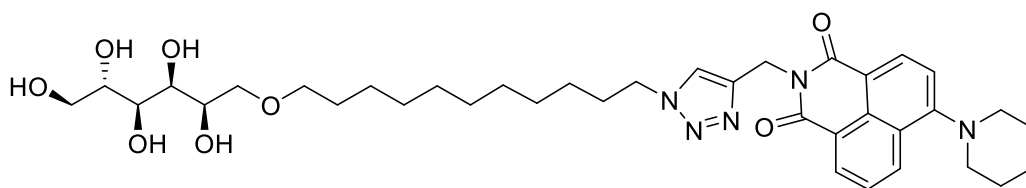
Pour les deux glycolipides **8** et **16**, nous avons fait réagir les azidoundécyl glycosides en présence de CuI et DIEA dans du THF anhydre sous argon avec un excès de 4-pipéridinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide **2**. Des rendements d'environ 75% sont obtenus, avec l'observation d'un homocouplage du 4-pipéridinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide **2**, connu sous le nom de la réaction de Glaser, qui n'a pu être évité malgré l'atmosphère inerte. Le cuivre est facilement éliminé par lavage avec une solution de Na₂H EDTA à 1M.

Cette voie est plus courte et donne de bien meilleurs rendements que la voie couplage amide. Il faut noter que les triazoles sont très peu basiques et ne seront protonés qu'à pH inférieur à 2. Dans les conditions normales d'utilisation, le bras et le fluorophore restent neutres

D. Synthèse du glycolipide galactitol

Nous avons choisi comme témoin négatif, un sucre ouvert, un itol, il possède la polarité d'un mannose ou galactose, mais étant flexible, il ne sera pas reconnu par des lectines.

Pour des raisons de facilité de synthèse, nous avons choisi un dérivé du galactitol (figure 39).



22

Figure 42 : Témoin négatif : 6-O-((11azido undécyl)oxy, 4-pipéridine-N-propargyl-1,8-naphtalimide)Galactitol.

La stratégie de synthèse est de partir du D-galactose, dont les positions C₁, C₂, C₃ et C₄ sont protégées sélectivement par des isopropylidènes. Le 1,2:3,4-di-O-isopropylidène- α -D-galactopyranose [117] **23** est ainsi obtenu aisément par le traitement du D-galactose en présence d'acide sulfurique concentré dans l'acétone (figure 43) Dans ce dernier composé, l'hydroxyle de la position 6 du sucre est la seule libre et réactive.

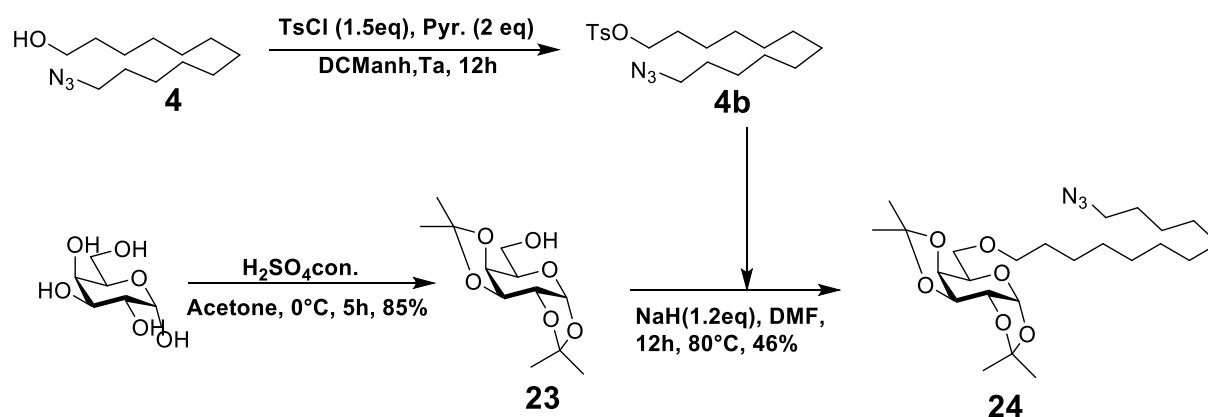


Figure 43 : Synthèse du 1,2:3,4-di-O-isopropylidène- 6-azidoundécyl-- α -D-galactopyranose

La fonction alcool du 11-azido undécanol est converti en tosylate afin d'en faire un groupement partant [118]. La condensation de ce tosylate sur 1,2:3,4-di-O-isopropylidène- α -D-galactopyranose **23** se fait en présence de NaH dans le DMF et donne le composé attendu **24**. Le rendement moyen obtenu (46%) pour cette étape est dû au manque de réactivité du tosylate, des réactions d'éliminations et d'hydrolyse du tosylate.

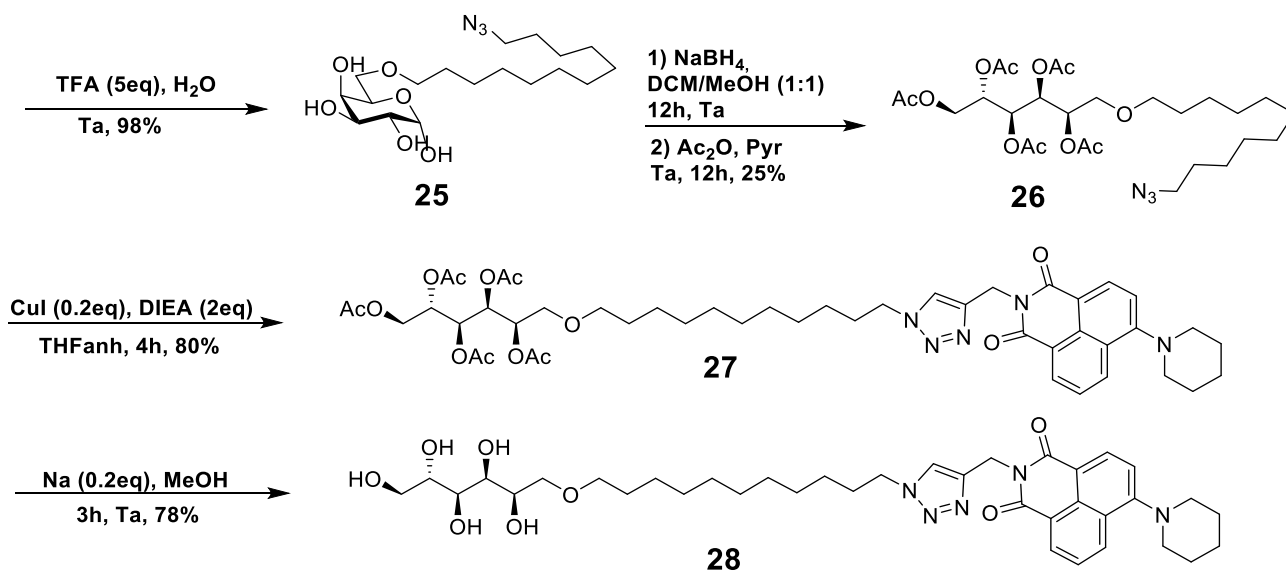


Figure 44 : synthèse du galactitol désiré **28**

Le 1,2:3,4-di-O-isopropylidène-6-O-(11-azido-undécyl)- α -D-galactopyranose **24** est ensuite déprotégé en présence de un mélange acide trifluoroacétique et d'eau pour donner 6-O-(11 azido undécyl)- α -D-galactopyranose **25** avec un rendement de 98%. Celui-ci est d'abord traité avec du tétrahydruroborate de sodium puis les fonctions alcools sont acétylées pour pouvoir permettre la purification sur gel de silice pour donner **26** avec un rendement de 25% sur deux étapes. Le glycolipide est ensuite couplé avec le fluorophore par click en présence de CuI et DIEA et purifié par colonne puis enfin désacétylé pour fournir le produit désiré **28**.

III. Évolution de la structure de base : un raft de glycolipide

A. Choix de la structure

Les structures monobrans décrites présentent l'avantage d'être plus facile d'accès que des structures multivalentes. Cependant ces structures présentent l'inconvénient de devoir saturer la surface des gouttes pour avoir une densité locale suffisante pour induire une bonne reconnaissance de la goutte par les lectines.

L'utilisation d'une structure multivalente, permettrait d'obtenir des concentrations locales en sucre supérieures, permettant ainsi d'avoir, a priori, une reconnaissance plus efficace par les lectines à concentration en sucre bien inférieure.

Nous avons retenu une structure « pieuvre » en reliant 6 glycolipides sur un répartiteur gallamide / polyéthylène amine, contenant le fluorophore (figure 45).

Dans cette molécule, nous avons voulu garder les mêmes glycolipides que précédemment avec les chaînes en C₁₁ et ajouter un cœur fluorescent et hydrophobe qui sera enfoui dans la gouttelette.

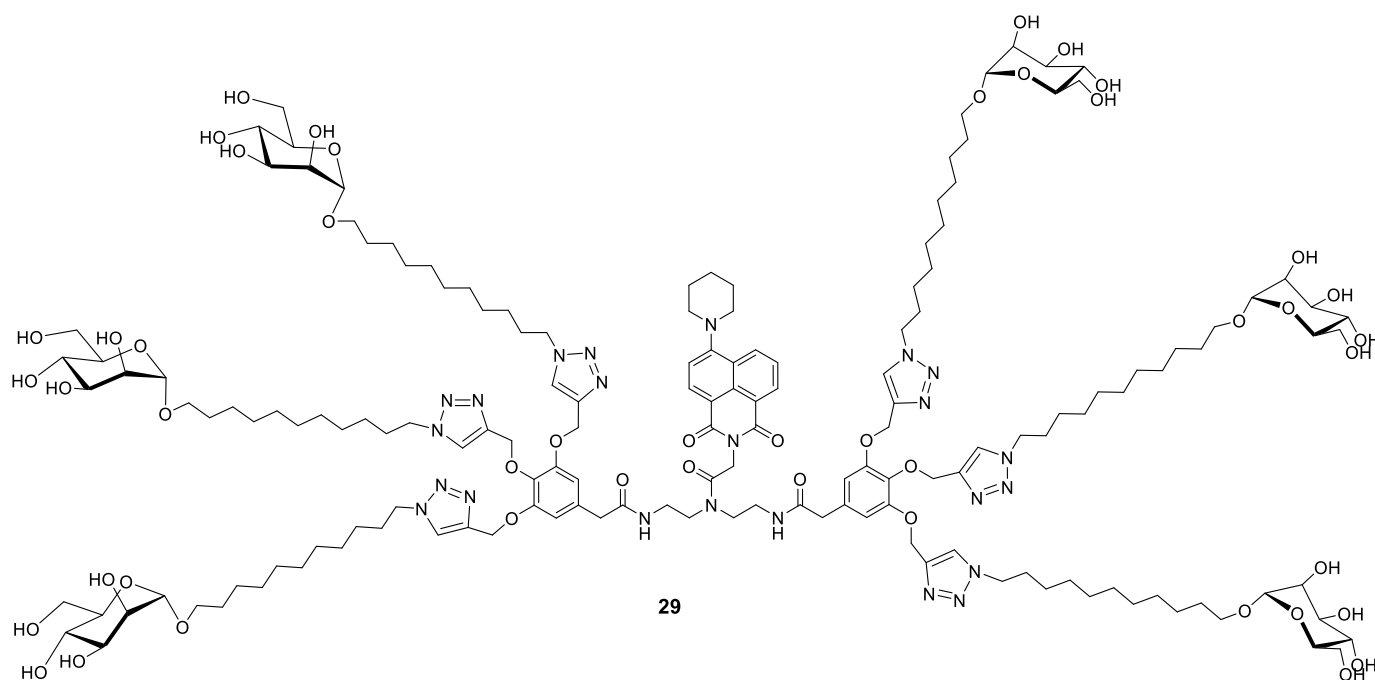


Figure 45 : Raft de mannose

B. Synthèse du raft

La stratégie envisagée pour synthétiser la molécule souhaitée est, dans un premier temps, de former l'azidoundécyl mannoside déjà synthétisé précédemment et dans un deuxième temps, de synthétiser le répartiteur polygallamide / polyéthylène amine, contenant un fluorophore, pour ensuite les faire réagir ensemble par chimie click.

1. Synthèse du squelette

La formation du squelette de polyéthylène amine contenant les deux gallamides à chaque extrémité **31** se fait en 3 étapes.

La première étape consiste à faire réagir le gallate d'éthyle (commercial) avec du K_2CO_3 pour déprotoner les phénols, en présence d'éther 18-crown-6 pour solubiliser K_2CO_3 dans l'acétone. Puis l'ajout du bromure de propargyle permet d'obtenir par substitution électrophile l'acide 3,4,5-tris(prop-2-yn-1-yloxy) benzoïque **30** après saponification de l'ester éthylique dans l'éthanol en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1M. [119]

La deuxième étape plus délicate car il faut réaliser un couplage amide sélectif des amines primaires de la diéthylènetriamine sans coupler sur l'amine secondaire centrale sans que cela se fasse trop au détriment du rendement.

Traditionnellement ces couplages peptidiques se font avec un excès d'un des deux réactifs pour optimiser le rendement. Cependant dans notre cas l'utilisation d'un excès de l'acide **30**

ou de la diéthylènetriamine risque de donner majoritairement le produit monocouplé ou tricouplé. Nous avons ici utilisé les proportions stœchiométriques 0,5 équivalent de diéthylènetriamine par équivalent d'acide **30** et l'optimisation de la réaction se fait alors sur les réactifs de couplages.

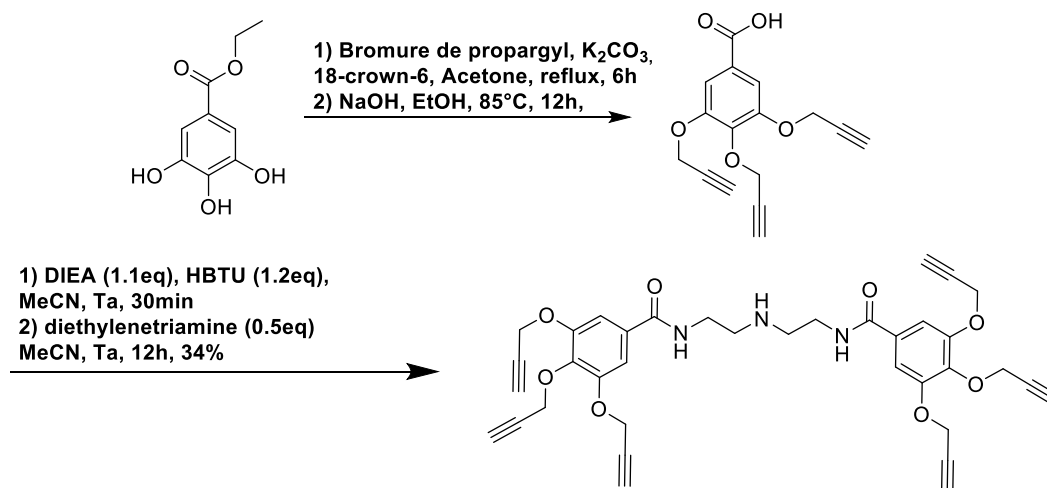


Figure 46 : Synthèse du di-gallamide avec squelette de polyéthylène amine

Plusieurs conditions de réactions ont été testées. La première méthode utilisée a été l'utilisation d'anhydride mixte. L'anhydride mixte intermédiaire est obtenu grâce à la NMM et le chloroformiate d'isobutyle dans le THF, puis l'ajout de l'amine dans un second temps mais les produits obtenus étaient difficilement caractérisables par RMN, et ne contenaient pas la molécule recherchée **31**. L'utilisation d'EDC ou de DCC dans la pyridine sous reflux, n'ont pas été efficaces, dans chaque cas, le produit de réarrangement avec l'EDC ou la DCC a été obtenu.

Du fait de la difficulté à réaliser le couplage peptidique avec des réactifs classiques, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'agents de couplage plus sophistiqués. L'utilisation d'HBTU et de DIEA largement décrite dans la littérature pour les peptides a été retenue [120]. La réaction se fait en deux temps (figure 47), tout d'abord la base (DIEA) déprotone l'acide carboxylique, l'anion carboxylate obtenue attaque le carbone électro déficient du HBTU. L'anion du HOBt nouvellement formé réagit avec l'acide carboxylique activé obtenu pour donner un ester activé. Dans un second temps lors de l'ajout de l'amine celle-ci réagit avec l'ester activé pour donner l'amide désiré.

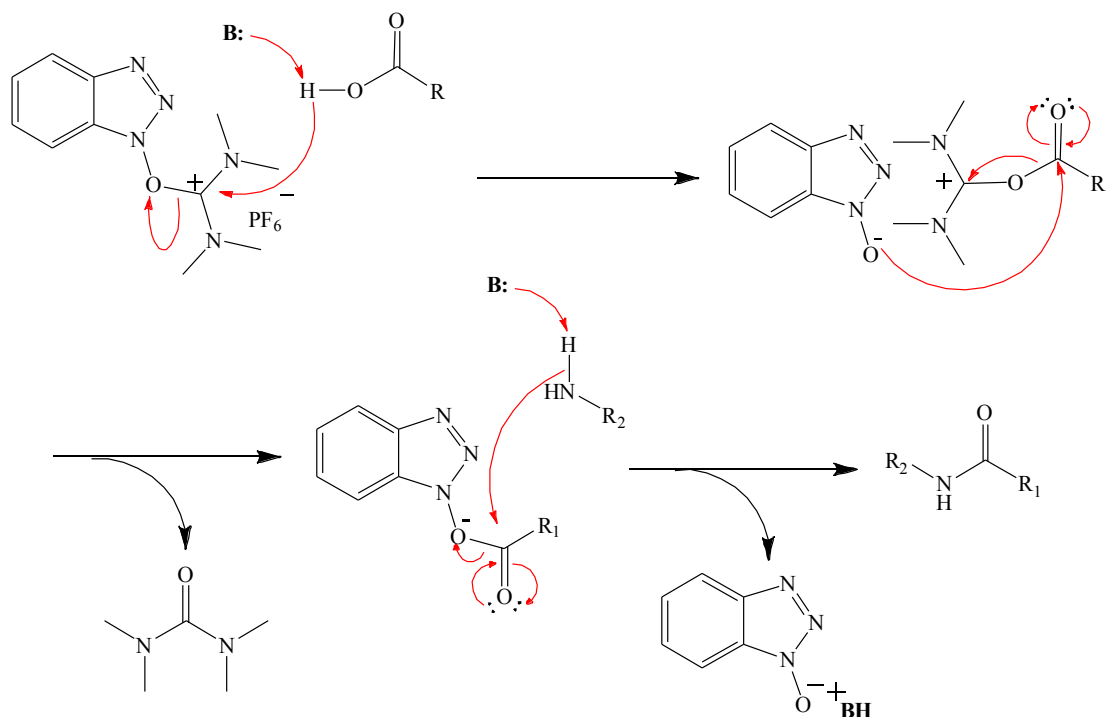


Figure 47 : Mécanisme du couplage peptidique avec HBTU et DIEA

La réaction bien que longue (12h) permet d'obtenir majoritairement le produit diacylé désiré avec un rendement raisonnable de 34% compte tenu de la sélectivité désirée.

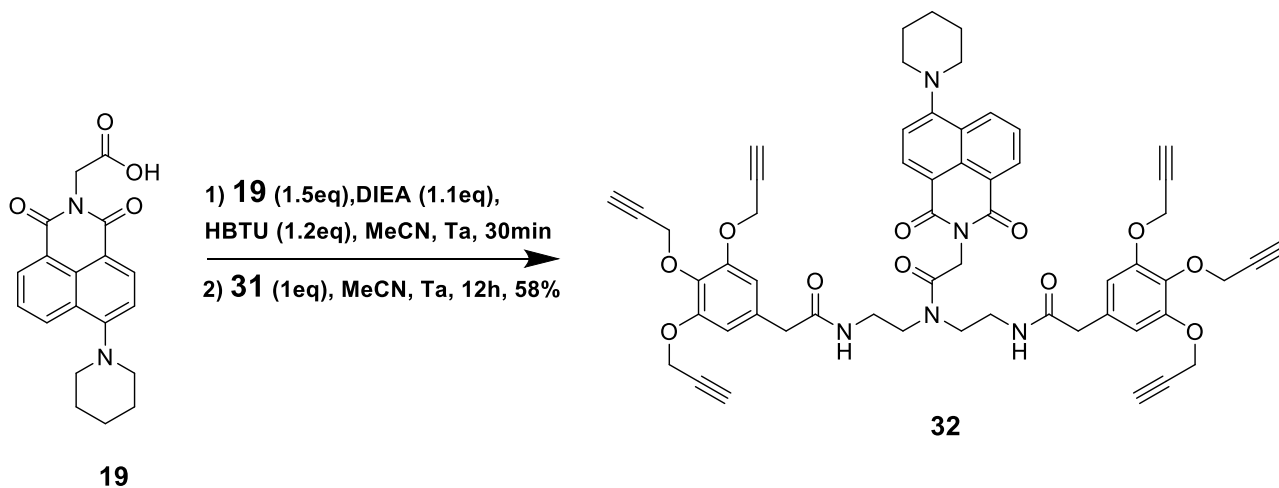


Figure 48 : Couplage peptidique pour l'introduction du fluorophore.

L'introduction du fluorophore naphthalimide **19** se fait dans les mêmes conditions que l'étape précédente donnant un rendement meilleur de 58%, cela étant dû à l'utilisation d'un excès de 4-pipéridinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide **19** possible dans cette étape.

2. Étapes finales

Le couplage entre la partie cœur **32** et les 6 azido undécyl mannosides **6** se fait par chimie « click » (figure 46) en présence de CuI et de DIEA dans le THF pour donner après purification sur gel de silice un rendement de 62%.

L'utilisation de 9 équivalents de **6** peut paraître important compte tenu du nombre d'étape de synthèse pour l'obtenir, cependant ces équivalents (9 eq) mis en regard du nombre de fonctions propargyles disponibles (6 fonctions) nous ramènent à un ratio de 1,5 qui est acceptable. Le rendement de 62% obtenu peut paraître moyen, cependant celui mis en regard du nombre de fonctions propargyles nous donne un très bon rendement d'environ 92% par fonction. Il a déjà été observé dans la littérature que la proximité d'alcynes pouvait provoquer une coordination du cuivre I et saturer rapidement celui-ci. Le complexe formé est alors très stable permet d'empêcher l'azoture de se lier au cuivre I amenant un rendement médiocre voir nul de la CuAAC. Cette complexation du cuivre favorisant alors les réactions d'homocouplage et l'oxydation des alcynes [121,122].

La dernière étape consiste à débenzoyler les sucres dans les conditions de Zemplen pour donner la molécule **33** désirée avec un rendement de 89%. Compte tenu de la polarité de **33** et de sa solubilité dans les solvants organiques usuels celui-ci ne peut être purifié sur gel de silice. Cependant compte tenu de la différence de masse entre **33** (3208 g/mol) et le benzoate de méthyle (136 g/mol) formé, la purification a pu se faire par exclusion stérique sur une colonne de LH20 en éluant avec un mélange DCM/MeOH 5:5.

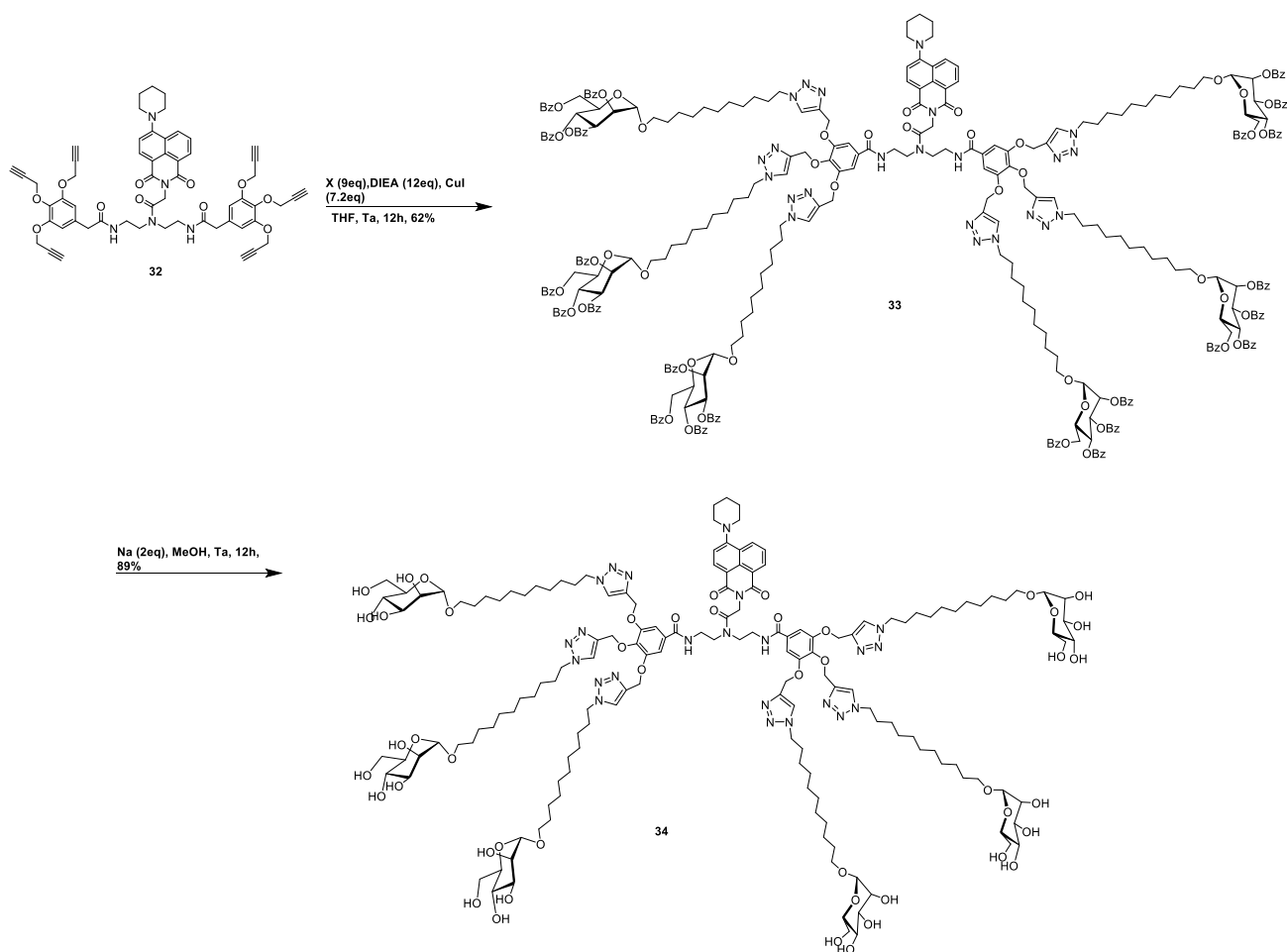


Figure 49 : Fin de la synthèse : couplages et déprotection des sucres.

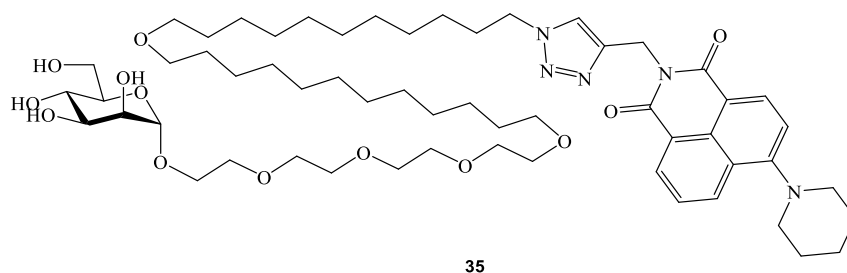
IV. Synthèses de composés d'intérêts non abouties.

A. Synthèse d'un glycolipide mono chaîne avec un espaceur PEG

Qu'il s'agisse de particules solides, de surfaces planes, de liposomes, ... dès qu'il s'agit d'objets décorés par des glycolipides pour de la reconnaissance par des lectines il est souvent décrit [123–125] que l'utilisation d'un espaceur type PEG améliore la reconnaissance de l'objet par des lectines. Il est important de constater que la longueur de cet espaceur n'est pas sans influence sur la reconnaissance [124,126]. En effet la reconnaissance augmente avec la longueur du PEG jusqu'à 4 - 6 unités puis diminue rapidement pour finalement n'obtenir plus aucune reconnaissance pour des PEG1000 et PEG2000.

Dans des interactions multivalentes, la rigidité de l'objet compte beaucoup et pour des structures très mobiles, comme des groupes au bout de PEG, la variation d'entropie au cours de l'interaction multivalente peut être très défavorable à la liaison (il faut immobiliser beaucoup de liaisons flexibles) [127].

Nous avons voulu tester cette option, avec la molécule suivante.



35

Figure 50 : Mannolipide avec un espaceur PEG400

Dans le cadre du projet il a été choisi un PEG avec 4 unités, longueur optimale décrite dans la littérature, la chaîne alkyle a été rallongée de 12 carbones (figure 50) afin de compenser l'ajout d'une grosse partie hydrophile.

La stratégie de synthèse retenue se fait en deux temps tout d'abord la partie PEG-alkyl est préparée avant d'y intégrer le mannose et le fluorophore.

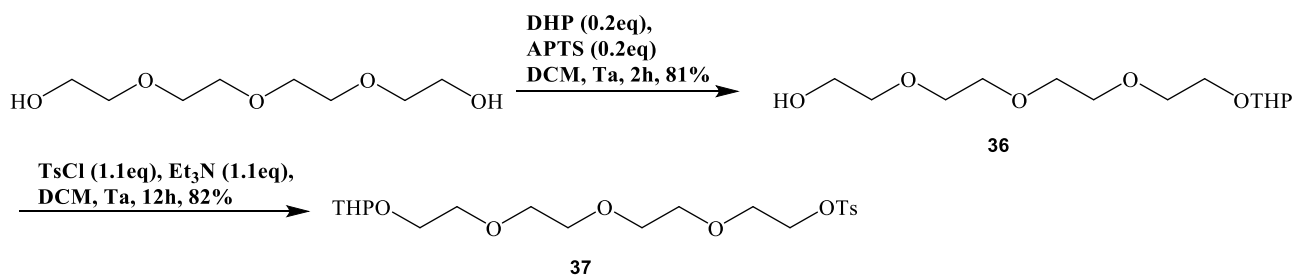


Figure 51 : Synthèse du bloc PEG

Afin d'obtenir la partie PEG-Alkyl, le tétraéthylène glycol commercial est protégé sélectivement par un éther de tétrahydropyranyl par du dihydropyrane en milieu acide (APTS) [128], donnant quasi exclusivement le tétraéthylène glycol **36** monoprotégé. Cette sélectivité est permise grâce à l'utilisation d'un large excès de tétraéthylène glycol par rapport au DHP. La fonction alcool résiduelle est convertie en tosylate [129] afin d'en faire un groupement partant **37**.

D'autre part, le second bloc **38** est préparé :

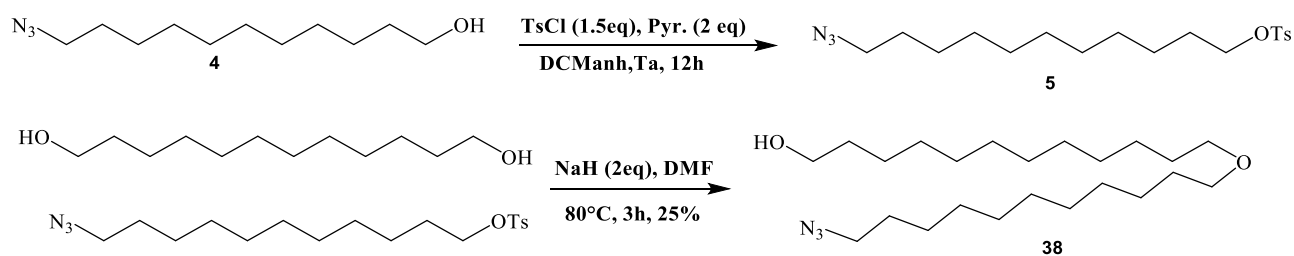


Figure 52 : Synthèse de la chaîne alkyle

La fonction alcool du 11-azido undécanol est convertie en tosylate afin d'en faire un groupement partant [118]. La condensation de ce tosylate sur le 1,12 – dodécanediol se fait en présence de NaH dans le DMF et donne le composé attendu **38** avec un rendement de 25%.

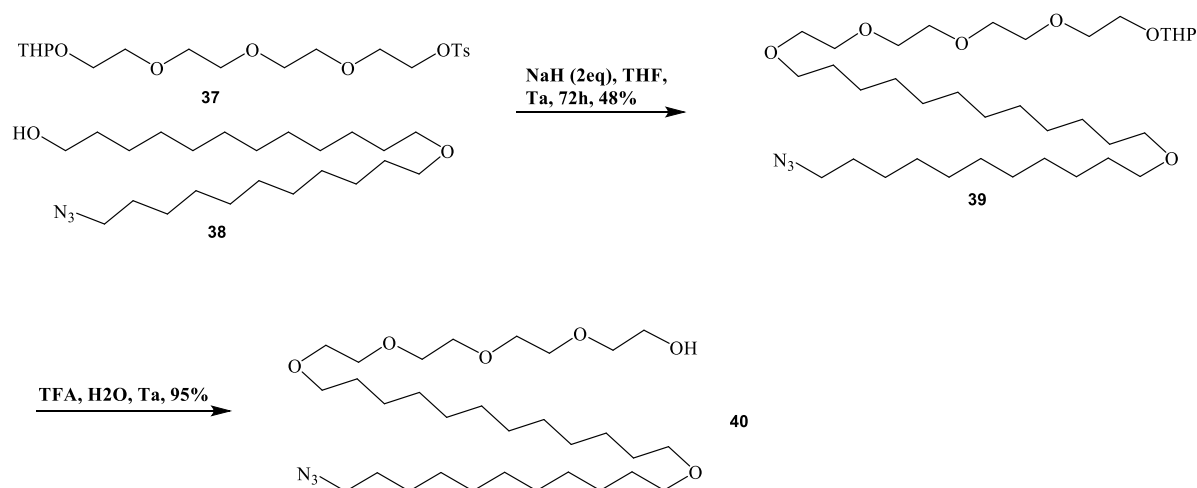


Figure 53 : Condensation de **37** sur **39**

La condensation de **37** sur **38** se fait en présence de NaH dans le THF à température ambiante (figure 50). L'avantage de ces conditions opératoires est de limiter les réactions secondaires d'élimination que le DMF à chaud favorise, cela cependant au détriment du temps de réaction (72h).

L'alcool **40** étant prêt pour l'étape suivante la glycosylation

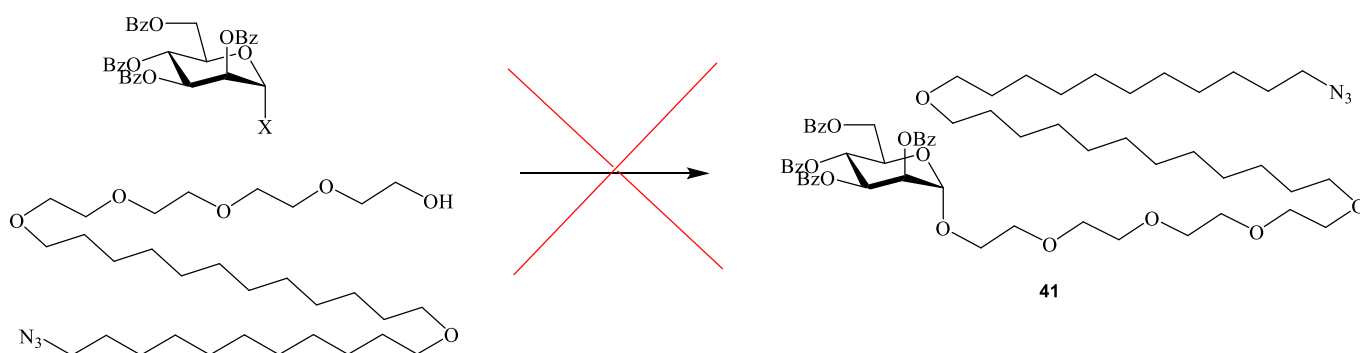


Figure 54 : Glycosylation du mannose sur **40**

Malgré de nombreuses méthodes de glycosylation testées l'étape de glycosylation n'a pas abouti. En effet que ce soit l'utilisation du thioglycoside en présence : de NIS et de TfOH, de NBS et de TfOH, ou l'utilisation du bromure de 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-

mannopyranosyle [130] aucun glycoside n'a pu être isolé. La voie de synthèse a donc été abandonnée.

B. Synthèse d'un glycolipide portant un dimannoside

Bien que plus difficile d'accès, les oligosaccharides sont en général mieux reconnus que les monosaccharides par les lectines. En effet parmi les études existantes, Varga et al. ont testé des glycodendrimères de différentes valences et comportant un mono- ou un di- ou un trisaccharide dérivé du mannose [131]. Ils ont trouvé dans le cadre de leurs études que l'IC₅₀ d'un trisaccharide monovalent (145 µM) était bien meilleur que pour le di- et le monosaccharide, respectivement, 1018 µM et 3292 µM. Cependant cette différence est vite rattrapée par des glycodendrimères de valence 3 ou 4 c'est la raison pour laquelle le raft précédemment décrit ne contient que des monosaccharides.

1. Première stratégie envisagée.

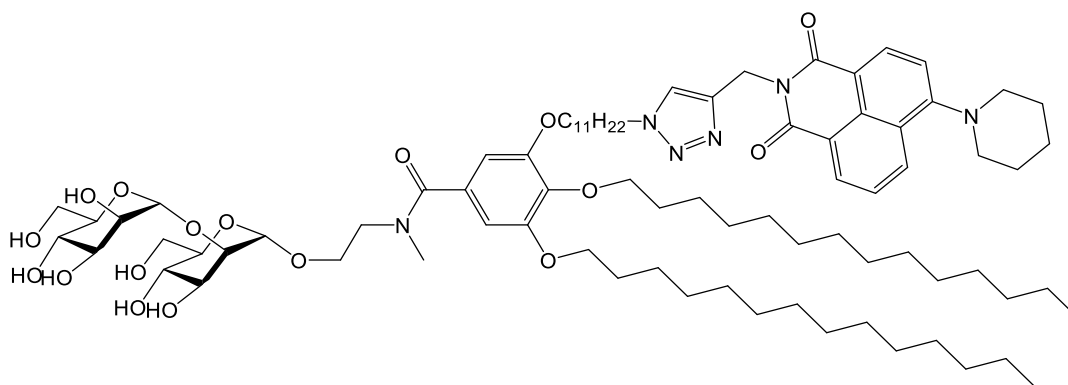


Figure 55 : Glycolipide dimannoside basé sur un cœur galate

Dans le cadre de notre projet il a été retenu un disaccharide (figure 55) dont la partie alkyle est basée sur un cœur galate comportant trois chaînes alkyles permettant de compenser le gain de polarité par rapport à la version monosaccharide.

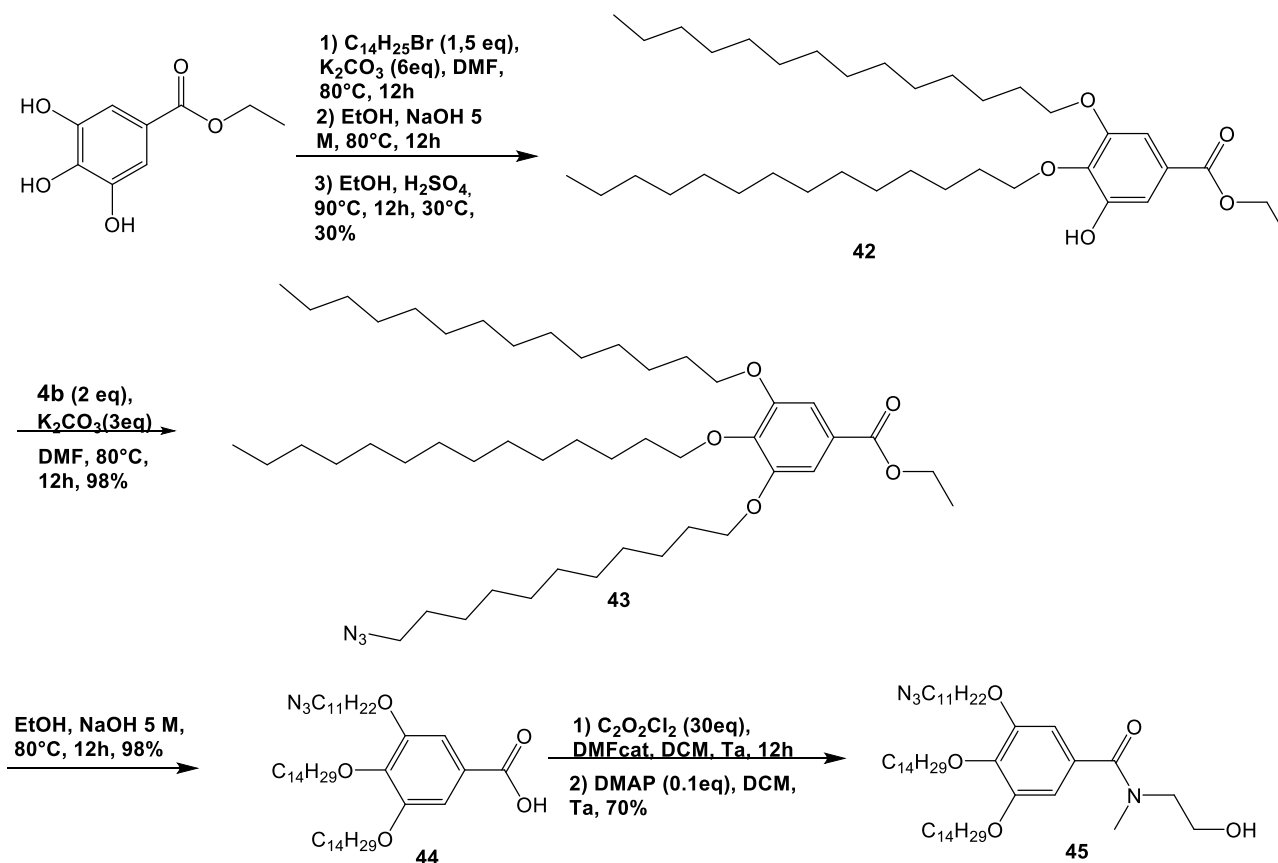


Figure 56 : Synthèse de la partie alkyl du glycolipide

La synthèse de la partie alkyl se fait à partir de galate d'éthyle commercial. Afin de pouvoir introduire le fluorophore il est nécessaire de différencier les trois chaînes alkyl introduites. Dans un premier temps seulement deux chaînes sont introduites par la réaction de Williamson avec seulement 1,5 équivalent de 1-bromo-tétradécane, afin de favoriser au maximum la formation du produit dialkylé **42** désiré. Lors de cette étape les produits mono- et dialkylé, étant très apolaires, sont malheureusement inséparables sur gel de silice. Il est alors nécessaire de saponifier l'ester pour diminuer la polarité des produits et réussir à les séparer sur gel de silice même si la séparation reste délicate due à la présence de l'acide. Le produit dialkylé est alors estérifié pour donner le produit **42** avec un rendement modeste de 30%. La condensation du 1-azido-11 tosyloxy undecane (**5**) sur le galate dialkylé **42** se fait en présence de K_2CO_3 dans le DMF et donne le composé attendu **43** avec un rendement quantitatif de 98%. **43** est ensuite saponifié pour donner l'acide correspondant **44**. Celui-ci est, dans un premier temps, activé en chlorure d'acide avec du chlorure d'oxalyle en présence DMF (proportion catalytique) puis le couplage sur l'espaceur est réalisé en présence de DMAP pour offrir **45** avec un bon rendement de 70%.

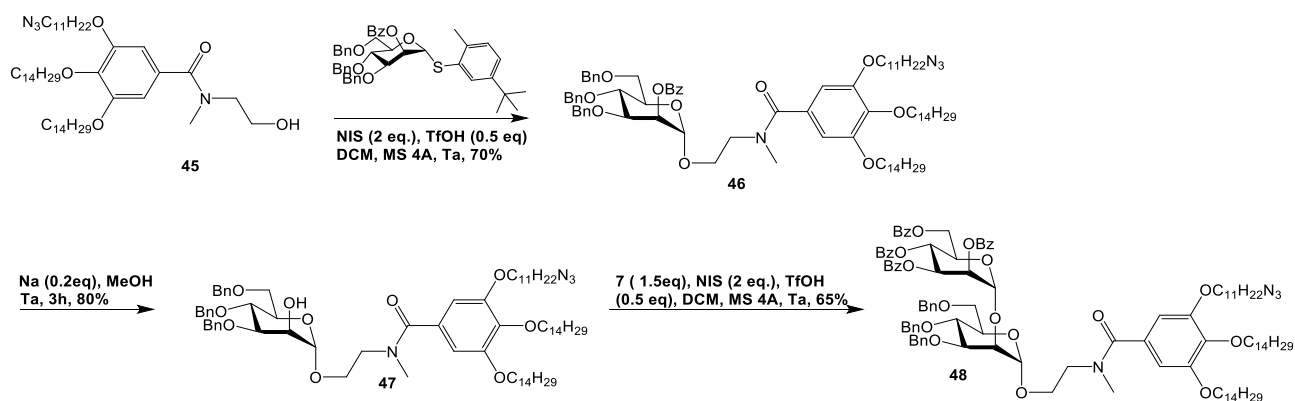


Figure 57 : Introduction de la partie glycosidique.

La stratégie de synthèse envisagée pour introduire le disaccharide est tout d'abord de glycosyler avec **7** en présence de NIS et TfOH pour obtenir le produit **46** désiré avec un bon rendement de 70%. L'utilisation des groupements protecteurs orthogonaux entre eux permet de déprotéger sélectivement la position C₂ en débenzoylant dans les conditions de Zemplén. Puis le disaccharide désiré **48** est obtenu avec un rendement de 65% par glycosylation du arylthio 2,3,4,6-tétra-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside **7** en présence de NIS et TfOH.

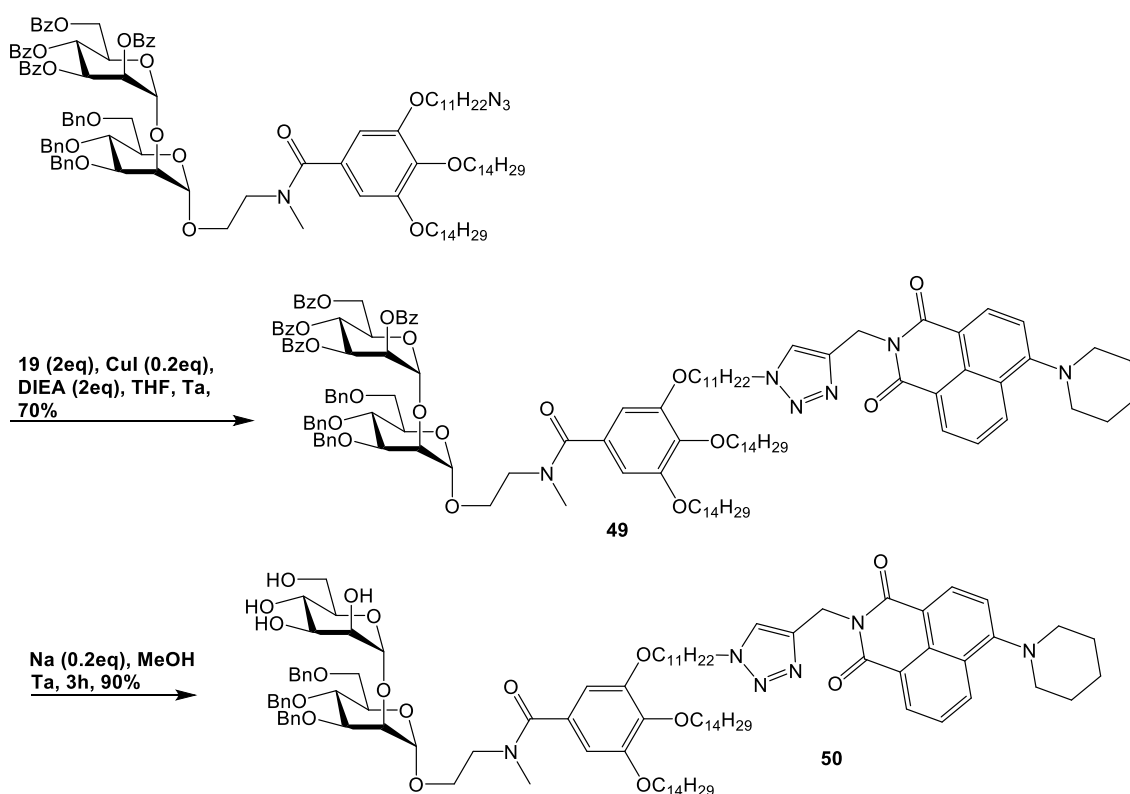


Figure 58 : Introduction du fluorophore par Click et déprotection du sucre

A ce stade de la synthèse, deux stratégies sont envisageables. La première consistant à déprotéger d'abord les benzyles de **48** en présence de Pd/C et de H₂ cela implique alors de

convertir l'azoture en amine lors du retrait des benzyles, et on anticipe un potentiel problème de solubilité et de compétition entre fonctions alcool et amine pour le couplage peptidique. La deuxième stratégie qui a été retenue (figure 59) est d'introduire par click en présence de CuI et de DIEA le fluorophore **19** offrant le produit désiré **50** avec un bon rendement de 70% ainsi que le produit d'homocouplage du fluorophore obtenu malgré l'utilisation de solvant anhydre et de l'atmosphère inerte. La première étape de déprotection est la déprotection des benzyles dans les conditions de Zemplen offrant le glycolipide partiellement déprotégé **50** avec un bon rendement de 90%.

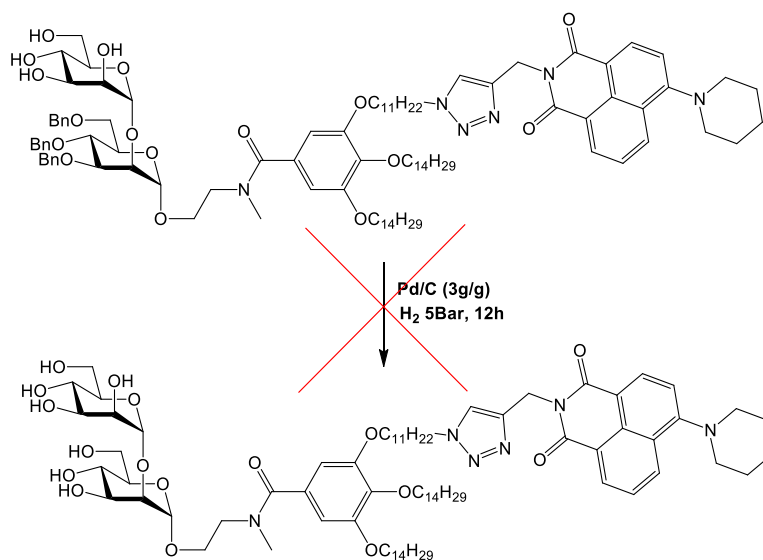


Figure 59 : Déprotection final : Perte de la fluorescence du fluorophore.

La dernière étape n'est pas sans poser problème. En effet la déprotection des trois benzyles nécessite l'emploi de Pd/C et de dihydrogène, l'utilisation d'une pression trop faible de dihydrogène ne permet pas de réaliser la déprotection complète (observé par CCM) et malheureusement l'utilisation d'une pression de 5 Bar de H₂ nécessaire à la déprotection provoque une décoloration du milieu réactionnel (impliquant la perte de fluorescence) qui passe de jaune à incolore dut à la perte de l'aromaticité du fluorophore.

2. Deuxième stratégie entamée.

Cette deuxième voie de synthèse a pour objectif non seulement d'obtenir le disaccharide avec le fluorophore mais aussi de palier aux problèmes de purification rencontrés lors de l'introduction des chaînes alkyles.

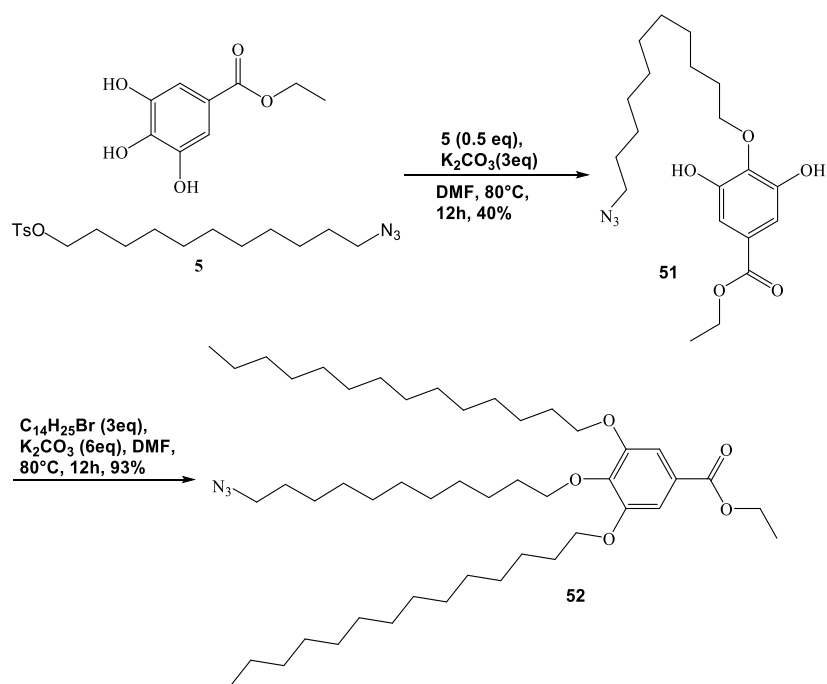


Figure 60 : Introduction des chaînes alkyle et obtention d'un isomère

Lors de la synthèse précédente il a été constaté que la séparation du galate dialkylé et du galate trialkylé posait problèmes, cependant il a été observé que le monoalkylé est facilement séparable des polyalkylés. Afin d'éviter la saponification et l'estérification nécessaire précédemment la première étape consiste en la condensation du 1-azido-11-tosyloxy undécane **5** sur le galate d'éthyle commercial (figure 60) en présence de K_2CO_3 dans le DMF et donne le composé attendu **51** monoalkylé avec un bon rendement de 40% compte tenu de la désymétrisation.

Comme attendu la purification sur gel de silice ne comporte aucune difficulté. Lors de cette étape seul l'isomère **51** a été obtenu comme le montre la RMN, en effet pour cet isomère il est obtenu un seul pic aromatique intégrant pour les deux protons aromatiques expliqué par la symétrie de la molécule. Si on avait condensé la chaîne aromatique sur les phénols en méta les deux protons aromatiques ne seraient plus identiques il en résulterait deux pics aromatiques intégrant chacun pour un proton.

Cette réactivité particulière est attribuée à l'acidité plus importante de l'hydroxyle en para du groupe électroattracteur COOEt.

L'introduction des deux chaînes alkyles en méta se fait comme précédemment en présence de K_2CO_3 et de bromure de tétradécyle pour offrir **52** avec un rendement de 93%.

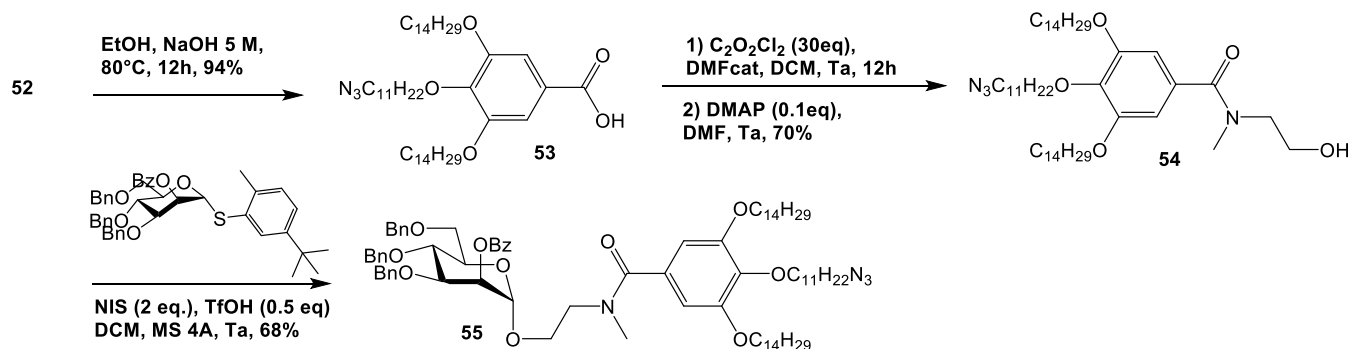


Figure 61 : Synthèse du dimannoside

52 est ensuite saponifié pour donner l'acide correspondant **53**. Celui-ci est, dans un premier temps, activé en chlorure d'acide avec du chlorure d'oxalyle en présence DMF (proportion catalytique) puis le couplage sur l'espaceur est réalisé en présence de DMAP pour offrir **54** avec un bon rendement de 71%. L'étape suivante est la glycosylation du thiomannoside donnant **55** avec un rendement de 68%. Les étapes de synthèse n'ont pu être conduites plus loin par manque de temps.

Chapitre 3 :

Fonctionnalisation des gouttes par les glycolipides

Dans cette partie, nous allons étudier les caractéristiques physico-chimiques des glycolipides synthétisés précédemment dont les structures sont données en Figure 62 pour rappel.

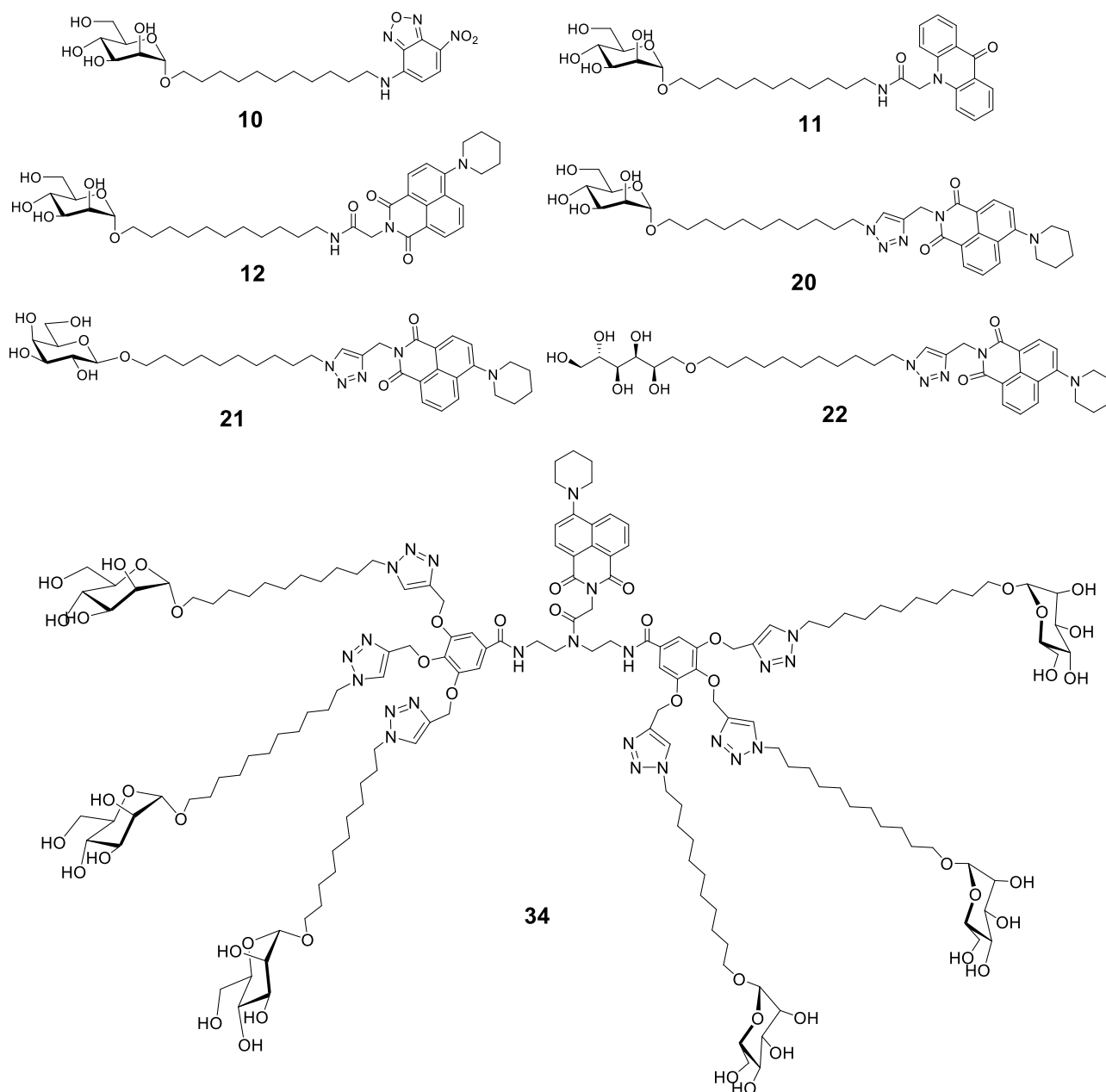


Figure 62 : Formules chimiques et structures des glycolipides synthétisés et utilisés dans le chapitre 4.

I. Caractéristique physico chimique

A. Fluorescence

Les essais de fluorescences ont été réalisés dans l'éthanol à une concentration de 10^{-5} M. Les spectres d'excitation et d'émission des mannosides–NBD (**10**) et mannoside-acridone (**11**) (Figure 63) montrent malheureusement que l'émission de **11** est de $\lambda_{em} = 452$ nm et

n'est pas compatible avec les filtres d'émissions possédés au laboratoire, rendant impossible l'observation de ce fluorophore au microscope. En effet le filtre d'émission a pour but de filtrer toute la plage d'excitation en cours d'inspection, et de transmettre la plage d'émission pour laquelle il est conçu. Pour le mannolipide **10** bien que les spectres d'émissions et d'excitations montrent qu'il est compatible avec les LED et filtres présent ($\lambda_{ex} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$) il n'est pas retenu pour la suite car les premières observations au microscope de gouttes fonctionnalisées avec ce glycolipide montrent qu'il y a un photo-blanchiment important dû à la puissance de la source lumineuse. Ces deux fluorophores sont donc abandonnés pour la suite du projet.

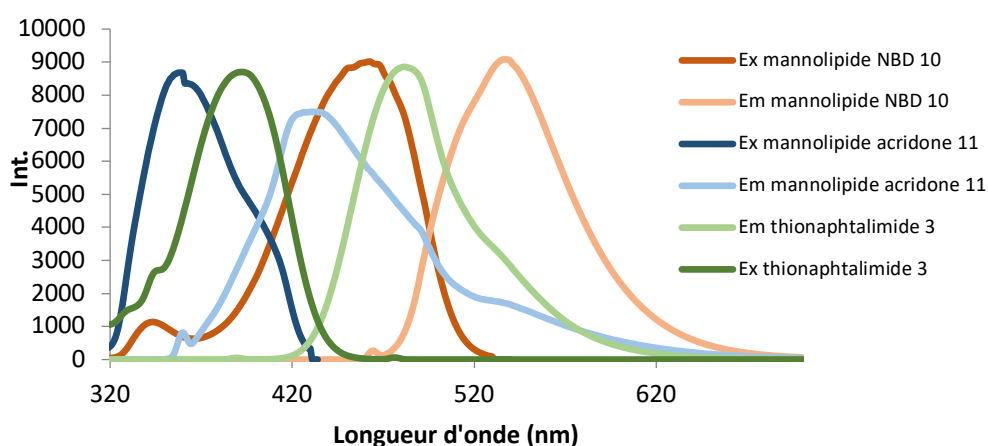


Figure 63 : Spectre d'émission et d'excitation de mannolipide NBD **10** ($\lambda_{ex} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$) et du mannolipide – acridone **11** ($\lambda_{ex} = 409 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 452 \text{ nm}$), et du thionaphtalimide **3** ($\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$) dans l'éthanol à une concentration de 10^{-5} M .

Les spectres d'émission du mannolipide-naphtalimide **12** (Figure 64) montrent que dans l'éthanol l'excitation et l'émission ($\lambda_{ex} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) sont compatibles avec les LEDs (CFP) et filtres d'émission du microscope (multibande). Il est observé que le spectre d'émission de **12** varie peu lorsque qu'il est réalisé dans l'huile de soja, en effet λ_{max} passe de 540 nm dans l'éthanol à 534 nm dans l'huile, cependant ceci n'est pas du tout le cas des spectres d'excitations où l'on observe un déplacement de stokes important de 65 nm ($\lambda_{EtOH} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{huile} = 401 \text{ nm}$). Ce déplacement de stokes ne remet pas en question l'utilisation du fluorophore au microscope où l'utilisation d'une LED pour DAPI est présente.

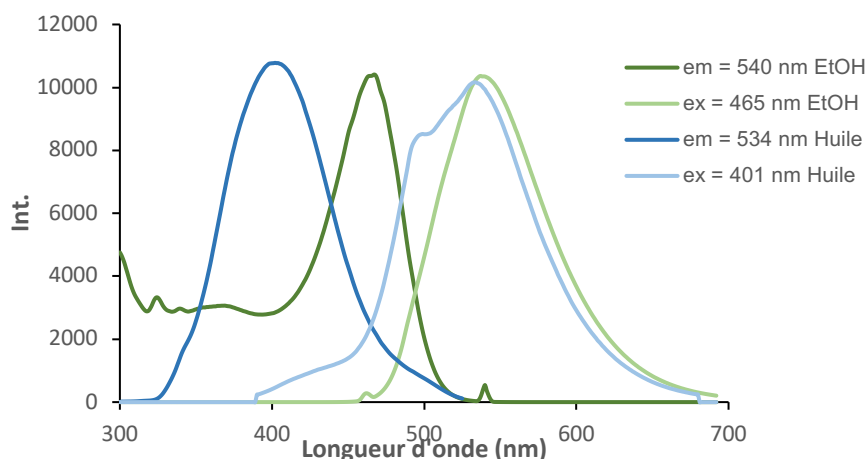


Figure 64 : Spectre d'émission et d'excitation du mannolipide-naphtalimide **12** dans l'éthanol ($\lambda_{ex} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) et dans l'huile de soja ($\lambda_{ex} = 401 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 534 \text{ nm}$) à une concentration de 10^{-5} M .

Le fluorophore 4-pipéridyl-N-carboxyméthyl-1,8-naphtalimide est donc utilisé de façon exclusive pour les autres glycolipides utilisés (**20**, **21**, **28**, **34**). Les spectres d'émission (Figure 65) dans l'éthanol sont très similaires et ne varient pas d'un glycolipide à l'autre ($\lambda_{em} \sim 540 \text{ nm}$). Cependant l'excitation varie en fonction de la méthode de couplage, en effet lorsque le fluorophore est accroché via un triazole $\lambda_{ex} \sim 410 \text{ nm}$ (**20**, **21**, **28**) alors que lorsqu'il est relié par une amide $\lambda_{ex} \sim 460 \text{ nm}$.

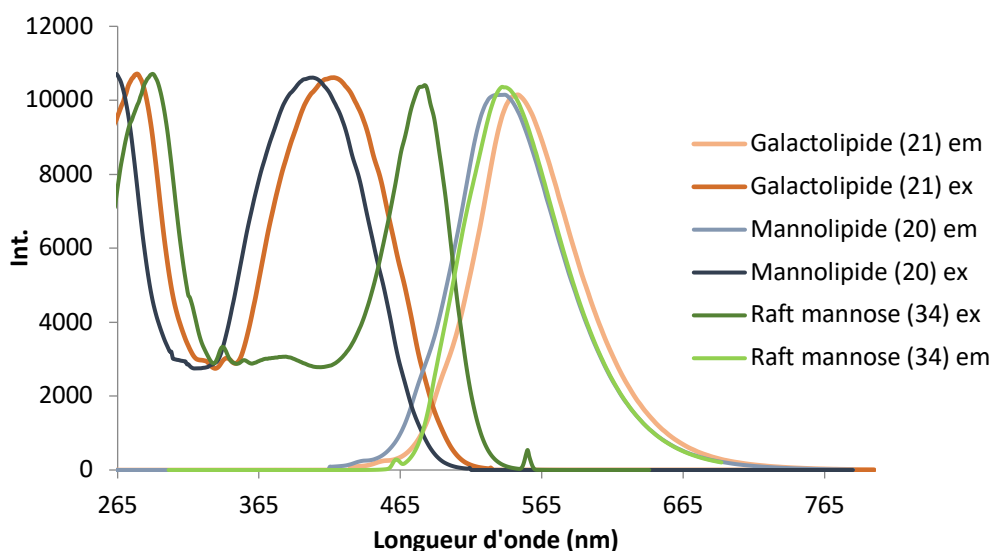


Figure 65 : Spectre d'émission et d'excitation des glycolipides **20**, **21** et **34** dans l'éthanol à une concentration de 10^{-5} M

B. Détermination de la CMC des glycolipides par les isothermes de Gibbs

Dans la partie III.D, nous avons présenté les méthodes de mesure courantes de la tension interfaciale, et comment ces mesures permettent de mesurer la concentration micellaire

critique d'un tensio-actif donné. Dans ce paragraphe, nous allons mesurer les paramètres physico-chimiques associés aux différentes molécules amphiphiles synthétisées et décrites en début de chapitre.

Les différentes solutions de glycolipides sont préparées à partir d'une solution mère à $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ dans l'eau MilliQ. Les concentrations vont de $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ à $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ pour les glycolipides **12**, **20**, **21** et **28** et de $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ à $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ pour le glycolipide **34**, les mesures ont été réalisées sur des solutions fraîchement préparées. Les isothermes de Gibbs sont présentées sur la Figure 66.

A partir de ces isothermes, on peut extraire 3 grandeurs caractéristiques de chaque glycolipide : sa tension interfaciale à l'équilibre (γ), sa CMC et l'aire par glycolipide (a) à l'interface.

Tous les glycolipides considérés abaissent la tension de l'interface eau/air ($\gamma=72 \text{ mN/m}$), même très légèrement comme la molécule **21**. Leur caractère amphiphile est présent, mais il est faible, notamment si on compare ces valeurs aux valeurs présentes dans la littérature, relatives à des structures similaires sans présence du groupement fluorescent à l'extrémité de la chaîne grasse [132,133].

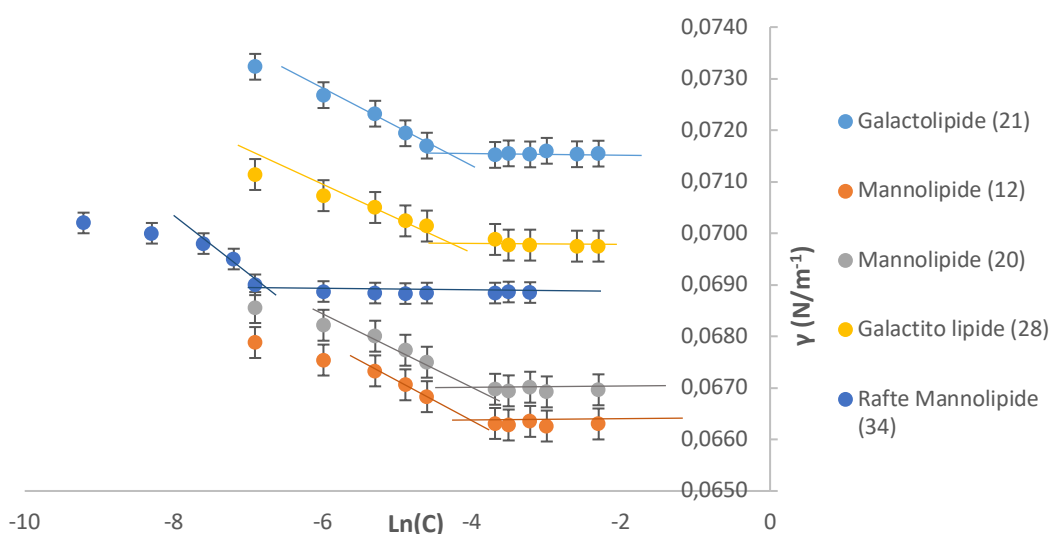


Figure 66 : Tracé des isothermes de Gibbs pour les différentes molécules amphiphiles glycosylées. Leur CMC est déterminée graphiquement en déterminant la zone de rupture de pente de la courbe.

On peut remarquer que le galactolipide **21**, le mannolipide **12**, et le mannolipide **20**, ont les mêmes CMC ($1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) ce qui s'explique par des structures très proches. Et notamment le même ratio « Longueur de chaîne alkyl / sucre ». Rosen *et al.* ont décrit le comportement micellaire de dodécyl tri, penta, hexa et octaéthylène glycol et observent une augmentation de la valeur de la CMC proportionnelle au nombre de résidus éthylène glycol qui est donc

liée à l'augmentation de l'hydrophilie [134] ce qui va dans le sens de notre hypothèse. Le fait que le galactitolipide ait une CMC légèrement plus faible est probablement lié au fait que la partie sucre possède un alcool supplémentaire ce qui rend cette partie un peu plus polaire pour une longueur de chaîne équivalente.

	Galactolipide (21)	Mannolipide (12)	Mannolipide (20)	Raft Mannolipide (34)	Galactito lipide (28)
γ (mN/m ²)	70,52	64,90	66,90	67,81	69,77
a (Å ²)	72,40	68,70	69,10	137,40	92,20
CMC (mol/l)	1,25E-05	1,00E-05	1,25E-05	2,50E-06	1,00E-05

Tableau 4 : Tension interfaciale à l'équilibre (γ), CMC, aire par glycolipide (a) et CMC mesurées à partir des isothermes de Gibbs de la Figure 66.

L'évolution de a concorde avec les structures des molécules, avec des valeurs similaires pour les molécules **21**, **12**, **20** et **28**. La pieuvre de mannolipide **34** contient l'équivalent de 6 mannolipides **12** et le rapport a_{34}/a_{12} vaut 2, allant dans le sens d'une plus grande aire à l'interface, sans toutefois montrer de proportionnalité.

II. Préparation des gouttes d'émulsions fonctionnalisées

La préparation des gouttes fonctionnalisées s'effectue en plusieurs étapes : (i) une étape de préparation de la phase hydrophobe et dilution des glycolipides à l'intérieur, (ii) une étape de fragmentation des gouttes et de tri grossier des gouttes glycosylées en fonction de leur taille, et enfin (ii) une étape de mise en contact avec des lectines fluorescentes qui se lieront, ou non, de manière spécifique aux amphiphiles glycosylés à la surface des gouttes. Les détails des protocoles sont donnés dans la seconde partie du chapitre **Partie Expérimentale**.

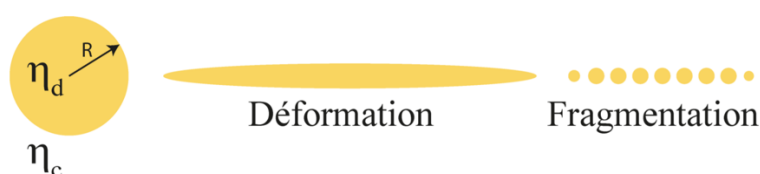


Figure 67 : Représentation schématique du processus de fragmentation par cisaillement d'une grosse goutte d'huile de viscosité η_d dans une phase continue de viscosité η_c . Après élongation, la goutte initiale se fragmente en des objets plus petits Source : [135].

Comme décrit dans la partie III.C.1, nous fabriquons les émulsions par cisaillement de la phase dispersée dans une phase continue aqueuse contenant l'huile. Intuitivement, nous comprenons que la fragmentation sera plus aisée si la viscosité de la phase continue est plus

grande que celle de la phase dispersée [135], ce qui explique l'emploi des viscosifiants hydrophiles décrits ci-dessous.

Les glycolipides étant dispersés dans l'huile avant fragmentation, il est important de travailler avec une quantité de phase dispersée qui soit la plus petite possible, tout en gardant la possibilité de pouvoir facilement comparer des conditions expérimentales différentes. Ceci explique le choix du mortier en agate, qui permet, de façon simple et rapide, d'obtenir des gouttes fonctionnalisées avec nos glycolipides tout en consommant un minimum de produit (<1 mg pour 5ml d'huile utilisé).

A. Choix des matériaux utilisés

Pour la réalisation de l'émulsion de départ, nous travaillons avec une huile de soja supplémentée en glycolipides synthétiques, et une phase continue aqueuse contenant un tensioactif (Pluronic F68) et un agent viscosifiant (Alginate de sodium).

1. Huile de soja.

Les émulsions que nous avons étudiées sont des émulsions directes d'huile dans l'eau. En partant de protocoles historiques développés par l'équipe, nous avons choisi l'huile de soja comme base de formulation. L'huile de soja est riche en acides gras polyinsaturés et notamment en acides gras essentiels alpha linoléique. Elle est principalement constituée de l'acide oléique (16%), de l'acide linoléique (50%), et de l'acide alpha-linolénique (12 %) [136].

Les suspensions de gouttes d'huile de soja ont une grande stabilité [137], conséquence de sa composition riche en triglycérides, molécules amphiphiles, et de la présence de traces d'acide gras libres qui permet d'avoir quelques charges négatives à la surface des gouttes et jouent ainsi le rôle de surfactants anioniques.

2. Poloxamer 188 (Pluronic F68 ou Synperonic F68).

Le Poloxamer 188 est un tensioactif de type copolymère tribloc formé de deux branches latérales hydrophiles de polyéthylène glycol et d'un motif central hydrophobe de polypropylène glycol (cf. Figure 68A), il est largement utilisé dans des formulations pharmaceutiques. Commercialement, il est disponible sous différentes dénominations en fonction des fabricants ou distributeurs : Kolliphor 68, Symperonic F68 ou Pluronic F68. C'est la dernière dénomination qui est la plus courante et que nous utiliserons dans la suite.

Le Pluronic F68 a une masse molaire de 8400 g.mol⁻¹. La mesure de sa CMC varie en fonction de la méthode de mesure utilisée [88,138,139]. La valeur la plus couramment considérée est celle égale à est de 0,125 mmol.L⁻¹ (0,1 %m/m).

Les étapes post-fragmentation faisant intervenir un nombre important de rinçages, il est important d'éviter que cela ne mène à une coalescence des gouttes et à une destabilisation de l'émulsion. Par rapport à des tensioactifs moléculaires classiques, qui se caractérisent par une énergie d'adsorption interfaciale faible, le Pluronic F68 a un temps de résidence à l'interface huile/eau qui est quasi-illimitée en temps, y compris dans le cas où la phase externe est rincée en surfactants [140–142].

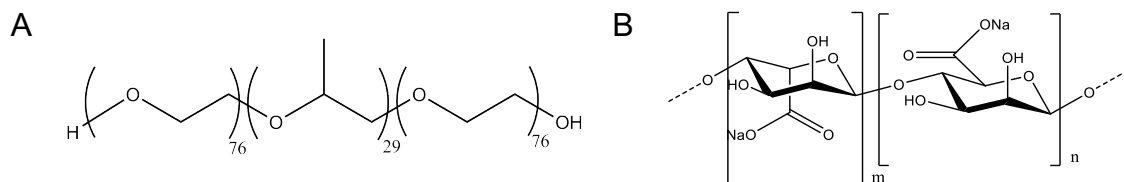


Figure 68 : (A) Structure d'une macromolécule de Pluronic F68. C'est un copolymère tribloc PEO-PPO-PEO. La partie centrale est hydrophobe et les chaînes latérales sont hydrophiles. (B) Formules chimique d'un motif d'alginate de sodium, un polysaccharide extrait d'algues brunes comme les laminaires.

3. Utilisation d'un agent viscosifiant dans la phase continue externe

La fabrication des gouttes s'effectue par fragmentation de la phase huileuse dans la phase continue aqueuse contenant l'agent tensioactif de type Pluronic. Pour faciliter le processus physique de fragmentation, on ajoute à la phase continue un agent viscosifiant non tensioactif pour augmenter sa viscosité par rapport à celle de l'huile.

Dans notre cas, nous avons choisi l'alginate de sodium, un polysaccharide extrait d'algues marines, dont le motif est représenté sur la Figure 68B. Les alginates sont couramment utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels tels que les gelées alimentaires, les produits de beauté, et les peintures [143].

B. Fabrication d'émulsions polydisperses au mortier

1. Résumé du protocole

L'émulsification se fait manuellement grâce à une contrainte mécanique, imposé par le pilon et le mortier, et qui apporte l'énergie nécessaire à la création des interfaces des gouttes. Pratiquement, nous déposons tout d'abord un volume de 350 μ l de phase continue contenant de l'eau, 15%_{om/m} de Pluronic F68 et 2%_{om/m} d'alginate de sodium au fond du mortier.

Ensuite, nous ajoutons peu à peu 1 mL d'huile de soja, dans laquelle les glycolipides sont dispersés (concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M), jusqu'à obtenir une crème. La fraction finale en huile est de $\phi=74\%$. Ensuite, de l'eau est ajoutée au mortier de manière à diluer la crème et prélever l'émulsion, et la suspension est mise à décanter pour filtrer les trop petites gouttes, browniennes, des plus grosses qui seront aisément observables par microscopie optique.

2. Caractérisation de la distribution de taille des gouttes

La mesure de la distribution de taille est importante pour les estimations ultérieures de concentration de glycolipides à l'interface, mais aussi pour s'assurer de la reproductibilité des divers échantillons d'émulsions.

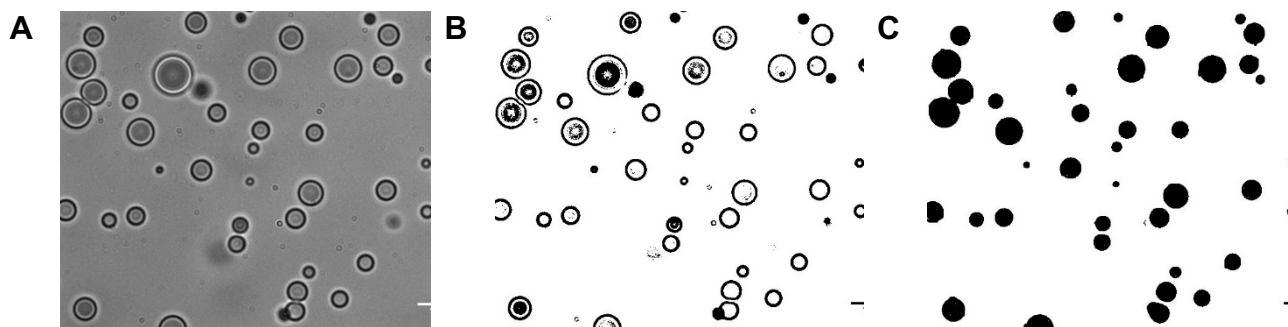


Figure 69 : Image en microscopie en transmission de gouttes d'émulsions (A) qui a été modifiée avec le logiciel Image J. Les gouttes étant très contrastées il est aisé de les seuiller (B) et de les binariser (C) avant de mesurer leur distribution de taille.

En pratique, on réalise plusieurs images en microscopie en transmission des gouttes. Ces images sont alors traitées individuellement avec le logiciel de traitement d'images ImageJ/FIJI [144,145]. Comme le montre la Figure 69, le traitement comporte plusieurs étapes qui consistent (i) à transformer les images obtenues en images bitonales, après seuillage et remplissage de manière à obtenir des particules entièrement noires; (ii) enfin à analyser la taille des gouttes automatiquement.

La Figure 70 montre la distribution de tailles obtenue à partir de la mesure effectuée sur plusieurs centaines de gouttes d'émulsions. De manière assez inattendue si on considère la simplicité de notre moyen de fabrication, nous obtenons une distribution de tailles relativement homogène, avec un rayon moyen égal à $3,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$.

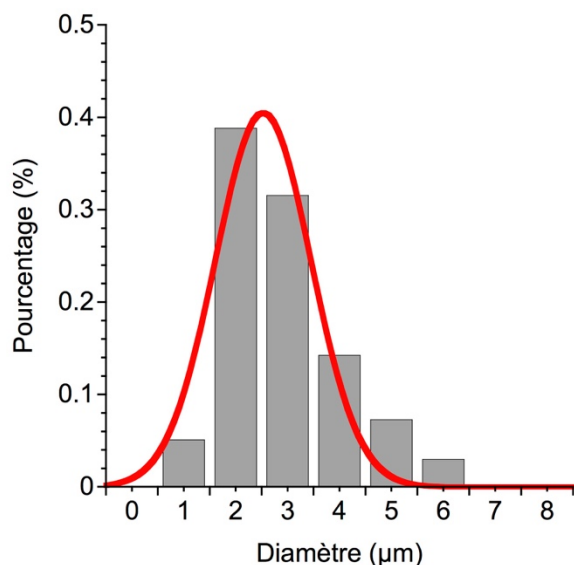


Figure 70 : Distribution de tailles des gouttes d'émulsion fabriquées au moyen du mortier. L'émulsion est caractérisée par un rayon moyen de $3,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$.

3. Estimation du nombre de glycolipides à l'interface eau/huile

Connaissant la distribution de taille des gouttes et la concentration de glycolipides dissous dans l'huile de soja avant fragmentation, nous pouvons déterminer la concentration surfacique maximale des glycolipides.

Pour des gouttes ayant un rayon moyen de $3 \mu\text{m}$, pour une concentration initiale de $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ en glycolipide, nous faisons l'hypothèse que tous les amphiphiles migrent à l'interface des gouttes. On obtient donc que chaque glycolipide occuperait une surface de $6,7 \text{ nm}^2$ à l'interface eau/huile.

Cette valeur est entre 5 et 10 fois plus élevée, donc correspondent à une densité interfaciale 5 à 10 fois moins dense, que les valeurs de a mesurées par la technique de la goutte pendante pour chaque glycolipide et présentées sur le Tableau 4 de la partie I.B. La nature de l'interface étant différente des expériences de goutte pendante, il est difficile d'en tirer des conclusions trop poussées, mais on travaille malgré tout assez loin de la concentration nécessaire à une saturation géométrique avec une monocouche compacte de glycolipides sur les gouttes.

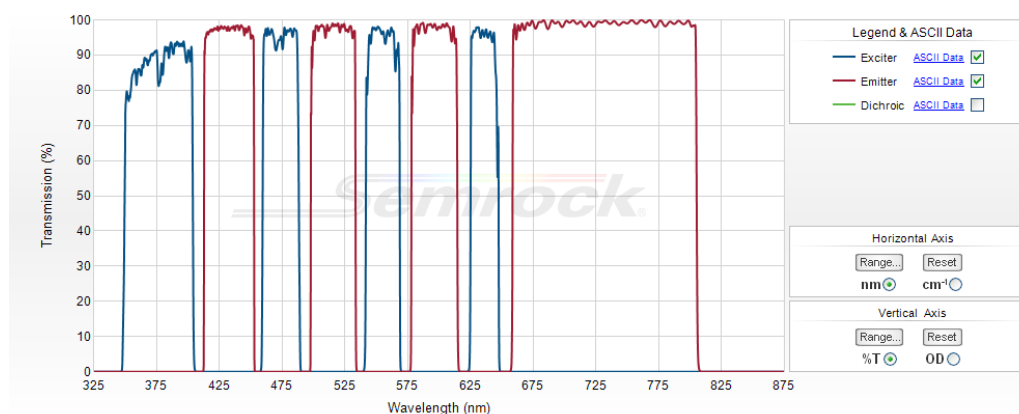


Figure 71 : Caractéristiques spectrales des filtres quadribandes d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) utilisés pour la visualisation des gouttes. La lampe est une Lumencor SpectraX à LED. Source : <http://www.semrock.com>

4. Visualisation des gouttes fonctionnalisées par épifluorescence

Les glycolipides qui ont été synthétisés présentent un groupement naphthalimide sur leur chaîne grasse, caractérisé par une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} \cong 365$ nm et une longueur d'onde d'émission $\lambda_{em} \cong 565$ nm, soit un déplacement de Stokes très important de 200 nm. Ce déplacement de Stokes est peu compatible avec les bâtis commerciaux courants de microscopes en épifluorescence, qui sont conçus pour travailler avec des fluorophores pour qui la différence de longueur d'onde entre l'émission et l'excitation excède rarement plus de 40 nm. Pour visualiser les gouttes, nous utilisons une source polychromatique à LED (Lumencor Spectra X) et un cube de fluorescence équipé de filtres dichroïques et d'émission multibandes. Les caractéristiques spectrales sont données sur la Figure 71.

Afin de vérifier la bonne fonctionnalisation de nos gouttes, on prélève quelques microlitres de l'émulsion finale que l'on dilue dans l'eau de manière à diminuer leur concentration. On place ensuite ces quelques microlitres sur une lame de microscope, et on observe l'échantillon au microscope à fluorescence. Comme attendu, les gouttes font apparaître une fluorescence à leur surface (cf figure 72) montrant la présence d'une couronne fluorescente en surface des gouttes donnant une intensité plus forte sur les bords

Ces tests ont été réalisés à chaque nouveau lot de gouttes réalisé, y compris pour les gouttes non fonctionnalisées.

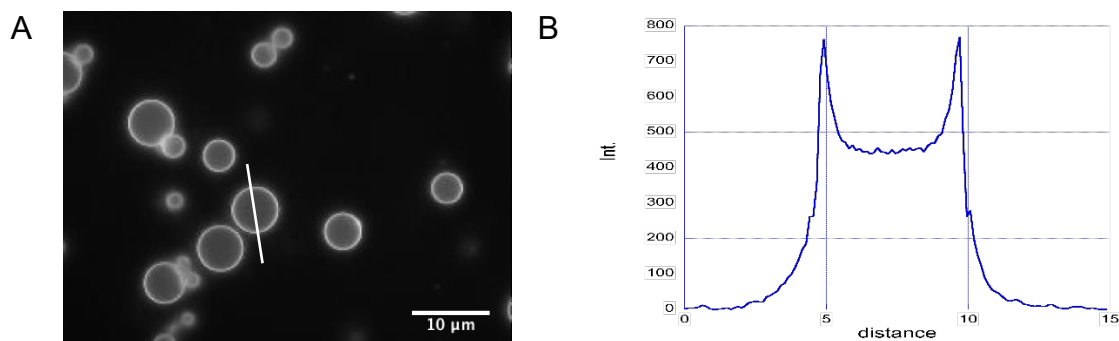


Figure 72 : (A) Image d'une goutte fonctionnalisée par le mannolipide **12** en microscopie de fluorescence et (B) son profil d'intensité.

Une fois que les glycolipides se trouvent à la surface de la goutte, celle-ci ne perd pas de sa fluorescence pendant plusieurs jours, indiquant la stabilité de cette fonctionnalisation.

5. Rôle des tensioactifs du milieu sur la desorption des glycolipides

La mise en contact avec les lectines ne peut se faire directement dans la solution de 1%_{m/m} de Pluronic F68 utilisé précédemment en effet l'utilisation des lectines nécessite d'utiliser une solution tampon PBS avec le tensioactif (voire protocole) et l'ajout de CaCl₂ (0,1 mM) et MgCl₂ (0,1 mM) nécessaires aux lectines. Avant tout contact avec les lectines, les gouttes sont rincées plusieurs fois avec la solution tampon (voire protocole). Dans le cadre de l'optimisation du protocole, nous avons décidé d'optimiser la réaction en utilisant le mannosylipide **12**.

Dans un premier temps on a utilisé un mélange de PBS et de 1%_{m/m} de Pluronic F68 les observations au microscope (cf. Tableau 5) montrent une perte d'intensité en fluorescence comparé aux conditions d'observation précédente. La diminution de la quantité de Pluronic F68 (0,1%_{m/m}) ou l'utilisation de Tween (0,2%_{m/m}) permet de perdre moins en intensité de fluorescence. Il est observé aussi que l'utilisation d'une solution tampon de PBS seule, sans tensioactif, ne donne pas de perte d'intensité de fluorescence. Ces premiers résultats montrent que la perte d'intensité est due à l'extraction du glycolipide par le tensioactif qui forme des micelles car on est au-delà de leur CMC.

L'utilisation d'une solution de tampon PBS en se plaçant à la CMC du Pluronic F68 (0.03%_{m/m}) ou du Tween (0.007%_{m/m}) montre que nous n'avons pas de perte de fluorescence confirmant ainsi que le glycolipide était bien extrait par le tensioactif.

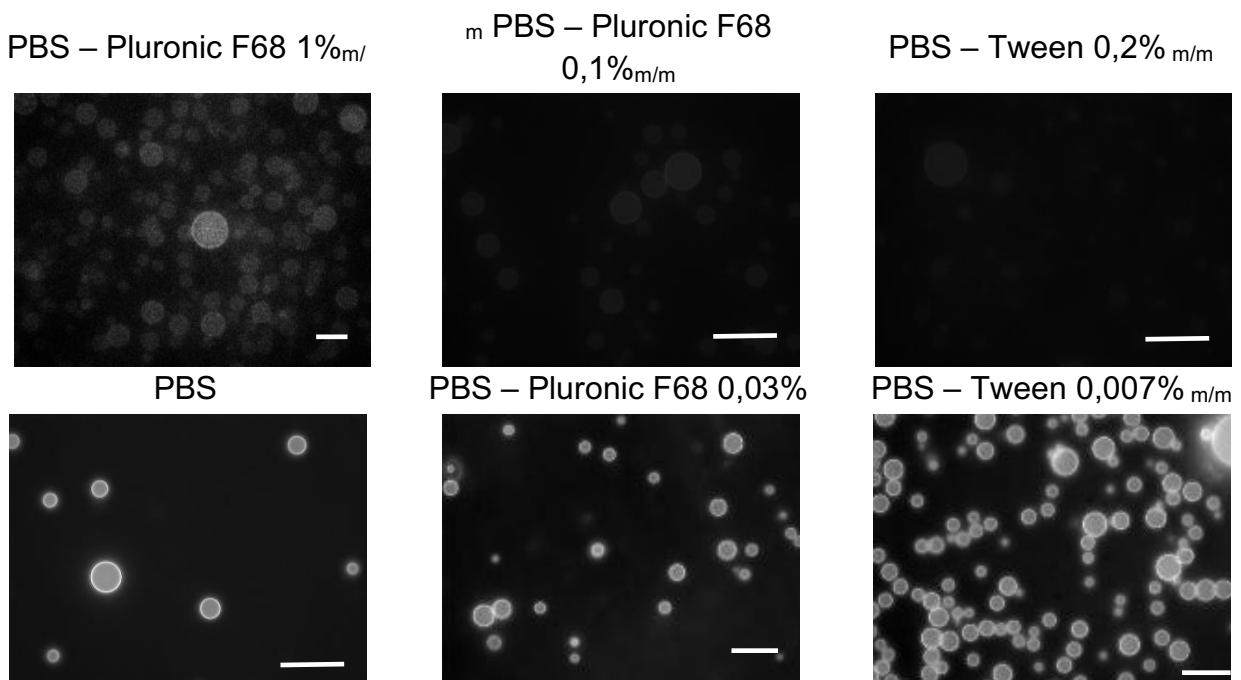


Tableau 6 : Gouttes fonctionnalisées avec le mannosylipide **12** à $5 \cdot 10^{-4} M$ et diluées dans du PBS supplémenté en tensioactif (Tween 20, Pluronic F68) à différentes concentrations. Les photos ont été prises en microscopie de fluorescence. Barre d'échelle : 10 μm

III. Mise en contact avec des lectines solubles

A. Optimisation des conditions expérimentales

1. Choix du fluorophore de conjugaison des lectines

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé de la ConA et de la PNA fonctionnalisés avec de l'Alexa 647 (Deep Red), permettant ainsi de pouvoir visualiser les lectines de façon indépendante du glycolipide (excitation à 365nm et émission à 540 nm).

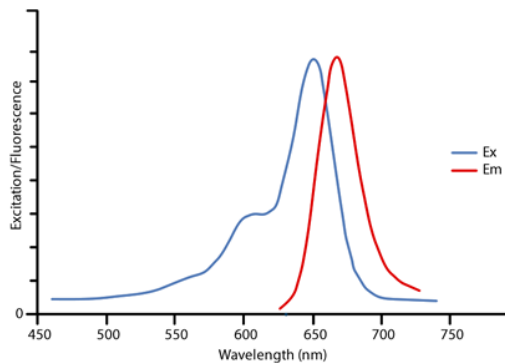


Figure 73 : Spectre d'excitation et d'émission du fluorophore Alexa 647. Source : ThermoFisher – Molecular Probes

2. Optimisation du tampon de dilution et du tensioactif de fond

Cette première étude de mise en contact des gouttes avec les lectines s'est faite avec des gouttes fonctionnalisées avec le mannolipide **12**, à une concentration de $5 \cdot 10^{-5}M$.

PBS	Tween 20	Pluronic F68	C_{conA} (mg/ml)	C_{PNA} (mg/ml)
1X	0,00 %w/w	0,03 %w/w	0,30	0,30
1X	0,00 %w/w	0,00 %w/w		
Dilué	0,00 %w/w	0,03 %w/w		
Dilué	0,007 %w/w	0,00 %w/w		

Tableau 7 : Conditions de mise en contact des gouttes fonctionnalisées avec le mannolipide **12** à $5 \cdot 10^{-4}M$.

Il est observé que la ConA et la PNA interagissent toutes deux sur les gouttes fonctionnalisées alors que seule la ConA est sensée interagir car spécifique du mannose. Le contrôle fait avec les gouttes non fonctionnalisées montre qu'il y a absorption de la ConA et de la PNA sur la surface, montrant ainsi que l'on a un problème de surface avec nos gouttes. De plus il est observé que les gouttes se collent au verre des lamelles et se déforment.

Les mêmes observations sont faites dans le cas de l'utilisation d'une solution tampon PBS sans tensioactif et d'une solution tampon dilué 10 fois avec du F68 (Tableau 7)

La mise en contact s'est faite avec une solution tampon PBS – F68 0.03%_{m/m} isolé précédemment (Tableau 7). En pratique quelques microlitres de l'émulsion stock sont dilués dans le tampon puis la ConA (ou PNA) en solution dans du tampon (1 mg/ml) est ajoutée pour obtenir une concentration de 0,3 mg/ml. L'échantillon est ensuite agité doucement pendant 30 min avant d'être centrifugé et rincé 2 fois avec de la solution tampon. Cette manipulation est réalisée à la fois sur les gouttes fonctionnalisées avec **12** mais aussi avec des gouttes non fonctionnalisées utilisées comme contrôle.

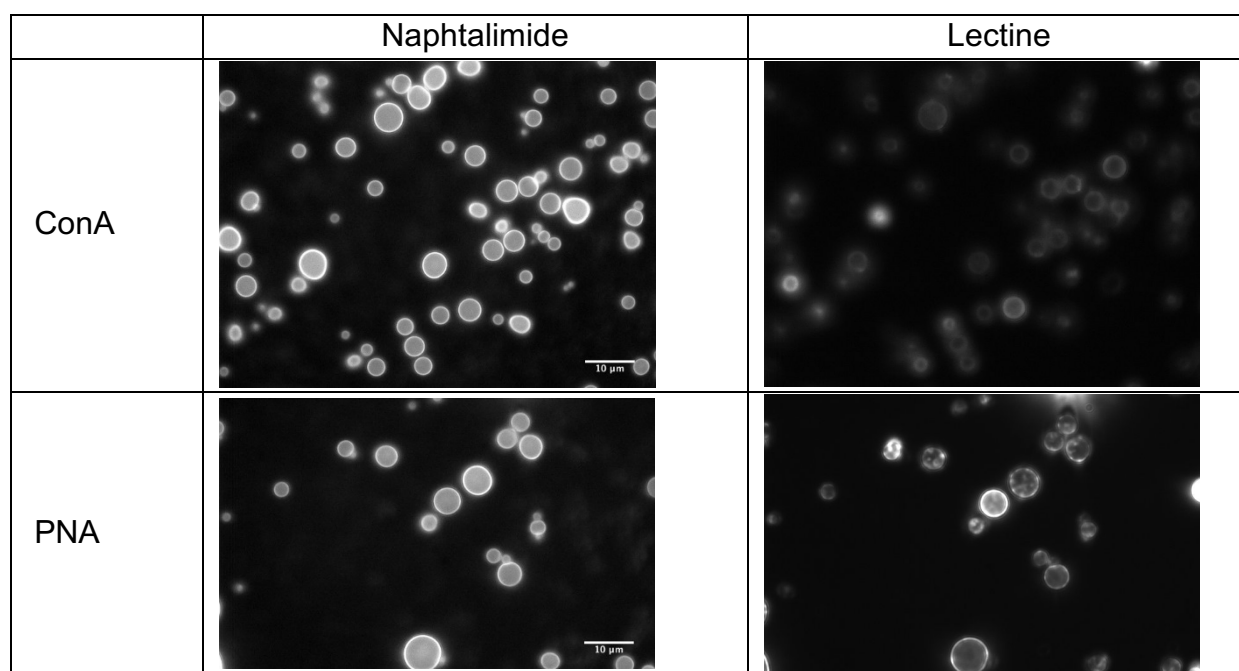


Tableau 7 : Gouttes fonctionnalisées avec le mannolipide **12** à $5 \cdot 10^{-4}M$ et mis en contact avec la ConA (1^{er} ligne) ou la PNA (2^{ème} ligne) dans une solution de PBS – F68 0.03%. Les photos ont été prises en microscopie de fluorescence en excitant successivement en DAPI (400 nm, colonne de gauche) et en Deepred (colonne de droite).

3. Spécificité de la reconnaissance des lectines

Enfin en utilisant un tampon dilué 10 fois avec du Tween20 (Tableau 8) on peut observer que la ConA s'adsorbe à la surface des gouttes alors que la PNA ne s'y absorbe pas. Pour les gouttes non fonctionnalisées aucune adsorption n'est observée pour la ConA et la PNA permettant de conclure à une interaction spécifique entre la ConA et les gouttes fonctionnalisées.

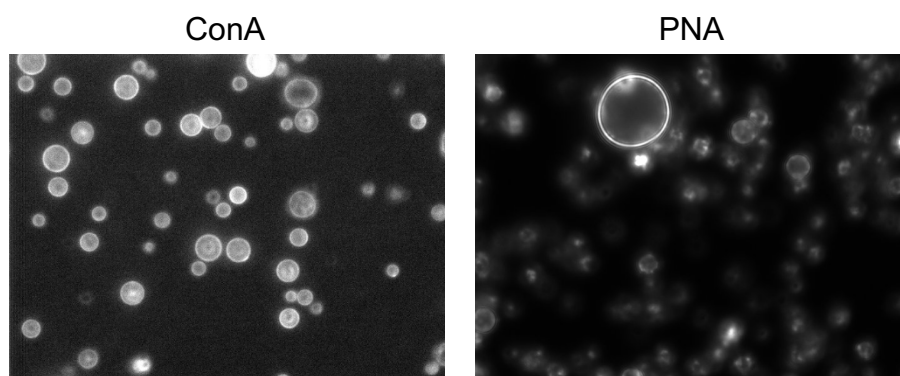


Figure 74 : Gouttes non fonctionnalisées et mis en contact avec la ConA ou la PNA dans une solution de PBS – F68 0.03%. Les photos ont été prises en microscopie de fluorescence en excitant Deepred.

B. Études sur la spécificité de la reconnaissance des gouttes par les lectines.

Suite aux résultats obtenus lors du développement de l'expérience d'interaction lectine-gouttes nous avons, dans les mêmes conditions opératoires (PBS – Tween 0.007%, $C_{\text{glycolipide}} = 5 \cdot 10^{-4} \text{M}$), réalisé l'expérience avec les autres glycolipides synthétisés dont les résultats sont présentés sur le Tableau 9.

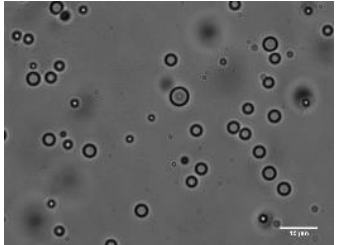


	Transmission	Lectines	
		ConA	PNA
Gouttes nues			

Tableau 8 : Gouttes fonctionnalisées avec le mannolipide **12** à $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ et non fonctionnalisées mis en contact avec la ConA ou la PNA dans une solution de PBS – Tween 0.007%. Les photos ont été prises en microscopie de fluorescence en excitant successivement en DAPI ou transmission, colonne de gauche) et en Deepred (colonnes de droite).

Nous pouvons observer que pour toutes les gouttes présentant des mannolipides à leurs surfaces il y a adsorption de la ConA (spécifique des mannoses) tandis que la PNA ne s'adsorbe pas. Les gouttes présentant le galactolipide **21** à leur surface permettent l'adsorption à leur surface de la PNA (spécifique du galactose) sans qu'il y ait absorption de la ConA. De plus dans le cas des gouttes non fonctionnalisées il n'y a aucune adsorption ni

de la ConA ni de la PNA. Ces résultats montrent clairement la spécificité de la reconnaissance des gouttes fonctionnalisées par les lectines. En effet lorsque la goutte présente à sa surface des mannolipides (**12**, **20**) seule la ConA, qui est spécifique des structures α -D-mannosylé, se lie à la surface tandis que la PNA n'interagit pas avec ces gouttes. En sens inverse les gouttes présentant des galactolipide (**21**) se lie à la PNA, qui est spécifique des α -D-galactolipide, sans adsorber la ConA. De plus quand la surface ne présente pas de glycolipide il n'y a aucune adsorption de celle-ci à la surface de la goutte.

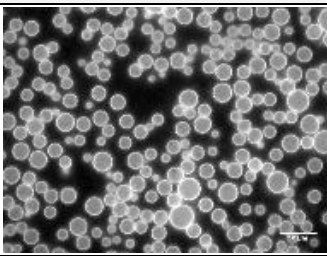
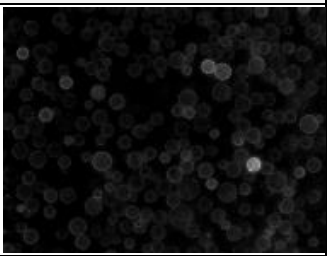

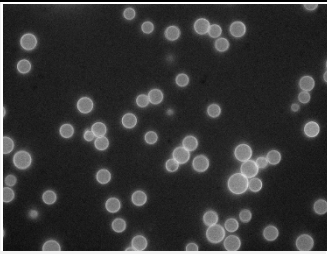
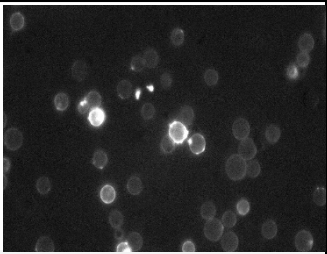

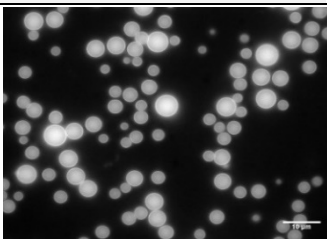
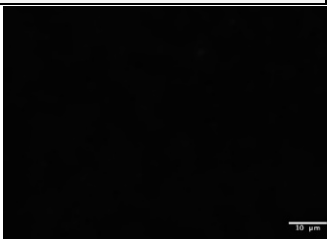
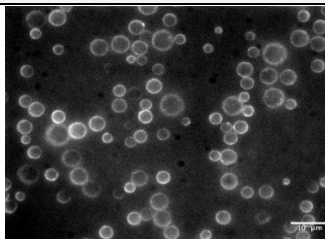
Molécule	Glycolipides	Lectines	
		ConA	PNA
12			
20			
21			

Tableau 9 : Gouttes fonctionnalisées avec les glycolipides synthétisés à $5.10^{-4}M$ et non fonctionnalisées mis en contact avec la ConA ou la PNA dans une solution de PBS – Tween 0.007%. Les photos ont été prises en microscopie de fluorescence avec les paramètres correspondant aux fluorophores portés par les glycolipides et ceux portés par les lectines.

Chapitre 4 : Préparation des sondes pH et propriétés

Les lectines comme DC-sign, favorisent l'internalisation de particules via des endosomes. Ceux-ci se transforment en lysosomes en gagnant des enzymes glycosidases et protéases et en s'acidifiant. L'utilisation de sondes pH sur les gouttelettes glycosylées devrait permettre de suivre la voie d'entrée dans les cellules.

Même s'il est communément admis que le pH physiologique présente une valeur comprise entre 7,0 et 7,4, celui-ci présente de grandes variations locales au sein d'une cellule, d'un tissu cellulaire ou d'un organisme. Le pH représente alors un moyen de contrôle de divers mécanismes biologiques car une variation de la concentration en ions H^+ peut moduler l'activité enzymatique et contrôler de nombreux processus physiologiques.

Dans cette partie, nous décrivons la synthèse de sondes pH amphiphiles intégrables dans les gouttelettes et de fluorescence bleue

I. Des sondes fluorescentes déjà disponibles

Différentes méthodes existent pour mesurer le pH intracellulaire. Parmi les premières mises au point, figurent l'utilisation de microélectrode sensible au pH et la RMN du phosphore des phosphates inorganiques présents dans l'organisme. Malheureusement, la première méthode est extrêmement invasive et occasionne une dégradation de la cellule. Quant à la seconde méthode, comme beaucoup de techniques basées sur la RMN, elle possède une faible sensibilité et nécessite donc un grand volume d'échantillon. De plus, les informations spatiales précises sont difficiles à obtenir et le pH observé correspond en général à celui du cytoplasme.

Une méthode ayant une meilleure résolution a été développée ces dernières années profitant de la microscopie par fluorescence. Grâce à la protonation ou déprotonation d'une fonction chimique, on modifie les propriétés spectroscopiques de la molécule et on obtient alors une sonde sensible à la concentration de protons. La partie suivante est consacrée à la description des sondes fluorescentes sensibles à des variations de pH autour du pH physiologique.

A. BCECF un fluorophore pH sensible très largement utilisé

Le plus emblématique de ces fluorophores est la sonde 2',7'-bis(carboxyéthyle)-5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF, Figure 75). Décrite par Tsien et al. [146] en 1982, elle est aujourd'hui probablement l'une des plus utilisées pour mesurer le pH intracellulaire.

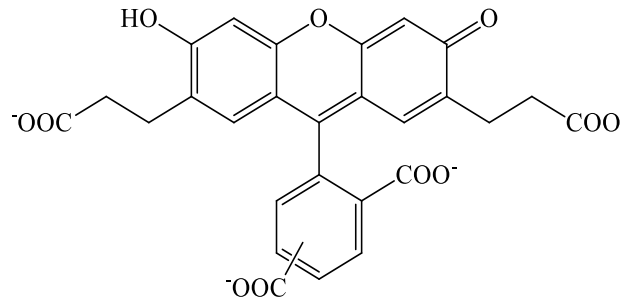


Figure 75 : Fluorophore BCECF

Le cœur de la structure très proche de la fluorescéine, présente plusieurs avantages : un rendement quantique élevé en milieu basique (84 %) et un pKa égal à 7,0 proche du pH physiologique. Ce fluorophore (Figure 75) avec une émission dans le vert présente un maximum d'intensité d'émission à 535 nm et une excitation dépendante du pH. Le maximum d'excitation est situé à 495 nm et l'intensité correspondante varie en fonction du pH. Il est à noter que, lors d'une excitation à $\lambda = 439$ nm, l'intensité de fluorescence est indépendante du pH il s'agit du point isoémittif [147].

Comme son parent, la fluorescéine, seule la forme basique (phénate) est fluorescente et elle est éteinte en milieu acide.

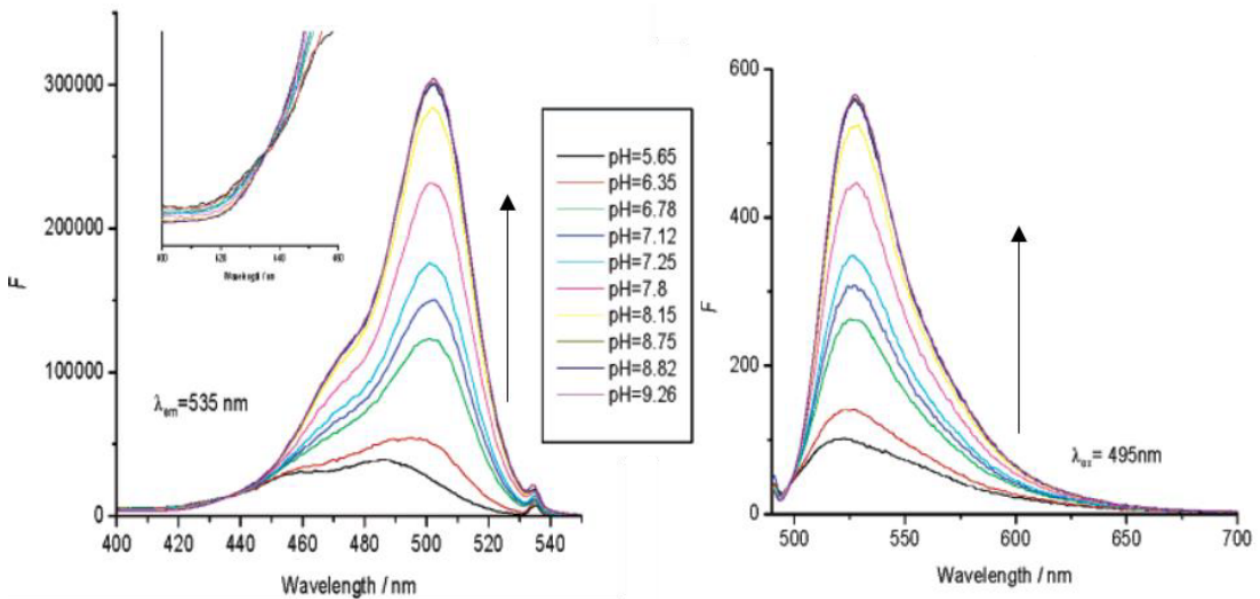


Figure 76 : Gauche : Spectres d'excitations. Droite : Spectres d'émission. Les flèches marquent l'évolution avec l'augmentation du pH [147].

De manière générale, les variations de fluorescence ne sont pas uniquement liées à des variations de pH : un photo-blanchiment de la sonde peut induire une diminution de l'intensité mesurée. L'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation n'est donc pas suffisante pour avoir avec elle seule une mesure de pH. L'astuce développée est d'utiliser une excitation à

une deuxième longueur d'onde bien particulière : le point isoémitif. Ce point présente la particularité que l'intensité de fluorescence ne dépend pas du pH mais seulement de l'environnement de la sonde (concentration, blanchiment, ...). Cette particularité permet que le rapport d'intensité entre les deux émissions soit indépendant des facteurs extérieurs et permet alors de remonter au pH. Cette approche est connue sous le nom de mesure ratiométrique en excitation.

Plus clairement cela signifie que l'on réalise des mesures d'intensité à 535 nm avec deux longueurs d'onde d'excitation : 439 nm et 495 nm. Le rapport de ces deux mesures permet d'obtenir le pH. Malheureusement cette sonde présente un inconvénient majeur qui est un photo-blanchiment relativement rapide amenant une baisse rapide de la fluorescence.

B. Le phénol : détecteur du pH

D'autres sondes fluorescentes pH ont été proposées au cours de ces dernières années et dans la grande majorité des cas le groupe sensible (c'est à dire déprotonable) est un phénol [148] comme dans les dérivés de la fluorescéine.

En effet, bien que le pKa du phénol soit de 9, il est possible de l'abaisser pour lui faire avoisiner les valeurs de pH physiologique assez facilement par la présence de groupes électroattracteurs qui permettent ainsi de stabiliser la forme phénoxyde. De plus, le groupement hydroxyl est un faible groupe électro-donneur, alors que la forme phénoxyde enrichit le système grâce à sa charge négative qui peut se délocaliser le long des cycles aromatiques. Le phénol et le phénolate posséderont de fait des caractéristiques très différentes en absorption et en émission.

Les sondes basées sur un squelette benzoxanthène sont un exemple représentatif de l'utilisation du phénol. Ces fluorophores se répartissent globalement en trois catégories : seminaphthofluorones (SNAFR-1 est un exemple), seminaphthofluorescéines (SNAFL, dérivés de la fluorescéine) et seminaphthorhodafuors (SNARF, moitié rhodamine, moitié fluorescéine). Ces sondes présentées sur la Figure 77 ont été présentées au début des années 1990 par Invitrogen [149].

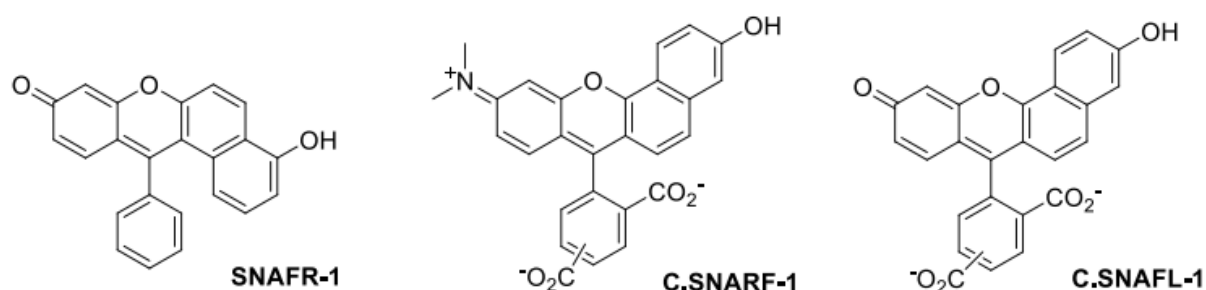


Figure 77 : Quelques exemples de fluorophores indicateurs de pH basés sur le benzoxanthène.

Un dernier exemple basé sur les différences de comportement électro-donneur entre le phénol le phénolate est le BODIPY-pH (Figure 78). Cette molécule [150] est construite à partir de deux motifs fluorescéine, un accepteur BODIPY et un groupement triéthylène glycol permettant une solubilité dans l'eau. Le FRET permet un transfert d'énergie entre la fluorescéine et la partie BODIPY, ce transfert d'énergie dépend directement de l'état de protonation. En milieu acide, le xanthène est sous forme protoné (phénol) et lorsqu'il est excité, un transfert d'énergie total au BODIPY a lieu. Celui-ci fluoresce à son tour autour de 600 nm. Par contre, sous forme déprotoné (phénolate), le transfert d'énergie par FRET n'a plus lieu et la sonde fluoresce par la partie xanthène ($\lambda = 520$ nm) fournissant ainsi un déplacement de Stokes assez important. Dans le cas particulier d'un pH avoisinant le pKa, les deux formes coexistent en proportions équivalentes le transfert d'énergie est alors partiel et les deux parties fluorescent. Cette molécule permet de conserver une fluorescence sur toute la gamme de pH en excitant la fluorescéine. Le rapport d'intensité émise par chacun des deux fluorophores dépend du transfert d'énergie qui lui-même ne dépend que du pH, ceci permet une mesure ratiométrique.

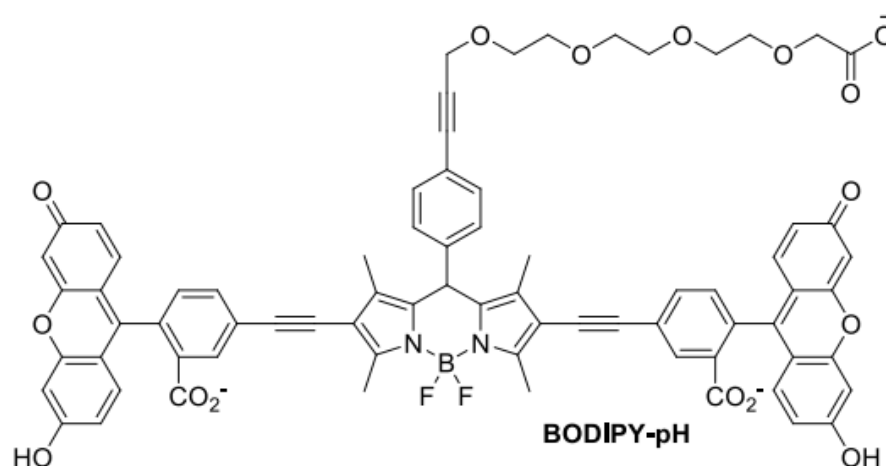


Figure 78 : Exemple de sonde pH basée sur le transfert d'énergie.

Les sondes présentées précédemment ont été développées pour des mesures en solution et ne sont pas directement adaptées aux marquages de gouttelettes, sans faire des étapes supplémentaires et des caractérisations supplémentaires. Nous proposons ici de préparer de nouvelles sondes amphiphiles.

II. Le choix des sondes pH

Notre objectif est ici de concevoir des sondes pH fluorescentes et radiométriques et intégrables dans les gouttelettes d'huile, nous recherchons aussi des pKa autour de 6 pour reconnaître les compartiments acides ($\text{pH} < 6$) des compartiments neutres ou extracellulaires.

Le principe de fonctionnement de ces sondes est qu'il y a une seule émission pour deux absorptions (Figure 79). En effet, la présence ou non d'une charge (délocalisable) permet

d'obtenir des niveaux énergétiques différents donnant au phénol et au phénolate deux absorptions distinctes, cependant seule la forme basique émet car une fois excitée la forme acide se déprotonne instantanément avant de d'émettre.

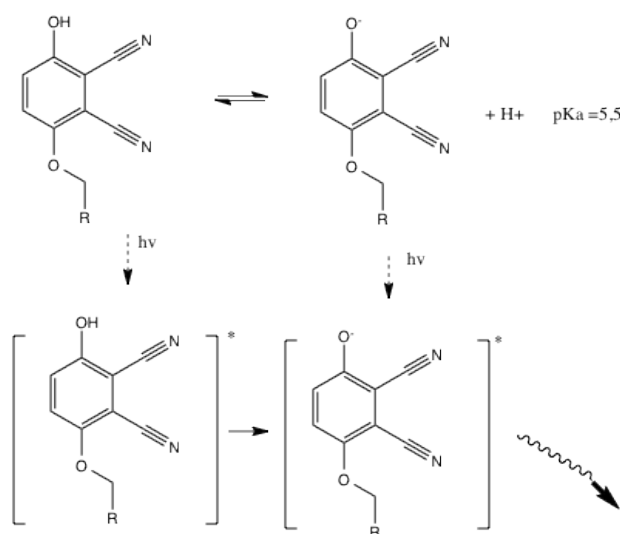


Figure 79 : Principe de fonctionnement des sondes pH.

Le premier indicateur pH exploré est le 1,4- dihydroxyphthalonitrile [151] (1,4-DCHQ) du fait de ses bonnes propriétés initiales (figure 64). En effet, sous sa forme diol, la longueur d'onde d'émission est directement corrélée au pH avec un décalage de 450 nm à 480 nm lors d'une augmentation de pH de 3 à 10. Par contre, les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont dans le bleu et peuvent poser des problèmes avec des cellules, en effet il est nécessaire d'utiliser une lumière excitatrice UV (350-360 nm) qui peut les endommager.

Une seule des deux fonctions phénol est impliquée dans la réaction acide base et la seconde fonction peut être substituée pour introduire une chaîne alkyl pour connecter la partie lipide et ainsi obtenir un fluorophore greffable sensible au pH en une seule étape.

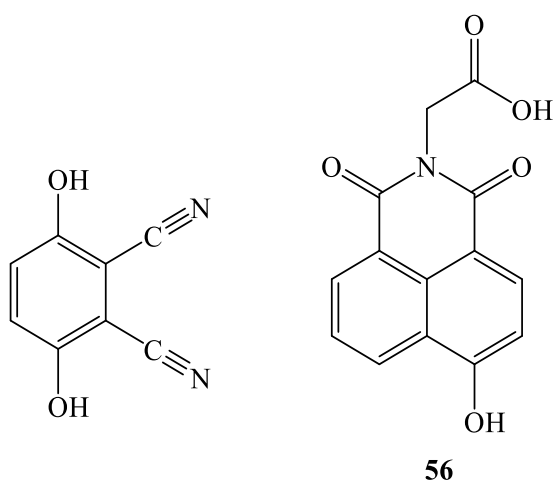


Figure 80 : Gauche : 1,4-dihydroxyphthalonitrile, Droite : 1,8-hydroxynaphtalimide

Le second candidat est un hydroxynaphtalimide (Figure 80), il présente un intermédiaire commun avec des fluorophores déjà synthétisés et ne présentera que peu de bleaching comme les autres fluorophores de la même famille.

A. Sonde DCNQ

1. Synthèse

Afin de pouvoir intégrer la sonde pH aux gouttes il est nécessaire d'ajouter une chaîne alkyle en C14. La synthèse (Figure 81) est une monoalkylation de la dicyanohydroquinone commerciale par du bromotétradécane dans du DMF anhydre, donnant le produit **57** désiré avec un bon rendement de 70%, surtout si on tient compte de la désymétrisation réalisé.

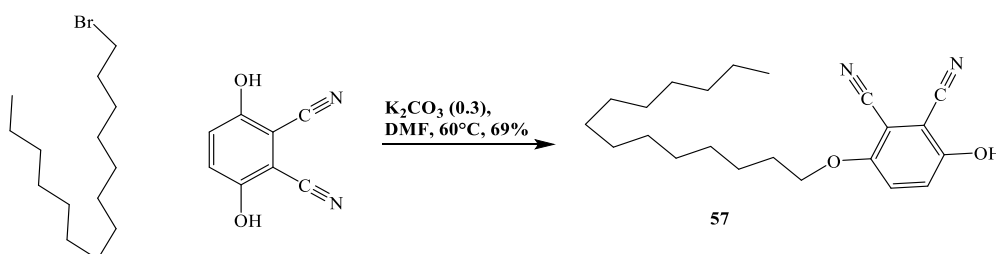


Figure 81 : Synthèse de la sonde pH DCNQ

2. Propriétés physicochimiques

a) Mesure des spectres de fluorescence.

Afin de réaliser les mesures de fluorescence pour déterminer le pKa une solution mère à 0,3 M dans l'acétone a été préparée pour solubiliser le produit **57**. Les mesures des spectres d'émissions et d'excitations ont été réalisées à différents pH dans une solution de tampon universel [152] avec une concentration de $10^{-5}M$ en fluorophore. Le tampon universel est appelé aussi tampon de Britton–Robinson, il s'agit d'un tampon dont le pH peut être ajusté en fonction des besoins d'un pH 2 à pH 12. Il est constitué d'un mélange d'acides de pKa couvrant le domaine 2-12 de sorte que le changement de pH est approximativement proportionnel à la quantité de base ajoutée. Les trois acides utilisés sont H_3BO_3 , H_3PO_4 et CH_3COOH . Les mesures sont effectuées à une concentration suffisamment faible pour que la quantité d'acétone introduite lors de la mesure représente moins de 1% du volume final permettant de négliger son effet sur les spectres émission/absorption.

Les spectres d'émission et d'excitation (Figure 82) montrent clairement qu'il y a effectivement qu'une seule émission (turquoise) à 460 nm quelle que soit la longueur d'onde d'excitation (Figure 82) ainsi que deux longueurs d'ondes d'excitation correspondant respectivement aux deux formes acide (346 nm) et basique (378 nm) (Figure 82 bas).

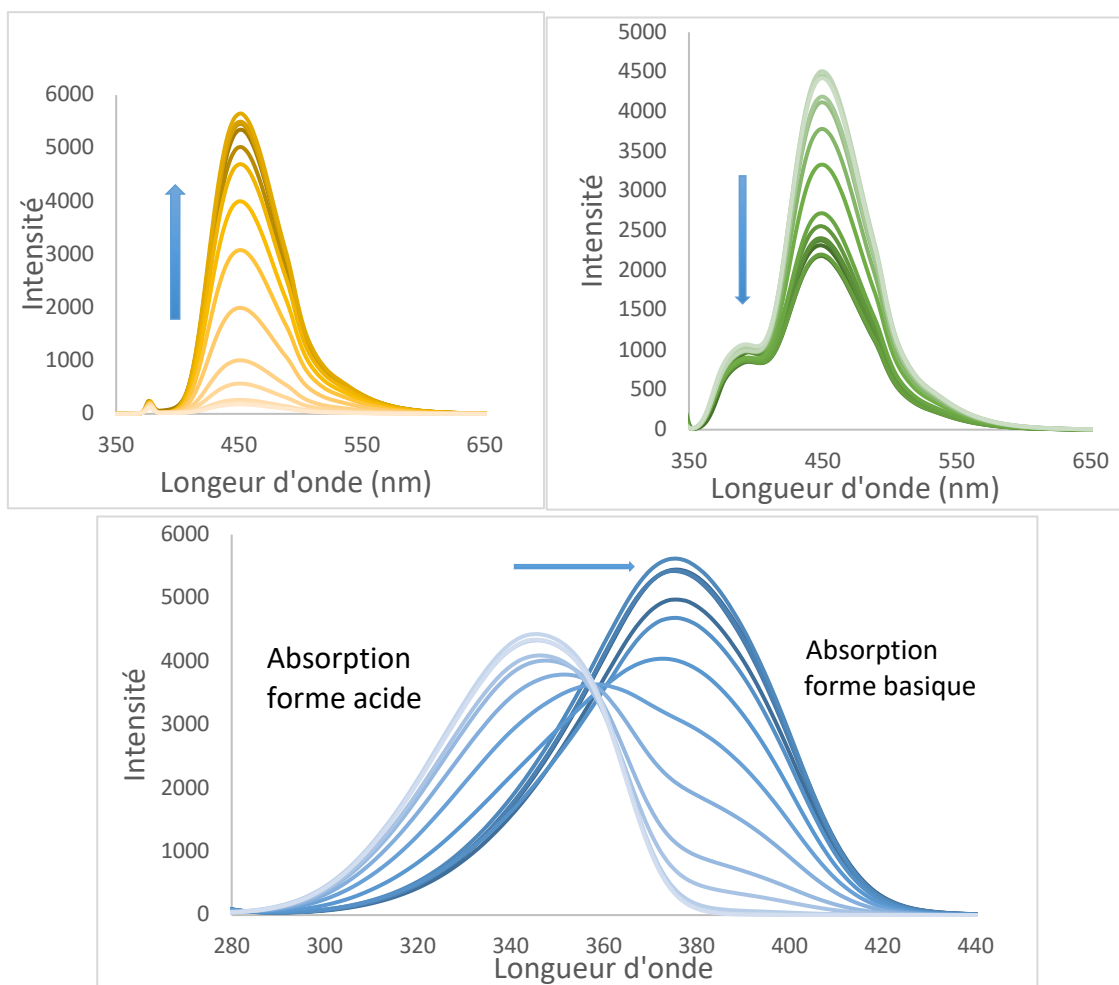


Figure 82 : Haut gauche spectre d'émission de la forme basique en fonction du pH ($\lambda_{ex} = 378 \text{ nm}$) Haut droite spectre d'émission de la forme acide en fonction du pH ($\lambda_{ex} = 346 \text{ nm}$). Bas : spectre d'émission ($\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$). Les flèches indiquent l'augmentation du pH.

Les spectres d'émission montrent clairement que pour une excitation à 378 nm l'intensité de l'émission augmente avec le pH tandis qu'à 346 nm l'intensité de l'émission diminue avec le pH. Ceci permet d'attribuer $\lambda_{ex} = 378 \text{ nm}$ à la forme basique et $\lambda_{ex} = 346 \text{ nm}$ à la forme acide.

b) Détermination du pKa

L'excitation maximale pour la forme acide est à 346 nm et à 378 nm pour la forme basique, l'évolution de l'intensité maximale en fonction du pH pour ces deux longueurs d'ondes est représentée Figure 83 et l'intersection des deux courbes (mi-hauteur de vague) permet d'obtenir le pKa de la sonde pH qui est de 6,0.

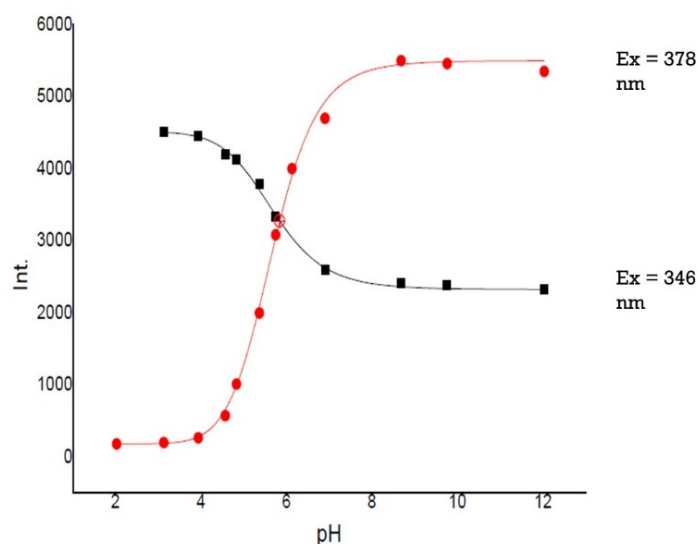


Figure 83 : Maximum d'intensité d'émission en fonction du pH pour $\lambda_{max} = 378 \text{ nm}$ et $\lambda_{max} = 346 \text{ nm}$

L'intensité émise mesurée à la longueur d'onde du phénol (378 nm) et du phénolate (346 nm) ne dépend que de la proportion de chacune des deux formes. Le rapport ainsi mesuré permet de déterminer le pH grâce à ce principe de mesure ratiométrique en émission. Alternativement, le point isoémisif (ex 360 nm) peut être utilisé de façon à éviter les longueurs d'onde trop basses nécessaires à l'excitation optimale de la forme acide de la sonde (346 nm).

B. Sonde hydroxynaphtalimide

1. Synthèse

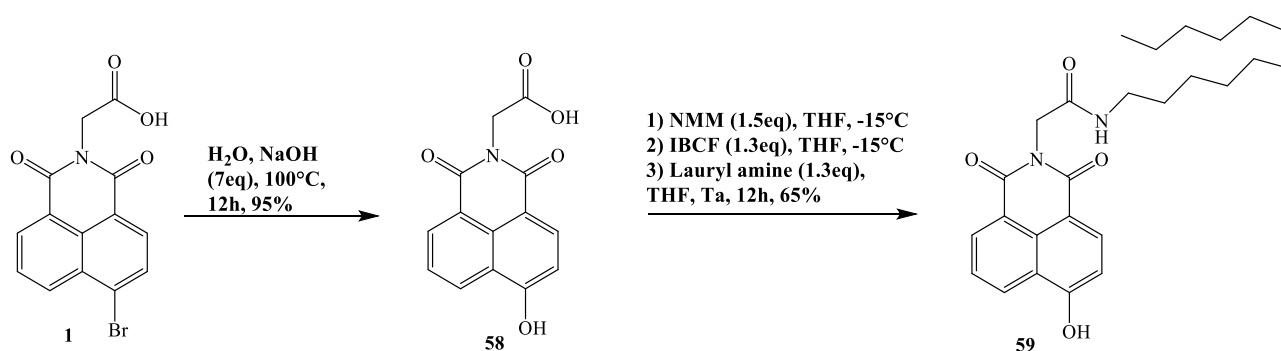


Figure 84 : Synthèse de l'hydroxynaphtalimide

La synthèse se fait à partir de l'intermédiaire **1** (chapitre 2), la première étape est la substitution du groupe bromo par un ion hydroxyde dans l'eau permettant d'obtenir **58** avec un très bon rendement de 95%. La seconde étape est l'introduction de la chaîne alkyle par couplage peptidique. Ce couplage se fait en trois temps déprotonation de l'acide par la N-méthyl morpholine, puis formation de l'anhydride mixte avec l'ajout d'isobutyl chloroformate

permettant d'activer l'acide puis couplage avec la lauryl amine donnant **59** avec un rendement correct de 65%.

2. Propriété physicochimique

a) Mesures des spectres de fluorescences

Les mesures de fluorescence sont réalisées comme précédemment en réalisant une solution mère dans l'acétone puis travail à $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ dans une solution de tampon universel.

Les spectres d'émission et d'excitation obtenus (Figure 85) montrent clairement qu'il y a effectivement qu'une seule émission à 560 nm quelle que soit la longueur d'onde d'excitation (Figure 85 haut) ainsi que deux longueurs d'ondes d'excitation en fonction de la présence majoritaire de la forme acide (380 nm) ou basique (445 nm) (Figure 85 bas).

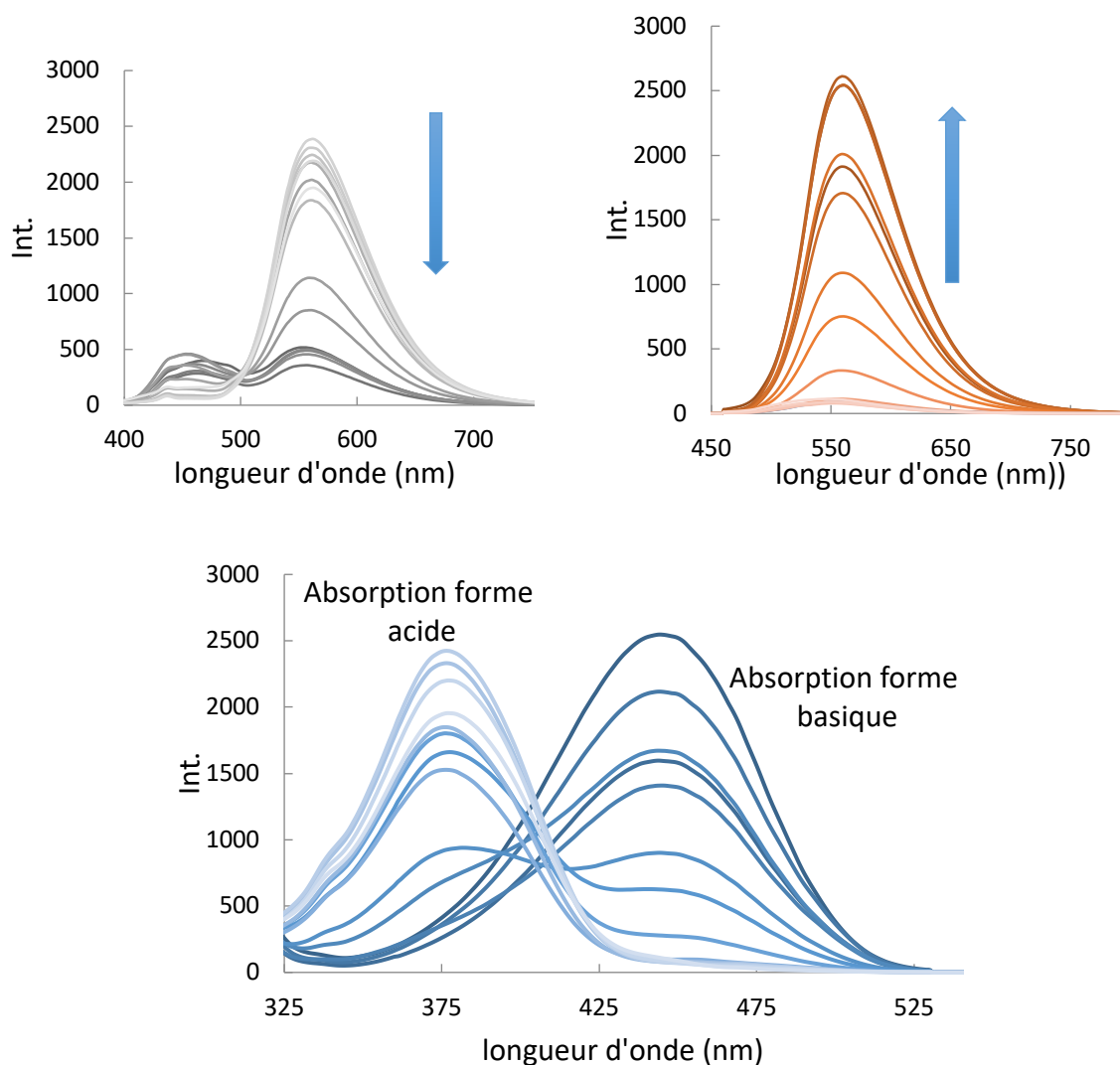


Figure 85 : Haut gauche spectre d'émission de la forme acide en fonction du pH ($\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$) Haut droite spectre d'émission de la forme basique en fonction du pH ($\lambda_{ex} = 445 \text{ nm}$). Bas : spectre d'excitation ($\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$). Les flèches indiquent l'augmentation du pH.

b) Détermination du pKa

L'excitation maximale pour la forme acide est à 386 nm et à 445 nm pour la forme basique, l'évolution de l'intensité maximale en fonction du pH pour ces deux longueurs d'ondes est représentée Figure 86 et l'intersection des deux courbes (mi-hauteur de vague) permet d'obtenir le pKa de la sonde pH qui est aussi de 6,0.

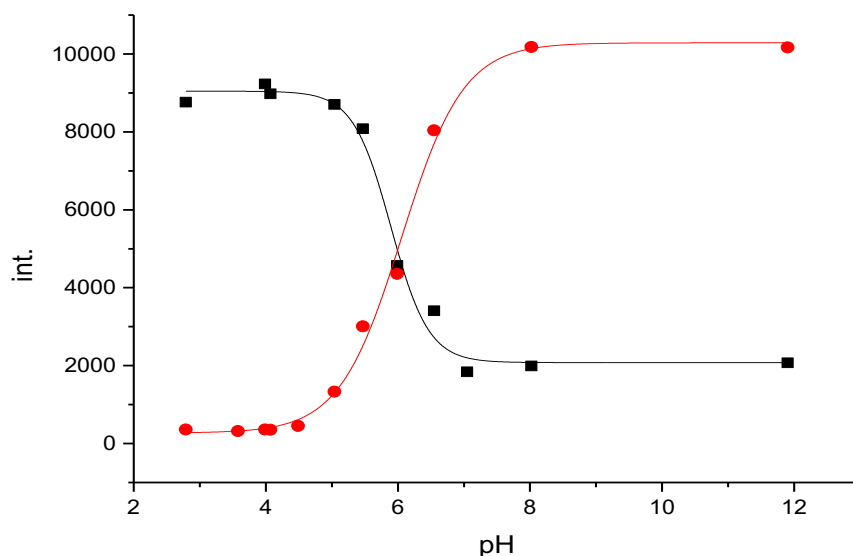


Figure 86 : Maximum d'intensité d'émission en fonction du pH pour $\lambda_{max} = 380 \text{ nm}$ et $\lambda_{max} = 445 \text{ nm}$

Nous avons préparé deux sondes fluorescentes de pH, utilisables dans la zone de pH 5-7, la première est bleue (em 460 nm) la seconde jaune (em 560 nm). Malheureusement lorsque la sonde DCNQ **57** est intégrée aux gouttes d'huiles et passée au microscope à fluorescence il y a un photoblanchiment presque instantané lié à la puissance de la source d'excitation. Pour la sonde hydroxy naphthalimide **59** les essais en gouttes n'ont pas été réalisés mais seront à faire par la suite.

Conclusion

Certains agents pathogènes ou cellules tumorales échappent au système immunitaire parce que les cellules immunitaires ne reconnaissent pas les peptides ou protéines présents à leur surface. Les approches thérapeutiques, favorisant la reconnaissance de ces peptides ou protéines faiblement immunogènes sont donc très attractives. À cette fin, certains systèmes ont été décrits, à base de liposome ou de nanoparticules. Cependant les gouttes d'huile fonctionnalisées présentent une alternative intéressante à ces plateformes pour la vectorisation vers les cellules dendritiques.

Ce projet a consisté à la fabrication de gouttes d'huile fonctionnalisées avec des glycolipides et des sondes pH pour la vectorisation. À cet effet nous avons synthétisé différentes structures fluorescentes de mannosides et galactosides afin d'évaluer la reconnaissance spécifique par des lectines en solution. Ces glycolipides présentent l'avantage d'être facilement et rapidement synthétisés et ne sont donc plus un facteur limitant pour la construction des gouttes fonctionnalisées.

La fabrication et fonctionnalisation des gouttes à l'aide du mortier nous a permis d'obtenir rapidement les gouttes fonctionnalisées par les différents glycolipides en utilisant une quantité minimum des produits synthétisés. Nous avons montré la bonne fonctionnalisation grâce au microscope à fluorescence, en effet les glycolipides répartis à la surface des gouttes forment, au microscope, une couronne lumineuse sur la surface des gouttes.

Nous avons isolé une première sonde pH présentant un pKa de 6 compatible avec le pH des milieux biologiques. Cependant l'étude de cette sonde avec les gouttes devra être faite et notamment il faudra montrer qu'une fois à la surface des gouttes la sonde pH est bien sensible au pH.

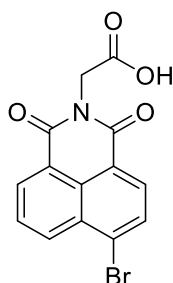
À plus long terme il sera nécessaire de développer d'autres fluorophores compatibles avec ceux déjà utilisés pour les glycolipides et la sonde pH afin de pouvoir fonctionnaliser les gouttes avec d'autres éléments tels que la « charge utile » (par exemple des peptides). Cela permettra de pouvoir suivre tous les éléments de la goutte dans un même temps.

Partie expérimentale

I. Synthèse organique

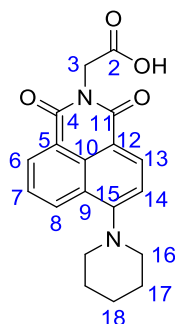
General Methods: Chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich or TCI and were used as received. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 MHz spectrometer. All chemical shifts (δ) for ^1H and ^{13}C NMR spectra are reported in parts per million (ppm) relative to the internal residual solvent signals. The abbreviations used are: singlet (s), doublet (d), doublet of doublet (dd), triplet (t), doublet of triplet (dt), multiplet (m) and coupling constants are reported in hertz (Hz). Mass spectrometry analysis was performed at Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP). The abbreviation used is: electrospray (ESI). Thin layer chromatography (TLC) analysis was run on silica gel (Merck 60F – 254) with visualisation at 254 nm. Flash column chromatography was carried out using silica gel (Merck, particles size 0.040 – 0.063 mm).

4-bromo-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide (1)



4-Bromo-1,8-naphthalic anhydride (1.0 g, 4.0 mmol, 1 eq) was reacted with glycine (410 mg, 6 mmol, 1.5 eq) at 115 °C in the mixture of DMF (10 ml) and acetic acid (5 ml) during 3h. The reaction mixture was allowed to cool slowly, followed by dilution with water to precipitate the product and filtered. The solid was dried on vacuum, without further purification, to give 1.13 g of **1** as a pale yellow powder. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (m, 1H, H Ar), 8.61 - 8.57 (m, 1H, H Ar), 8.38 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H Ar), 8.26 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H Ar), 8.04 (dd, 1H, $J = 8.6$ Hz, $J = 7.3$ Hz H Ar), 4.72 (s, 2H, CH_2COOH). NMR data are in agreement with the literature. [104]

4-piperidiny-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide (2)

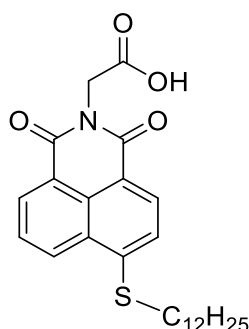


A mixture of **1** (500 mg, 1.496 mmol) in piperidine (5 ml) was stirred at 100 °C during 4h. The mixture was concentrated, the residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was

dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give 480 mg of **2** (99%) as a bright yellow/orange solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.61 - 8.35 (m, 3H, H₆, H₈, H₁₃), 7.67 (m, 1H, H₇), 7.17 (m, 1H, H₁₄), 4.90 (s, 2H, H₃), 3.23 (t, 4H, *J*_{16,17} = 6.2 Hz, H₁₆), 1.87 (dt, *J*_{16,17} = 6.2 Hz, *J*_{17,18} = 5.6 Hz, 4H, H₁₇), 1.71 (dt, 2H, *J*_{17,18} = 5.6 Hz, H₁₈). ¹³C NMR (75MHz), Chloroform-*d*) δ 163.82 (C₁₁), 163.25 (C₄), 157.67 (C₁₅), 133.11 (C₁₃), 131.41 (C₈), 131.05 (C₆), 130.10 (C₁₀), 125.36 (C₇), 122.8 (C₉), 115.41 (C₅), 114.73 (C₁₄), 114.30 (C₁₂), 77.45 (C₂), 70.20 (C₁), 54.53 (C₁₆), 29.23 (C₃), 26.20 (C₁₇), 24.23 (C₁₈)

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₉H₁₈N₂O₄ : 361.1160, found : 361.1159

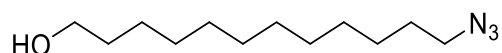
4-laurylthio-N-carboxyméthyl-1,8-naphthalimide (**3**)



A mixture of **1** (500 mg, 1.5 mmol, 1 eq), K₂CO₃ (1 g, 7 mmol, 5 eq), and 1-dodecane thiol (1.5 g, 7 mmol, 5 eq) in DMF (10 ml) was stirred at 110°C during 12h. The mixture was concentrated, the residue was dissolved in DCM and washed with HCl 1M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 10:0 to 8:2) to give 660 mg (95%) of **3** as a bright yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 – 8.50 (dd, 2H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 8.5 Hz, H_{Ar}), 8.42 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.71 (dd, *J* = 8.5, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.87 (s, 1H, CHCOOH), 3.18 – 3.05 (m, 4H, CH_{2Alkyl}), 1.77 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{2Alkyl}), 1.54 – 1.42 (m, 2H, CH_{2Alkyl}), 1.37 – 1.21 (m, 4H, CH_{2Alkyl}), 1.21 (m, 8H, CH_{2Alkyl}), 0.94 – 0.73 (t, 3H, CH_{3Alkyl}). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 139.12, 127.11, 126.41, 125.83, 121.79, 117.68 (C_{Ar}), 72.53 (CH₂COOH), 36.49 (CH₂S), 27.42, 27.11, 24.83, 24.77, 24.68, 24.54, 24.36, 24.21, 23.50, 17.89 (CH_{2Alkyl}), 9.29 (CH_{3Alkyl}).

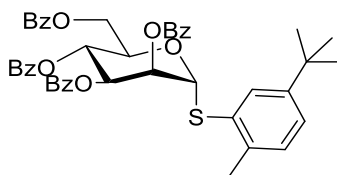
ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₆H₃₃NO₄S : 478.2020, found : 478.2023

11 azido undecan-1-ol (**4**)



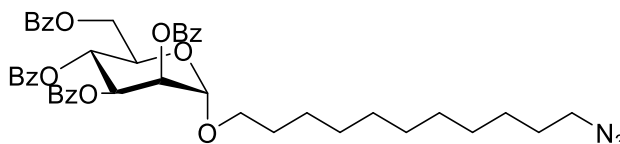
To a mixture of 11-bromoundecanol (50 g, 40 mmol, 1 eq) in DMF (50 ml) was added NaN₃ (7.8 g, 120 mmol, 3 eq). The mixture was stirred overnight at 80°C and concentrated. The residue was extracted with DCM/ water, the organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated, without further purification to give 8.40 g of **4** (99%) as a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.69 - 1.18 (m, 18H). NMR data are in agreement with the literature. [104]

(2-Méthyl-5-tert-butylphenyl) 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside (5 and 7)



Benzoyl chloride (17 ml, 146.6 mmol, 4.4 eq) was added dropwise to a cooled (0 °C) solution of D-mannose (5 g, 27.8 mmol, 1 eq) in pyridine (30 ml). The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature and concentrated. A solution of the residue in DCM was washed with aq HCl, water, a saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was crystallised in ethanol to give pentabenzoyl-D-mannopyranose **5** (18.5 g, 95%). To a solution of this product (5.00 g, 7.142 mmol) in anhydrous DCM (10 ml), were added under argon, 2-méthyl-5-tert-butylthiophenol (1.97 ml, 10.71 mmol, 1.5 eq) and BF₃.Et₂O (4.52 ml, 35.71 mmol, 5 eq). The mixture was allowed to stir overnight and was neutralised with a saturated NaHCO₃ solution at 0 °C. The mixture was diluted with DCM, the organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 9:1) to give 4.780 g **7** (90%) as white foam. NMR data are in agreement with literature. [109]

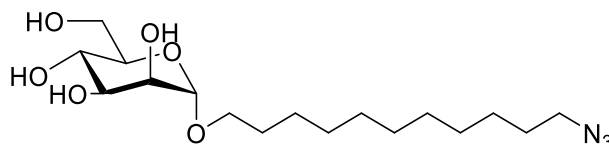
(11-azidoundécyl) 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranoside (6)



To a mixture of **7** (3.0 g, 39.531 mmol, 1.0 eq), **4** (1.01 g, 47.438 mmol, 1.2 eq) and 4Å molecular sieves (3.0 g) in anhydrous DCM (20 ml), was added under argon, NIS (1.78 g, 79.062 mmol, 2 eq) and TfOH (0.14 ml, 15.812 mmol, 0.4 eq). The mixture was allowed to stir for 20 min and was then filtered, extracted with DCM and washed with saturated NaHCO₃ and Na₂S₂O₃ solutions. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/DCM 9:1 to 5:5) to give 2,57 g of **6** (76%) as a yellow syrup. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.23 - 7.16 (m, 22H, H Bz), 6.12 (t, 1H, *J*_{3,4} = 10.0 Hz, H₄), 5.94 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 10.1 Hz, *J*_{2,3} = 3.3 Hz, H₃), 5.71 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3.3 Hz, *J*_{1,2} = 1.8 Hz, H₂), 5.11 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1.8 Hz, H₁), 4.72 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 11.9 Hz, *J*_{5,6} = 2.4 Hz, H_{6a}), 4.57 - 4.38 (m, 2H, H₅, H_{6b}), 3.85 (dt, 1H, *J* = 9.6 Hz, *J* = 6.7 Hz, OCH_aH_b), 3.59 (dt, 1H, *J* = 9.6 Hz, *J* = 6.6 Hz, OCH_aH_b), 3.27 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂N₃), 1.86 - 1.07 (m, 18H, CH₂ Alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.15 - 166.15 - 165.50 - 133.42 - 133.14 - 133.03 - 129.84 - 129.80 - 129.72 - 129.39 - 129.39 - 129.12 - 129.12 - 129.02 - 129.02 - 128.57 - 128.41 - 128.29 (C_{Bz}) 97.63 (C₁), 70.66 (C₃), 70.16 (C₂), 68.79 (CH₂O), 67.07, (C₅, C₄) 62.97 (C₆), 51.49 (CH₂N₃), 29.53 - 29.48 - 29.38 - 29.15 - 28.84 - 26.73 - 26.12 (CH₂Alkyl).

ESI-HRMS m/z $[M+Na^+]$ calculated for $C_{45}H_{49}N_3O_{10}$: 814.3310, found : 814.3311

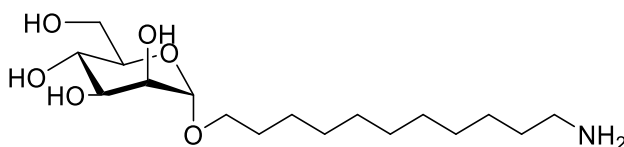
(11-azido undécyl)- α -D-mannopyranoside (8)



To a mixture of **6** (430 mg, 0.543 mmol, 1.0 eq) in methanol (10 ml) was added Na (cat). The mixture was allowed to stir overnight. The mixture was neutralised (IR120 " H⁺ "), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 10:0 to 9:1) to give 190 mg of **8** (93%) as a syrup. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.83 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H₁), 4.05 - 3.90 (m, 3H, H₂, H₄, H₆), 3.86 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H₃), 3.78 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, H₆), 3.64 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.7$ Hz, OCH_aH_b), 3.53 (d, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H₅), 3.40 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.5$ Hz, OCH_aH_b), 3.27 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH₂N₃), 1.69 - 1.46 (m, 4H, CH₂ Alkyl), 1.46 - 1.20 (m, 14H, CH₂ Alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 99.99 (C₁), 72.12 (C₅), 71.70 - 71.13 (C₃, C₄), 67.97 (CH₂O), 66.15 (C₂), 60.96 (C₆), 51.49 (CH₂N₃), 29.55 - 29.53 - 29.49 - 29.45 - 29.42 - 29.17 - 28.85 - 26.74 - 26.12 (CH₂Alkyl).

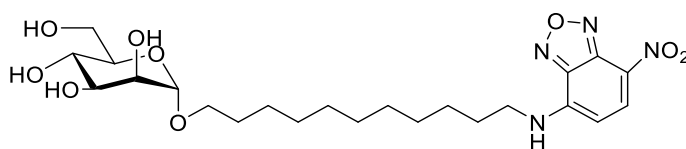
ESI-HRMS m/z $[M+Na^+]$ calculated for $C_{17}H_{33}N_3O_6$: 398.2259, found : 398.2262

(11-amino undécyl)- α -D-mannopyranoside (9)



To a mixture of **8** (247 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq) in THF (8 ml) was added PPh₃ (259 mg, 10.0 mmol, 1.5 eq) and water (5 ml). The mixture was allowed to stir overnight. The mixture was evaporated and the residue washed with cyclohexane three times and used without further purification.

(11 NBD- amino undecane)- α -D-mannopyranoside (10)

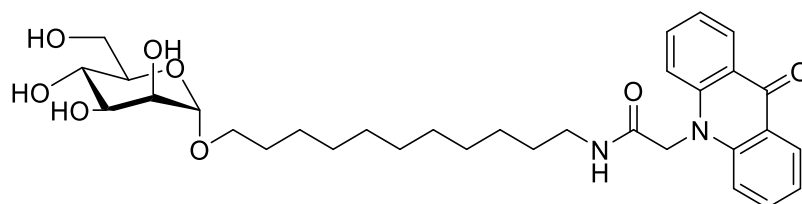


A mixture of **9** (299 mg, 0.9 mmol, 1 eq), NBD-Cl (171 mg, 0.9 mmol, 1eq), and Et₃N (104 mg, 1 mmol, 1.2 eq) in DMF was stirred overnight. The mixture was concentrated, the residue was dissolved in DCM and the organic layer was washed with water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/EtOH 10:0

to 8:2) to give 90 mg of **1** (25%) as a bright red solid. (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (1H, d, H_{ArNBD}), 8.43 (1H, d, H_{ArNBD}), 4.83 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H_1), 4.05 - 3.90 (m, 3H, H_2, H_4, H_6), 3.86 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H_3), 3.78 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, H_6), 3.64 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.7$ Hz, OCH_aH_b), 3.53 (d, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H_5), 3.40 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.5$ Hz, OCH_aH_b), 3.30 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH_2NH), 1.69 - 1.46 (m, 4H, CH_2 Alkyl), 1.46 - 1.20 (m, 14H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 132.97, 131.26, 130.76, 125.18, 114.54 (C_{ArNBD}), 100.05 (C_{1man}), 72.25 (C_{5man}), 71.55 (C_{3man}), 70.98 (C_{2man}), 67.73 (CH_2O Alkyl), 66.43 (C_{4man}), 61.04 (C_{6man}), 39.82 (CH_2NH alkyl), 29.46 - 29.29 - 26.92 (CH_2 Alkyl).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{23}H_{36}N_4O_9$: 535.2372, found : 535.2374

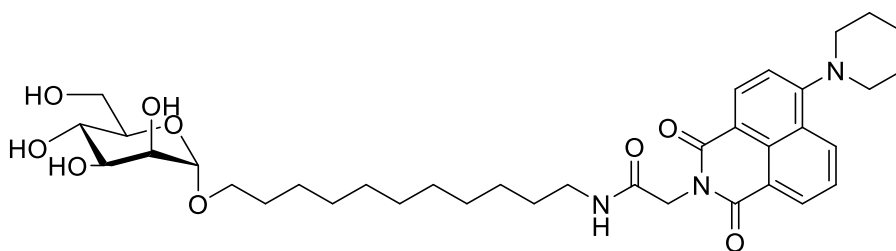
Acridone labelled α -D-manno lipid (**11**)



A mixture of **9** (320 mg, 1.0 mmol, 1 eq), N-carboxyméthyl acridone (350 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq), EDC (1,5 equiv) and DMAP (200 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) in DMF was stirred over night at 60°C. The mixture was concentrated and dried over vacuum. The crude was dissolved in pyridine (5 ml) and Ac_2O (2 ml) was added and the mixture was stirred 2h. Then the mixture was concentrated, dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/CyHex 5:5). The purified acetylated product was dissolved in MeOH (5 ml) and Na (cat) was added. The mixture was stirred 2h and neutralized with IR120 « H^+ » form and concentrated to give 160 mg of **11** (39%) as a grey solid. (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.83 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.88 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H_1), 4.10 - 3.95 (m, 3H, H_2, H_4, H_6), 3.90 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H_3), 3.82 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, H_6), 3.69 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.7$ Hz, OCH_aH_b), 3.59 (d, 1H, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, H_5), 3.47 (dt, 1H, $J = 9.6$ Hz, $J = 6.5$ Hz, OCH_aH_b), 3.42 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH_2NH), 1.70 - 1.50 (m, 4H, CH_2 Alkyl), 1.46 - 1.19 (m, 14H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ = 177.2, 170.5, 142.6, 134.7, 127.1, 122.1, 121.9, 116.2 ($C_{Acridonne}$), 100.1 (C_{1man}), 72.30 (C_{5man}), 71.59 (C_{3man}), 70.90 (C_{2man}), 67.68 (CH_2O Alkyl), 66.50 (C_{4man}), 61.10 (C_{6man}), 47.91 ($CH_2C(O)NH$), 39.90 (CH_2NH alkyl), 29.44 - 29.28 - 26.18 (CH_2 Alkyl).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{32}H_{44}N_2O_8$: 607.2990, found : 607.2990

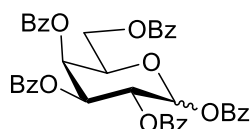
(4-piperidinyl-N--1,8-naphthalimide labelled α -D-mannolipid (**12**))



To a mixture **11** (230 mg, 0.658 mmol, 1 eq) and **2** (330 mg, 0.987 mmol, 1.5 eq) in DMF, was added DMAP (0.1 g, 0.790 mmol, 1.2 eq) and EDC (0.2 g, 0.987 mmol, 1.5 eq). The mixture was stirred at 60°C overnight. The reaction mixture was allowed to cool and concentrated, the residue was dissolved in DCM and washed with aq HCl 1M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 10:0 to 8:2) to give 90 mg of **12** (25%) as a bright yellow solid. (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.51 (1H, dd, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, H_{8Naphta}), 8.43 (1H, d, *J* = 8 Hz, H_{13Naphta}), 8.31 (1H, dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, H_{6Naphta}), 7.61 (1H, dd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, H_{7Naphta}), 7.11 (1H, d, *J* = 8 Hz, H_{14Naphta}), 6.38 (1H, t, *J* = 6 Hz, H_{1Naphta}), 4.80 (4H, m, H_{1man}, H_{3Naphta}, CH₂C(O)NH), 3.86 (5H, m, H_{2man}, H_{3man}, H_{4man}, H_{6aman}, H_{6bman}), 3.62 (1H, q, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, CH_aH_bO), 3.53 (2H, d, *J*_{5,6} = 9 Hz, H_{5man}), 3.37 (2H, q, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, CH_aH_bO), 3.23 (6H, m, CH₂NHC(O), H_{16Naphta}), 1.95 – 1.62 (6H, m, H_{17Naphta}, H_{18Naphta}), 1.62 – 1.41 (5H, m, CH₂ Alkyl), 1.41 – 1.12 (18H, m, CH₂ Alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 132.97 (C_{13Naphta}), 131.26 (C_{8Naphta}), 130.76 (C_{6Naphta}), 125.18 (C_{7Naphat}), 114.54 (C_{14Naphta}), 100.05 (C_{1man}), 72.25 (C_{5man}), 71.55 (C_{3man}), 70.98 (C_{2man}), 67.73 (CH₂O Alkyl), 66.43 (C_{4man}), 61.04 (C_{6man}), 54.43 (C_{16Naphta}), 42.92 (C_{3Naphta}), 39.82 (CH₂NH alkyl), 29.46 - 29.29 - 26.92 (CH₂ Alkyl), 26.17 (C_{17Naphta}), 24.29 (C_{16Naphta}).

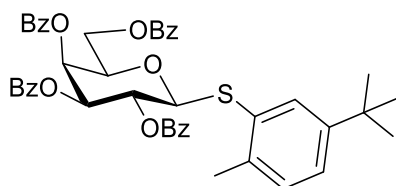
ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₃₆H₅₁N₃O₉ : 692.3517, found : 692.3518

1,2,3,4,6-Penta-O-benzoyl-α/β-D-galactopyranoside. (13)



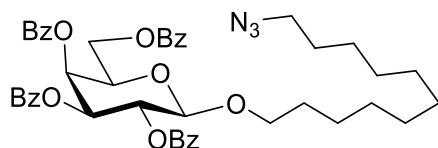
Benzoyl chloride (8.5 ml, 73.29 mmol, 11.0 eq) was added in one portion at 0 ° C to a mixture of D-galactose (1.2 g, 6.67 mmol, 1.0 eq) and pyridine (15 ml). The mixture was stirred overnight at room temperature, quenched with MeOH (10 ml) at 0 ° C, and concentrated. This residue was dissolved in DCM (100 ml), washed with aq 1 M HCl (50 ml), sat. aq NaHCO₃ (50 ml) and brine (50 ml). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash column chromatography (5:1 cyclohexane–EtOAc) to give 4.67 g of **13** (91%) as a white foam. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*): δ 8.20–7.83 (m, 10H, Ar H), 7.70–7.30 (m, 15H, Ar H), 6.66 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.3 Hz, H₁), 6.09 (t, 1H, *J*_{3,4} = 3.9 Hz, H₃), 5.89 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 3.4 Hz, H₂), 5.69 (dd, 1H, *J*_{4,5} = 1.7 Hz, H₄), 4.90 (m, 1H, H₅), 4.66 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 6.9 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.6 Hz, H_{6a}), 4.55 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 6.0 Hz, H_{6b}). NMR data are in agreement with the literature [109]

1-(2-Méthyl-5-tert-butylphenyl) 1- thio 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactopyranoside. (14)



To a solution of **13** (10.0 g, 14.0 mmol) in anhydrous DCM (10 ml), were added under argon, 2-méthyl-5-tert-butylthiophenol (3.94 ml, 21.0 mmol, 1.5 eq) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (8.81 ml, 71.0 mmol, 5 eq). The mixture was allowed to stir overnight and was neutralised with a saturated NaHCO_3 solution at 0 °C. The product was extracted with DCM, the organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 9:1) to give 3.15 g of **14**. (80%) as a white foam. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.21 - 7.01 (m, 23H, Ar H), 6.05 (d, 1H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H_4), 5.89 (t, 1H, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, H_2), 5.64 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H_3), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, H_1), 4.68 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11.0$ Hz, $J_{6,5} = 6.1$ Hz, H_{6a}), 4.50 - 4.31 (m, 2H, H_{6b} , H_5), 2.35 (s, 3H, CH_3), 1.25 (s, 9H, t-Bu). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.04 - 165.51 - 165.27 - 149.70 - 138.52 - 133.56 - 133.33 - 133.27 - 132.08 - 131.11 - 130.12 - 130.03 - 129.97 - 129.82 - 129.79 - 129.38 - 129.35 - 129.04 - 128.79 - 128.65 - 128.50 - 128.44 - 128.38 - 128.29 - 126.04 - 124.98 (C_{Ar}), 88.08 (C_1), 74.96 (C_5), 72.93 (C_3), 68.51 (C_2), 68.32 (C_4), 62.23 (C_6), 34.38 (C t-Bu), 31.23 (CH_3 t-Bu), 20.65 (CH_3).

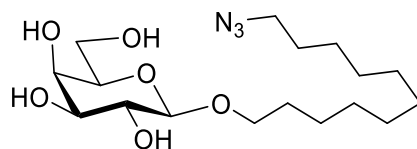
1-(11 Azidoundécyl) 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-galactopyranoside (**15**)



To a mixture of **14** (3.0 g, 1.318 mmol), **4** (1.01 g, 4.9 mmol, 1.2 eq) and 4 Å molecular sieves (3.0 g) in anhydrous DCM (20 ml), was added under argon, NIS (1.78 g, 7.9 mmol, 2 eq) and TfOH (0.07 ml, 0.792 mmol, 0.2 eq). The mixture was allowed to stir for 15 min and was then filtered, extracted with DCM and washed with saturated NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solutions. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex /DCM 9:1 to 5:5) to give 2.77 g of **15** (86%) as a syrup. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 - 7.26 (m, 20H, H_{Ar}), 5.99 (dd, 1H, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, $J_{4,5} = 1.1$ Hz, H_4), 5.79 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H_2), 5.61 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H_3), 4.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H_1), 4.69 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11.1$ Hz, $J_{5,6} = 6.4$ Hz, H_{6b}), 4.49 - 4.24 (m, 2H, H_5 , H_{6b}), 3.98 (dt, 1H, $J = 9.8$ Hz, $J = 6.2$ Hz, OCH_aH_b Alkyl), 3.57 (dt, 1H, $J = 9.8$ Hz, $J = 6.7$ Hz, OCH_aH_b Alkyl), 3.25 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2N_3), 1.55 (m, 6H, CH_2 Alkyl), 1.40 - 0.97 (m, 18H, CH_2 Alkyl). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 165.60 - 133.28 - 133.16 - 129.93 - 129.81 - 129.70 - 128.60 - 128.38 - 128.22 (C_{Ar}), 96.52 (C_1), 69.41 (C_3), 69.27 (CH_2O), 68.82 (C_2), 68.54 (C_4), 66.86 (C_6), 51.49 (CH_2N), 29.41 - 29.28 - 29.11 - 28.83 - 26.71 - 26.09 (CH_2 Alkyl).

ESI-HRMS m/z [$\text{M} + \text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 814.3310, found : 814.3312

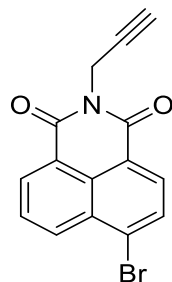
11-Azidoundécyl- β -D-galactopyranoside (**16**)



To a mixture of **15** (1.570 g, 2.0 mmol, 1 eq) in methanol (20 ml) was added Na. The mixture was allowed to stir overnight. The mixture was neutralised (IR120 " H⁺ "), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 10:0 to 8:2) to give 562 mg of **16** (90%) as a syrup. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.25 (d, 1H, *J*_{1,2} = 6.4 Hz, H₁), 4.06 (s, 1H, H₃), 3.86 (m, 3H, H_{6a}, H_{6b}, CH_aH_bO Alkyl), 3.63 (m, 2H, H₂, H₄), 3.53 (m, 2H, H₅, CH_aH_bO), 3.27 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂N₃), 1.61 (m, 4H, CH₂ Alkyl), 1.31 (m, 16H, CH₂ Alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 103.30 (C₁), 74.13 (C₅), 73.55 (C₄), 71.29 (C₂), 70.49 (CH₂O Alkyl), 68.76 (C₃), 61.12 (C₆), 51.46 (CH₂N₃), 29.64, 29.59, 29.54, 29.51, 29.18, 28.84, 26.72, 25.88 (CH₂ Alkyl).

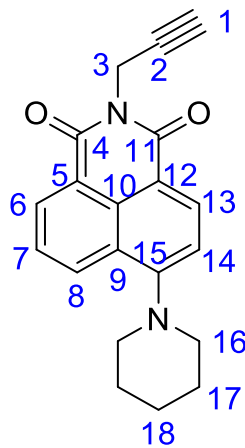
ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₇H₃₃N₃O₆ : 398.2259, found : 398.2262

4-bromo-N-propargyl-1,8-naphthalimide (**18**)



To a suspension of 4-Bromo-1,8-naphthalic anhydride (2.0 g, 7.218 mmol, 1 eq) and propargylamine (0.55 ml, 10 mmol, 1.5 eq) in ethanol was refluxed for 8 hours. The mixture was then concentrated, dissolved in DCM and washed with NaOH 0.2 M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give 2.20 (99%) of **18** as a white solid NMR data in agreement with the literature. [153]

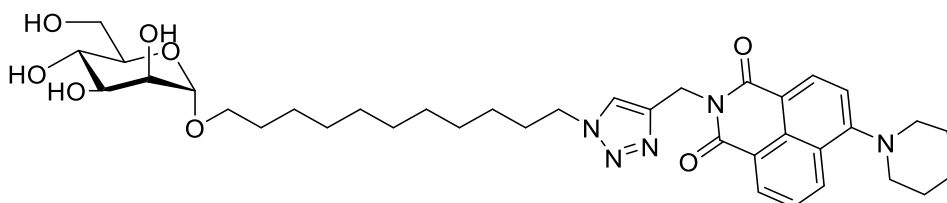
4-piperidinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide (**19**)



A mixture of **18** (1.0 g, 3.0 mmol) in piperidine (20 ml) was stirred at 100 °C during 4h. The mixture was evaporated, dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give 1.0 g of 4-piperidinyl-N-propargyl-1,8-naphthalimide (99%) as a bright yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.53 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.2 Hz, H₈), 8.46 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₁₃), 8.33 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.3 Hz, H₆), 7.61 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, H₇), 7.11 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₁₄), 4.88 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz, H₃), 3.17 (m, 4H, H₁₆), 2.10 (m, 1H, H₁), 1.82 (m, 4H, H₁₇), 1.68 (m, 2H, H₁₈). ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 163.82 (C₁₁), 163.25 (C₄), 157.67 (C₁₅), 133.11 (C₁₃), 131.41 (C₈), 131.05 (C₆), 130.1 (C₁₀), 125.36 (C₇), 122.8 (C₉), 115.41 (C₅), 114.73 (C₁₄), 114.3 (C₁₂), 77.45 (C₂), 70.20 (C₁), 54.53 (C₁₆), 29.23 (C₃), 26.20 (C₁₇), 24.33 (C₁₈).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₀H₁₈N₂O₂ : 341.1261, found : 341.1260

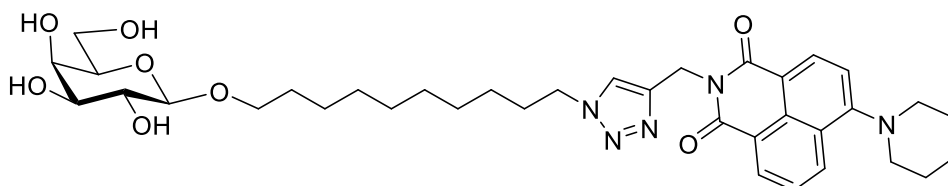
α- Mannolipide (20)



To a solution of **8** (250 mg, 0.667 mmol, 1 eq) and **19** (504 mg, 1.332 mmol, 2 eq) in anhydrous THF (5 ml) was added DIEA (0.2 ml, 1.332 mmol, 2 eq) and CuI (25.0 mg, 0.133 mmol, 0.2 eq). The mixture was stirred overnight under argon atmosphere. The mixture was concentrated, dissolved in DCM and washed with aq Na₂HEDTA 0.2 M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 10:0 to 8:2) to give 341 mg of **20** (72%) as a yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.73 – 8.29 (3H, m, H₈Naphta, H₁₃Naphta, H₆Naphta), 7.76 – 7.45 (2H, m, H₁Naphta, H₇Naphta), 7.20 – 7.06 (1H, dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, H₁₄Naphta), 5.53 – 5.29 (2H, s, H₃Naphta), 4.83 (d, 1H, *J*_{1,2} = 1.4 Hz, H₁), 4.05 - 3.90 (m, 4H, H₂, H₄, H₆, CH₂N_{triazole}), 3.86 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 9.6 Hz, *J*_{2,3} = 3.1 Hz, H₃), 3.78 (d, 1H, *J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, H₆), 3.64 (dt, 1H, *J* = 9.6 Hz, *J* = 6.7 Hz, OCH_aH_b), 3.53 (d, 1H, *J*_{5,6} = 9.5 Hz, H₅), 3.40 (m, 3H, OCH_aH_b, CH₂N_{triazole}), 3.26 – 3.12 (4H, m, H₁₆Naphta), 1.69 - 1.46 (m, 4H, CH₂ Alkyl), 1.46 - 1.20 (m, 18H, CH₂ Alkyl, H₁₇Naphta, H₁₈Naphta). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.73 – 164.43 – 163.91 – 143.63 (C_{quaternaire}) 133.05 (C₁₃Naphta), 131.33 (C₈Naphta), 131.08 (C₆Naphta), 126.12 (C_{quaternaire}), 125.29 (C₇), 123.25 (CH_{Triazol}), 115.13 (C_{quaternaire}), 114.66 (C₁₄Naphta), 99.99 (C₁), 72.12 (C₅), 71.70 - 71.13 (C₃, C₄), 70.00 (CH₂N_{triazole}), 67.97 (CH₂O), 66.15 (C₂), 60.96 (C₆), 54.44 (C₁₆Naphta), 50.30 (CH₂O), 34.94 (C₃Naphta), 29.55 - 29.53 - 29.49 - 29.45 - 29.42 - 29.17 - 28.85 - 26.74 - 26.12 (CH₂Alkyl).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₇H₃₃N₃O₆ : 398.2259, found : 398.2252

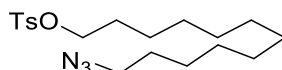
β- Galactolipid (21)



To a solution of **16** (250 mg, 0.667 mmol, 1 eq) and **19** (504 mg, 1.332 mmol, 2 eq) in anhydrous THF (5 ml) was added DIEA (0.2 ml, 1.332 mmol, 2 eq) and CuI (25.0 mg, 0.133 mmol, 0.2 eq). The mixture was stirred overnight under argon atmosphere. The mixture was concentrated, dissolved in DCM and washed with Na₂HEDTA 0.2 M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 10:0 to 8:2) to give 341 mg of **21** (75%) as a bright yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.73 – 8.29 (3H, m, H₈Naphta, H₁₃Naphta, H₆Naphta), 7.76 – 7.45 (2H, m, H₁Naphta, H₇Naphta), 7.20 – 7.06 (1H, dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, H₁₄Naphta), 5.53 – 5.29 (2H, s, H₃Naphta), 4.41 – 4.06 (3H, m, H₁man, CH₂O), 4.00 – 3.63 (4H, m, H₄man, H₆man, CH₂N_{triazole}), 3.50 – 3.43 (3H, m, H₂man, H₃man, H₅man, CH₂N_{triazole}), 3.26 – 3.12 (4H, m, H₁₆Naphta), 1.93 – 1.03 (24H, m, CH₂ Alkyl, H₁₇Naphta, H₁₈Naphta). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.73 – 164.43 – 163.91 – 143.63 (C_{quatenaire}) 133.05 (C₁₃Naphta), 131.33 (C₈Naphta), 131.08 (C₆Naphta), 126.12 (C_{quatenaire}), 125.29 (C₇), 123.25 (CH_{Triazol}), 115.13 (C_{quatenaire}), 114.66 (C₁₄Naphta), 103.17 (C₁man), 74.43 (C₅man), 73.40 (C₂man), 71.38 (C₃man), 70.00 (CH₂N_{triazole}), 68.80 (C₄man), 61.36 (C₆man), 54.44 (C₁₆Naphta), 50.30 (CH₂O), 34.94 (C₃Naphta), 30.06 - 29.47 - 29.29 - 29.21 - 28.77 - 26.30 - 26.07 - 25.73 - 24.19 (CH₂ Alkyl).

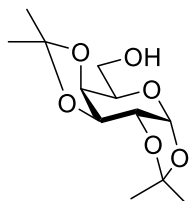
ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₇H₃₃N₃O₆ : 398.2259, found : 398.2254

11-azidoundécyl 4-méthylbenzenesulfonate (**4b**)



A mixture of 11-Azido undecanol **4** (2.0 g, 9 mmol, 1 eq.) and tosyl chloride (2.68 g, 14 mmol, 1.5 eq.) and pyridine (2.22 ml, 19 mmol, 2 eq.) in anhydrous DCM was stirring overnight under argon. The mixture was washed with aq HCl 1M, dried over MgSO₄ to give **4b** as a yellow oil. The crude product was used without further purification.

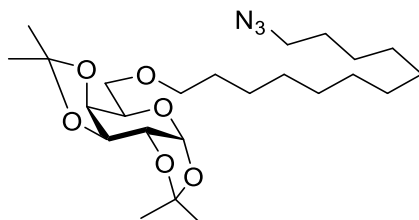
1,2:3,4-di-O-isopropylidene-α-D-galactopyranose (**23**)



To a solution of D-galactose (5 g, 27.75 mmol) in acetone (185 mL, 37 mL/g) were treated with conc. H₂SO₄ (5.5 mL, 1.1 mL/g) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3–5 h

and then neutralized by the addition of water (5 mL,) and Na₂CO₃ until pH = 7 (80 g). The precipitate was removed by filtration through a pad of Celite. The filtrates were combined and concentrated under reduced pressure. The residue **23** was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAC 85 :15 to 7 :3) to give **1** (6.2 g, 23.82 mmol, 85%) as a yellow syrup. The ¹H in agreement with literature [154].

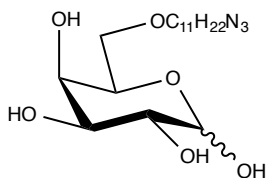
1,2:3,4-di-O-isopropylidene-6-O-(11 azido undécyl) α-D-galactopyranose (**24**)



To a solution of **23** (5 g, 19 mmol, 1 eq) and **4b** (10.59 g, 2.9 mmol, 1.5 eq) in DMF (10 ml) was added NaH (60% in oil, 0.55 g, 20 mmol, 1.2 eq) and the mixture was stirred 12 h at 80°C under argon. The mixture was concentrated and dissolved in DCM. The organic layer was washed with HCl 1M, brine and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAC 1 : 0 to 7 : 3) to give **24** (4.05 g, 46 %) as a white wax. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 5.60 – 5.51 (d, *J*_{1,2} = 5.0 Hz, 1H, H₁), 4.67 – 4.56 (dd, *J*_{3,4} = 7.9 Hz, *J*_{2,3} = 2.4 Hz, 1H, H₃), 4.39 – 4.30 (dd, *J*_{1,2} = 5.0 Hz, *J*_{2,3} = 2.4 Hz, 1H, H₂), 4.30 – 4.24 (dd, *J*_{3,4} = 7.9 Hz, *J*_{4,5} = 1.9 Hz, 1H, H₄), 4.04 – 3.92 (td, *J*_{5,6} = 6.3 Hz, *J*_{4,5} = 1.9 Hz, 1H, H₅), 3.71 – 3.55 (qd, *J*_{6a,6b} = 10.1, *J*_{5,6} = 6.2 Hz, 2H, H₆), 3.55 – 3.42 (qd, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 2H, CH₂O), 3.33 – 3.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 1.69 – 1.56 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.41 – 1.26 (m, 12H, CH₂ alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 109.17, 108.49 (C_{quatenaire} isopropyl), 96.38 (C₁), 71.59 (CH₂O), 71.21 (C₂), 70.65 (C₄), 70.63 (C₃), 69.29 (C₆), 66.72 (C₅), 51.49 (CH₂N₃), 30.93, 29.60, 29.55, 29.47, 29.45, 29.15, 28.84, 26.72 (CH₂alkyl), 26.09 (CH₃), 26.04 (CH₂ alkyl), 26.00 (CH₃), 24.95 (CH₃), 24.44 (CH₃).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₄H₄₃N₃O₆ : 492.3044, found : 492.3044

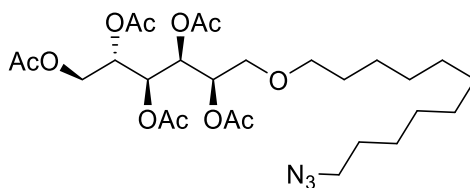
6-O-(11 azido-undécyl) D-galactopyranose (**25**).



To a solution of **24** (4 g, 8.78 mmol) in DCM (10 ml) was added trifluoroacetic acid (12.35 ml) and water (1.37 ml). The mixture was stirred 1h at room temperature then concentrated to give **3** (3.28g, 98%) used without further purification. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 4.96 – 4.88 (d, 1H, *J*_{1,2} = 3.37 Hz, H₁), 3.92 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 5.3 Hz, 1H, H₃), 3.60 – 3.43 (m, 3H, H₄, H₅, H₂), 3.34 (m, 4H, 2H₆, CH₂O), 1.58 – 1.41 (m, 4H, CH₂alkyl), 1.34 – 1.24 (m, 16H, CH₂alkyl). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 93.05 (C₁), 73.76 (C₅), 72.41 (C₂), 70.93 (C₄), 69.95 (C₃), 69.09 (C₆), 51.07 (CH₂N₃), 39.97, 39.70, 39.42, 39.14, 29.71, 29.48, 29.39, 29.00, 28.70, 26.60, 26.13 (CH₂Alkyl)

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₁₈H₃₅N₃O₆ : 412.2410, found : 412.2418

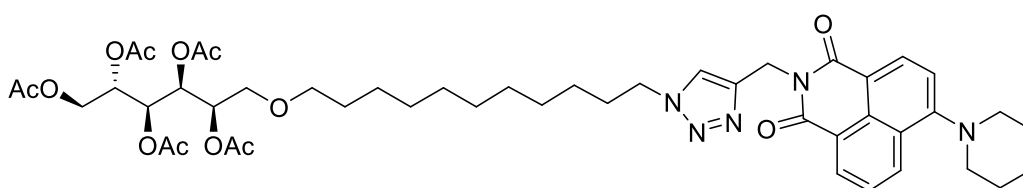
6-O- (11-azido-undécyl) 1,2,3,4,5 -penta - O-acetyl Galactitol (26)



To a solution of **25** (3.3 g, 8.79 mmol, 1 eq.) in DCM/MeOH (20 ml, 1:1) NaBH₄ (0.83 g, 21.97 mmol, 2.5 eq.) was added slowly and the mixture was then stirred overnight. Then the reaction mixture was acidified by addition of 10% acetic acid/MeOH (v/v) to quench the NaBH₄ until the suspension turn into a clear solution. Then the mixture was concentrated. The residue was dissolved in a mixture of pyridine and Ac₂O (40 ml, 1/1) and stirred overnight. Then excess MeOH was added to the mixture. After concentration the residue was dissolved in DCM and the organic layer was washed with 1 M HCl, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAc 10 : 0 to 7 : 3) to give **26** (1.175 g, 25%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.16 – 1.35 (d, *J* = 5.5 Hz, 16H, CH₂alkyl), 1.35 – 1.61 (m, 4H, CH₂Alkyl), 1.90 – 2.10 (m, 15H, CH₃Ac), 3.13 – 3.37 (m, 6H, H₆, CH₂O, CH₂N₃), 3.70 – 3.87 (dd, *J*_{H1a,H1b} = 11.7, *J*_{H1,H2} = 7.5 Hz, 1H, H₁), 4.16 – 4.28 (dd, *J*_{H1a,H1b} = 11.6 Hz, *J*_{H1,H2} = 7.5 Hz, 1H), 5.10 – 5.19 (td, *J*_{5,6} = 6.1 Hz, *J*_{4,5} = 1.4 Hz, 1H, H₅), 5.19 – 5.26 (dd, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, *J*_{3,4} = 4.8 Hz, 1H, H₂), 5.27 – 5.33 (m, 2H, H₃, H₄). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 20.63 - 20.66 - 20.74 - 20.86 (CH₃acetate), 25.93 - 26.70 - 28.83 - 29.13 - 29.41 - 29.45 - 29.48 - 29.52 (CH₂alkyl), 51.48 (CH₂N₃), 62.32 (C₁), 67.65 (C₄), 67.73 (C₂), 67.86 (C₃), 68.36 (C₅), 69.03 (C₆), 71.64 (CH₂O), 169.70 - 169.81 - 170.29 - 170.44 (C_{quat}.Acetat.).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₂₇H₄₅N₃O₁₁ : 610.3054, found : 610.3056

Compound (27)

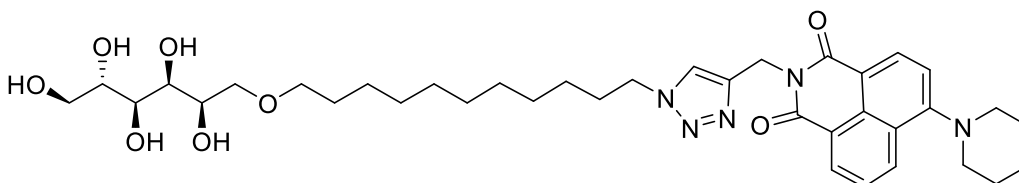


To a solution of **26** (1 g, 1.7 mmol, 1 eq.) and 4-piperidiny-N-propargyl-1,8-naphtalimide (0.97 g, 2.5 mmol, 1 eq.) in THF (10 ml) was added CuI (0.06 g, 0.34 mmol, 0.2 eq.) and DIEA (0.593 ml, 3.4 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred 4h and concentrated. The residue was dissolved in DCM and the organic layer was washed with a aq Na₂HEDTA (0.2 M). The organic layer was concentrated and the residue was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAc 5 : 5 to 7 : 3) to give **27** (1.25g, 80%) as a yellow foam. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.25 (m, 14H, CH₂alkyl) 1.48 (m, 2H, CH₂alkyl), 1.70 (m, 2H, CH₂pip), 1.72 – 1.95 (m, 6H, CH₂,_{pyp}, CH₂alkyl), 1.98 – 2.14 (m, 15H, CH₃acetate), 3.11 – 3.49 (m, 8H, CH₂O, H₆, CH₂,_{pyp}), 3.92 – 3.77 (dd, *J* = 11.7 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{1a}) 4.27 (m, 3H, CH₂N_{triazole}, H_{1b}), 5.16 – 5.38 (m, 4H, H₂, H₃, H₄, H₅), 5.48 (s, 2H, CH₂N_{Naphta}), 7.16

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $H_{ArNaphta}$), 7.64 (dd, $J = 15.1$ Hz, $J = 7.4$ Hz, 2H, $H_{ArNaphta}$, $H_{1Triazole}$), 8.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, $H_{6Naphta}$), 8.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $H_{ArNaphta}$), 8.57 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, $H_{ArNaphta}$). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 20.63, 20.66, 20.74, 20.86$ ($CH_{3,Ac\acute{e}tate}$), 24.32, 25.91, 26.19, 26.48, 28.95, 29.31, 29.37, 29.41, 29.47, 29.55, 30.26 (CH_{2Alkyl}), 35.15 ($CH_{2Propargyl}$), 50.25 (CH_2N), 54.53 (CH_{2Npyp}), 62.31 (C_1), 67.64 (C_3), 67.72 (C_2), 67.84 (C_4), 68.36 (C_5), 69.02 (C_6), 71.63 (CH_2O), 114.69 ($CH_{ArNaphta}$), 115.68 ($CH_{triazol}$), 122.94, 125.32, 126.22, 130.01, 130.80, 131.26, 132.91, 157.42, 163.72, 164.23, 169.68, 169.80, 170.26, 170.28, 170.42 ($C_{ArNaphta}$)

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{44}H_{63}N_5O_{13}$: 928.4314, found : 928.4315

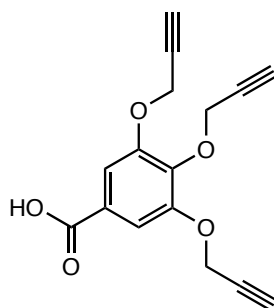
Glycolipid (28)



To a suspension of **5** (1.23 g, 1.3 mmol, 1 eq.) in MeOH, Na (6 mg, 0.16 mmol, 0.2 eq.) was added. The mixture was stirred 3h at room temperature. The mixture was neutralized with amberlite "IR120" filtered and concentrated under vacuum to give **6** (0.744 g, 78%) as a yellow powder. δ_H (300 MHz, $DMSO-d_6$): 8.50 – 8.28 (3H, m, 3 $CH_{Ar.Naphtalimide}$), 8.03 – 7.94 (1H, s, $CH_{triazole}$), 7.83 – 7.68 (1H, dd, $J = 9$ Hz, $J = 7$ Hz, $CH_{Ar.Naphtalimide}$), 7.31 – 7.20 (1H, d, $J = 8$ Hz, $CH_{Ar.Naphtalimide}$), 5.29 – 5.23 (2H, s, $CH_{2Npropargyl}$), 4.30 – 4.18 (2H, t, $J = 7$ Hz, $CH_2N_{Triazol}$), 3.90 – 3.79 (1H, m, $1H_{sucre}$), 3.76 – 3.65 (1H, m, $1H_{sucre}$), 3.52 – 3.26 (8H, m, 6H $sucre$, CH_2O), 3.26 – 3.12 (4H, m, $CH_2NCH_2piperidine$), 1.94 – 1.79 (4H, m, 2 $CH_2piperidine$), 1.79 – 1.59 (6H, m, $CH_2 Alkyl$), 1.52 – 1.32 (2H, m, CH_2Alkyl), 1.32 – 1.08 (16H, m, CH_2Alkyl). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 29.06, 30.88, 30.91, 31.02, 33.52, 34.03, 34.08, 34.13, 34.19, 34.52, 34.84, 35.90$ (CH_{2alkyl}) 40.28 ($CH_{2propargyl}$), 54.45 ($CH_{2triazole}$), 59.17 ($CH_2NCH_2piperidine$), 68.40 (C_6), 73.14 - 74.40 - 74.70 - 75.26 (C_2, C_3, C_4, C_5), 75.65 (C_1), 77.64 (CH_2O), 120.04 ($CH_2 Ar.Naphta$), 120.09 ($C_{quaternaire}$), 127.61 ($C_{quaternaire}$), 128.24 ($CH_{triazole}$), 130.64 ($C_{quaternaire}$), 130.99 ($CH_{ar.}$), 134.46 ($C_{quaternaire}$), 135.94 ($CH_{ar.}$), 137.62 ($CH_{ar.}$), 148.31 - 162.06 - 167.93 - 168.52 ($C_{quaternaire}$).

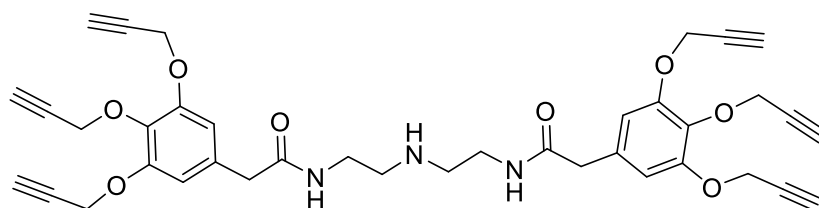
ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{37}H_{53}N_5O_8$: 718.3788, found : 718.3786

3,4,5-tris(prop-2-yn-1-yloxy)benzoic acid (30)



To a stirred solution of ethyl 3,4,5-trihydroxy-benzoate (5.0 g, 25.25 mmol, 1.0 eq) and propargyl bromide (80% wt, 9.84 mL, 88.31 mmol, 3.5 eq) in acetone (100 mL) was added K_2CO_3 (27.90 g, 201.85 mmol, 8.0 eq) and 18-crown-6 (35.87 mg, 135.70 mmol, 5.4 eq). The reaction mixture was refluxed for 6 h and evaporated to dryness. Aq 1 M HCl (90 mL) was added and the mixture was extracted with DCM (120 mL). The organic phases were combined and concentrated in vacuum. The residue was dissolved in a mixture of ethanol (100 mL) and 1 M aq NaOH solution (2 mL). The mixture was allowed to stir overnight at 85°C and concentrated. The residue was partitioned between aq 1 M HCl and DCM. The organic layer was concentrated to give 6.87 g of **30** (95%) as white solid. NMR in agreement with literature. [119]

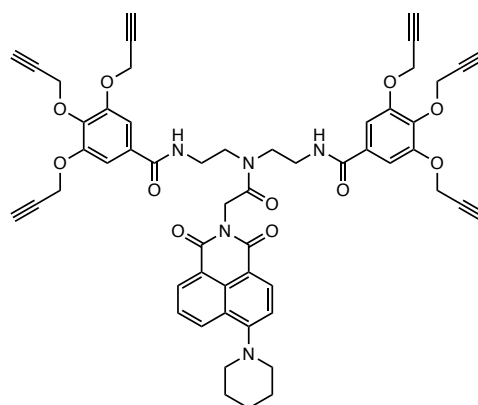
3-(but-3-yn-1-yloxy)-4,5-bis(prop-2-yn-1-yloxy)-N-(2-((2-(3,4,5-tris(prop-2-yn-1-yloxy)benzamido)ethyl)amino)ethyl)benzamide (31)



DIEA (0.67 mL, 3.85 mmol, 1.1 eq) and HBTU (1.59 g, 4.2 mmol, 1.2 eq) were added to a solution of **1** (1.0 g, 3.5 mmol, 1.0 eq) in acetonitrile (5.0 mL). Before addition of diethylenetriamine (0.189 mL, 1.8 mmol, 0.5 eq), the mixture was stirred for 30 minutes. After stirring overnight, the reaction mixture was concentrated and the residue was dissolved in DCM and washed with aq $NaHCO_3$ solution. The organic layer was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOH/AcOEt 0:10 to 15:85) to give **2** (0.749 g, 34 %) as a syrup. 1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.24 – 7.17 (s, 4H, H_{Ar}), 7.05 – 6.94 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NH_{amide}), 4.84 (d, J = 2.4 Hz, 8H, OCH_2), 4.73 (d, J = 2.4 Hz, 4H, OCH_2), 3.65 – 3.52 (m, 4H, CH_2NH), 3.06 – 2.99 (m, 4H, CH_2NH), 2.60 (d, J = 2.4 Hz, 4H, CH_{alkyne}), 2.45 (d, J = 2.4 Hz, 2H, $CH_{2alkyne}$).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{38}H_{37}N_3O_8$: 686.2473, found : 686.2470

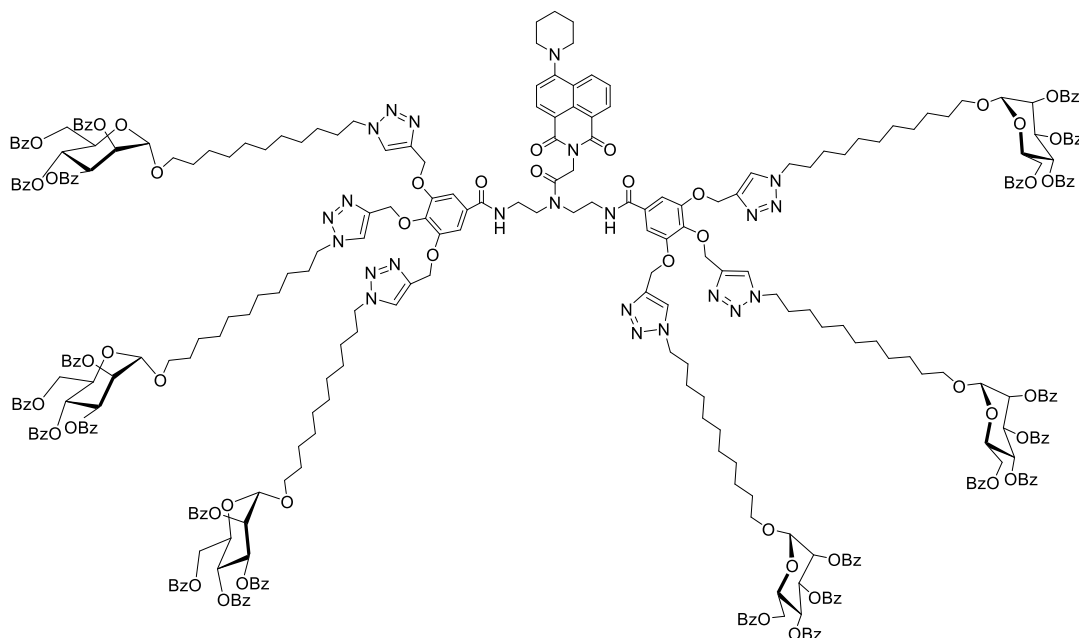
Compound (32)



DIEA (0.030 mL, 0.173 mmol, 1.1 eq) and HBTU (0.071 g, 0.182 mmol, 1.2 eq) were added to **19** (0.10 g, 0.157 mmol, 1.0 eq) in acetonitrile (5.0 mL). Before addition of **31** (0.0798 g, 0.236 mmol, 1.5 eq), the mixture was stirred for 30 minutes. After stirring overnight, the solvent was distilled off under vacuum and the crude product was dissolved in DCM and washed with NaHCO₃ solution. The organic layer was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOH 100%) to give **32** (0.0883 g, 58%) as yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.47 – 8.37 (m, 2H, H_{Ar} Naphtalimide), 8.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_{Ar} Naphtalimide), 7.72 – 7.61 (m, 2H, H_{Ar} Naphtalimide, H_{Amide}), 7.42 (s, 2H, H_{Ar} gallate), 7.17 – 7.03 (m, 4H, H_{Ar} Naphtalimide, H_{Amide}, H_{Ar} gallate), 5.04 (s, 2H, CH₂ Naptalimide), 4.89 – 4.69 (m, 8H, OCH₂), 4.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H, OCH₂), 3.85 (m, 4H, CH₂N), 3.28 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, CH₂piperidine), 2.58 – 2.38 (m, 6H, CH_{alcyne}), 1.92 (m, 4H, CH₂ piperidine), 1.76 (s, 2H, CH₂ piperidine). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.42, 167.41, 167.27 (C_{quat.galatte}), 165.74 (C=O), 164.40, 163.85, 157.82 (C_{ArNaphta}), 151.36, 151.19 (CH_{Ar.gallate}), 139.72, 139.24, 133.09, 131.30, 129.78 (CH_{ArNaphta}), 129.45(C_{ArNaphta}), 125.85, 125.20 (CH_{ArNaphta}), 121.98 (C_{ArNaphta}), 114.64 (CH_{ArNaphta}), 114.33 (CH_{ArNaphta}), 107.62, 106.91, 78.91, 78.87, 78.25, 78.08, 77.47 (C_{quate.propargyl}), 77.25, 77.05, 76.62, 76.22, 76.06, 75.61, 75.52 (CH_{propargyl}), 60.40, 60.27, 60.14, 57.09, 56.66, 54.43 (CH₂N_{Pip}), 48.46, 41.25 CH₂N, 39.17, 38.61 (CH₂O_{propargyl}), 26.17, 24.32 (CH₂Pip).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₅₇H₅₃N₅O₁₁ : 1006.3634, found : 1006.3638

Compound (33)

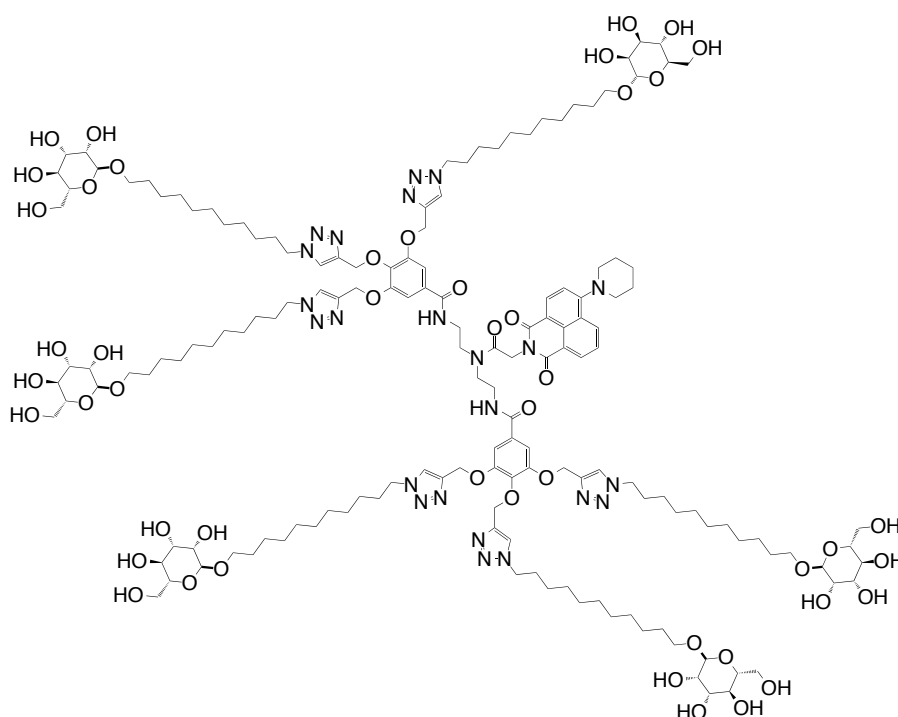


DIEA (0.067 mL, 0.377 mmol, 12.0 eq), **6** (0.224 g, 0.282 mmol, 9.0 eq) and CuI (0.0432 g, 2.0 mmol, 7.2 eq) were added to **32** (0.030 g, 0.0314 mmol, 1.0 eq) in THF (3.0 mL). After stirring overnight, the solvent was distilled off under vacuum and the residue was dissolved in DCM and

washed with H₂O. The organic layer was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex /AcOEt 5:5 to 0:10) to give **33** (0.179 g, 62 %) as yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.40 – 8.50 (m, 3H, CH_{Naphat}), 8.15 - 7.25 (m, 131H, CH_{Bz}, CH_{Naphta}, CH_{triazol}, CH_{gallate}), 6.12 (t, *J* = 9.9 Hz, 6H, H₄), 5.94 (dd, *J* = 10.1, 3.3 Hz, 6H, H₃), 5.71 (d, *J* = 2.7 Hz, 6H, H₂), 5.32 – 5.0 (m, 20H, CH_{2,propargyl}, H₁, CH₂C=O), 4.76 - 4.65 (m, 6H, H_{6a}), 4.56 - 4.25 (m, 24H, H_{6b}, H₅, CH₂N), 3.83 - 3.50 (m, 19H, CH₂O, CH₂CH₂N), 3.44 - 3.22 (m, 6H, CH₂N_{pip}), 1.87 – 1.15 (m, 108H, CH₂pip, CH₂Alkyl).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₃₂₅H₃₄₃N₂₃O₇₁ : 5726.3828, found : 5726.3736

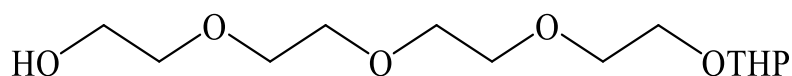
Compound (34)



To a solution of **33** (40 mg, 1eq.) in MeOH, Na (cat) was added and the mixture was stirring overnight and neutralized with IR120 "H⁺" form and concentrated. The residue was purified by LH20 column (DCM/MeOH 5:5) to to give **35** (0.020 g, 89 %) as yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.51 – 7.25 (m, 15H, CH_{Naphta}, CH_{triazol}, CH_{gallate}), 5.45 – 4.89 (m, 12H, CH_{2propargyl}), 4.88 – 4.12 (m, 14H, H₁, H₃, CH₂=O), 3.87 – 3.00 (m, 54H, H₂, H₄, H₅, H₆, CH₂O, CH₂N), 1.83 – 1.18 (m, 114H).

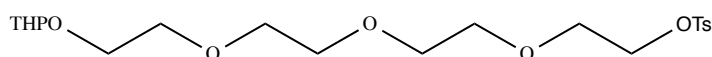
ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₅₇H₂₄₇N₂₃O₄₇ : 3229.7537, found : 3227.7545

Mono tetrahydropyranyl tetraethyleneglycol (36)



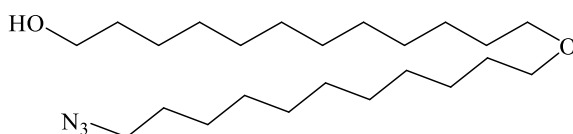
To a solution of tetraethyleneglycol (30.0 g, 200 mmol, 1 eq.) in DCM (200 ml) 2H-3,4-dihydropyran (3.65 ml, 40 mmol, 0.2 eq) was added dropwise. After completion of the addition, the solution was stirred 2h, and 200 ml of water was added and the mixture was extracted with DCM. The solvent were removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (EtOH/MeOH 15 : 1) to give **36** (22.5 g, 81%) as a colourless oil. The NMR is in agreement with the literature [128]

Tosylate (**37**)



To a solution of **36** (0.5 g, 1.8 mmol, 1 eq.) and TsCl (0.38 g, 1.98 mmol, 1.1 eq.) in DCM (15 ml) was added Et₃N (0.28 ml, 1.98 mmol, 1.1 eq.) and the solution was stirred overnight at room temperature. Then the mixture was washed with aq HCl 1M and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAc 8:2 to 5:5) to give **37** (645 mg, 82%) as colourless oil. The NMR is in agreement with the literature. [129]

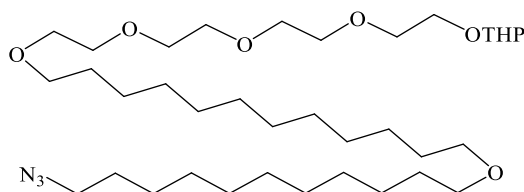
12-((11-azidoundécyl)oxy)dodecan-1-ol (**38**)



To a solution of **4b** (1.1 g, 42.2 mmol, 1 eq.) and dodecane 1,12 diol (0.86 g, 4.22 mmol, 1 eq.) in DMF was added NaH (60% in oil, 0.1 g, 8.4 mmol, 2 eq.). The solution was stirred at 80° C during 3h. Then the mixture was neutralized with aq HCl 1M and extracted with DCM. The organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAc 9:1 to 8:2) to give **38** (405 mg, 25%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 3.71 – 3.60 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂OH), 3.47 – 3.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, CH₂OCH₂), 3.33 – 3.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 1.69 – 1.51 (m, 8H, CH₂_{alkyl}), 1.51 – 1.45 (m, 2H, CH₂_{alkyl}), 1.45 – 1.22 (m, 29H, CH₂_{alkyl}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 70.99 (CH₂OCH₂), 70.97 (CH₂OH), 63.08 (CH₂N₃), 51.50, 32.82, 29.78, 29.60, 29.58, 29.56, 29.51, 29.49, 29.44, 29.41, 29.16, 28.85, 26.72, 26.20, 25.75 (CH₂_{alkyl}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₃H₄₇N₃O₂ : 420.3556, found : 420.3560

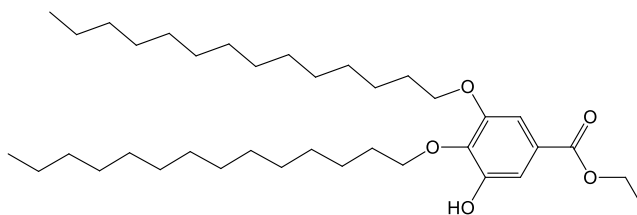
2-((36-azido-3,6,9,12,25-pentaoxahexatriacontyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (**39**)



To a solution of **38** (2.4 g, 6.14 mmol, 1 eq.) and **37** (3.98 g, 9.2 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous THF (20 ml), 18-crown-6 (0.02 g, cat.) and NaH (60% in oil, 0.17 g, 7.36 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 2 days at room temperature under argon. The mixture was concentrated under vacuum and diluted with DCM. The organic layer was washed with aq HCl 1M, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (CyHex/EtOAc 8:2 to 5:5) to give **39** (1.9 g, 48%) as colourless wax. δ_{H} (300 MHz, Chloroform-*d*): 4.70 – 4.53 (1H, t, *J* = 3 Hz, CH_{THP}), 3.89 – 3.77 (2H, m, CH_{2peg}), 3.72 – 3.52 (18H, m, CH_{2peg}, CH_{2O}), 3.45 – 3.32 (6H, dt, *J* = 6 Hz, CH_{2OCH₂}), 3.28 – 3.17 (3H, t, *J* = 7 Hz), 1.59 – 1.50 (10H, m, CH_{2Alkyl}), 1.32 – 1.23 (32H, m, CH_{2Alkyl}). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 98.87 (CH_{THP}), 71.50 - 70.93 - 70.90 - 70.58 - 70.50 - 70.02 (CH_{2peg}, CH_{2O}), 66.61 (CH_{2PEG}), 62.14 (CH_{2peg}, CH_{2O}), 51.43 (CH_{2N₃}), 30.53, 29.75, 29.67, 29.61, 29.58, 29.52, 29.48, 29.44, 29.12, 28.81, 26.68, 26.18, 26.17, 26.07, 25.42, 19.45 (CH_{2Alkyl}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₃₆H₇₁N₃O₇ : 680.5184, found : 680.5185

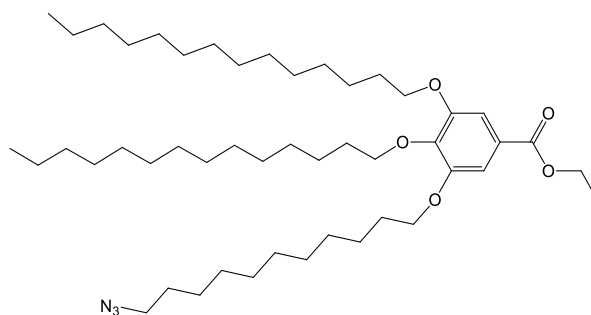
Ethyl 3-hydroxy-4,5-bis(tetradecyloxy)benzoate (**42**)



A solution of ethyl galate (3g, 15 mmol, 1eq), 1-bromotetradecane (6.30 ml, 23 mmol, 1.5 eq), and K₂CO₃ (12.55 g, 0.91 mmol, 6 eq) in DMF (40 ml) was stirred at 80°C overnight. The mixture was neutralized with aq HCl 1M, extract with DCM and concentrated. The residue was dissolved in EtOH (30ml) and NaOH (1g) in water (2 ml) was added and the mixture was stirred for 20h at 80°C. Then the mixture was neutralized with aq HCl 1M, extract with DCM and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 95:5 to 9:1) to give 8.9 g of **42** (30%). ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.33 – 7.29 (s, 1H, H_{Ar}), 7.21 – 7.17 (s, 1H, H_{Ar}), 4.44 – 4.29 (q, *J*=7.1, 2H, COOCH₂CH₃), 4.22 – 4.11 (t, *J*=6.7, 2H, CH_{2O}), 4.10 – 3.97 (t, *J*=6.4, 2H, CH_{2O}), 1.92 – 1.68 (m, 5H, CH_{2Alkyl}), 1.57 – 1.23 (m, 55H, CH_{2Alkyl}), 0.95 – 0.84 (m, 7H, CH_{2Alkyl}). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.28, 151.26, 149.09, 138.56, 125.62 (C_{quaternaire}), 109.31, 106.42 (CH_{Ar}), 73.62, 68.86 (CH_{2O}), 60.94 (COOCH₂CH₃), 31.92, 31.92, 30.22, 29.70, 29.66, 29.61, 29.57, 29.41, 29.36, 29.26, 26.15, 25.93, 22.68 (CH_{2Alkyl}), 14.32, 14.10 (CH_{3Alkyl}, COOCH₂CH₃).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₃₇H₆₆O₅ :613.4802, found : 613.4810

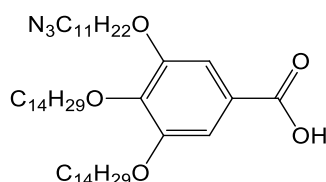
Ethyl 3-((11-azidoundécyl)oxy)-4,5-bis(tetradecyloxy)benzoate (**43**)



A mixture of tosylate **4b** (3.29 g, 9 mmol, 2 eq), **42** (2.326 g, 4.5 mmol, 1 eq.) and K_2CO_3 (1.86 g, 13 mmol, 3 eq.) in anhydrous DMF (20 ml) was stirring overnight at $80^\circ C$ under argon. The mixture was neutralized with aq HCl 1M, extracted with DCM and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 95:5) to give 3.7g of **43** (98%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.86 – 0.94 (t, 6H), 1.28 – 1.92 (m, 64H, CH_{2alkyl} , CH_3Ac), 3.21 – 3.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.37 – 3.49 (t, J = 6.9 Hz, 4H, $\underline{CH_2}CH_2O$), 3.97 – 4.07 (t, J = 6.5 Hz, 6H, CH_2O), 4.31 – 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2Ac), 7.25 – 7.28 (s, 2H, CH_{Ar}). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.11 - 14.41 (CH_3Ac , CH_3alkyl), 22.70 - 26.06 - 26.09 - 26.76 - 28.20 - 28.78 - 28.87 - 29.33 - 29.37 - 29.38 - 29.41 - 29.45 - 29.55 - 29.65 - 29.68 - 29.72 - 30.33 - 31.94 - 32.86 - 33.98 - 51.49 - 60.94 - 69.18 - 73.45 (CH_{2alkyl}), 108.01 (CH_{Ar}), 125.06 – 142.32 – 152.79 – 166.44 ($C_{quaternaireAr}$).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{48}H_{87}N_3O_5$: 808.6538, found : 808.6542

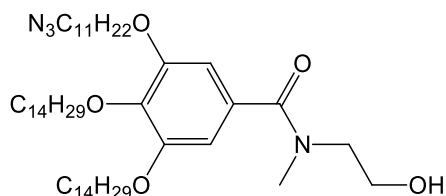
3-((11-azidoundécyl)oxy)-4,5-bis(tetradecyloxy)benzoic acid (**44**)



To a mixture of **43** (3.07 g, 4 mmol, 1eq) in MeOH (50 ml), aq 5M NaOH (2ml) was added and the mixture was stirring overnight at $80^\circ C$. The mixture was neutralized with IR120, and concentrated to give 2.95 g of **44** (98%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.85 – 0.96 (t, J = 8.5 Hz, J = 6.4 Hz, 6H, CH_3), 1.15 – 1.96 (m, 62H, CH_2 alkyl), 3.23 – 3.31 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.37 – 3.47 (t, J = 6.8 Hz, 4H, $\underline{CH_2}CH_2O_{meta}$), 4.00 – 4.09 (q, J = 6.3 Hz, 6H, CH_2O), 7.32 - 7.36 (s, 2H, H_{ar}). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.11 (CH_3), 15.22 - 34.00 (CH_2 alkyl), 51.49 (CH_2N_3), 69.20 (CH_2O_{meta}), 70.81 ($\underline{CH_2}CH_2O_{meta}$), 73.52 (CH_2O_{para}), 108.56 (CH_{ar}), 123.69 - 143.10 - 152.84 - 161.21 - 171.26 ($C_{quaternaire}$).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{46}H_{83}N_3O_5$: 780.6225, found : 780.6220

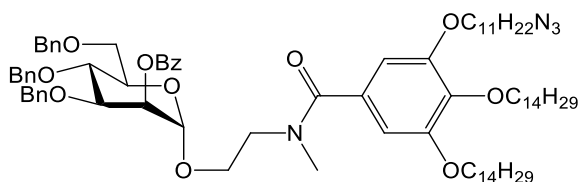
3-((11-azidoundécyl)oxy)-N-(2-hydroxyethyl)-N-méthyl-4,5-bis(tetradecyloxy)benzamide (**45**)



To a mixture of **44** (1.58 g, 1.9 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (20 ml) was added oxalyl chloride (15.18 ml, 179 mmol, 16 eq.) and three drop of anhydrous DMF. The mixture was stirred 12h and concentrated. Traces of oxalyl chloride was removed by co-evaporation three times with toluene. The acid chloride was dissolved in DCM (20 ml) and DMAP (24 mg, 0.2 mmol, 0.1 eq.) and 2-(méthylamino)ethanol (0.47 ml, 6 mmol, 3 eq) was added, the mixture was stirred overnight. The mixture was concentrated and the residue was dissolved in DMC and washed with aq HCl 1M. The organic layer was dried and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 10:0 to 9:1) to give 1.0g of **45** (67%) as a tan solid. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.80 – 0.96 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃), 1.07 – 1.90 (m, 63H, CH_{2Alkyl}), 3.01 – 3.18 (s, 3H, CH_{3N}), 3.21 – 3.35 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_{2N3}), 3.56 – 3.81 (s, 2H, CH_{2OH}), 3.81 – 3.94 (s, 2H, CH_{2N(Me)OC(O)}), 3.94 – 4.09 (t, J = 6.5 Hz, 7H, CH_{2O}), 6.58 – 6.75 (s, 2H, H_{Ar}). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 14.11 (CH₃), 22.69, 25.75, 26.08, 26.76, 28.87, 29.21, 29.37, 29.41, 29.44, 29.55, 29.56, 29.60, 29.64, 29.67, 29.71, 30.30, 31.93, 32.82 (CH_{2Alkyl}), 51.50 (CH_{2OH}, CH_{2N3}), 63.09 (CH_{2NMe}), 69.29 (CH_{2Ometa}), 73.45 (CH_{2Opara}), 106.02 (CH_{Ar}), 153.06 (C_{quaternaire Ar}).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₄₉H₉₀N₄O₅ : 837.6803, found : 837.6810

Compound (46)

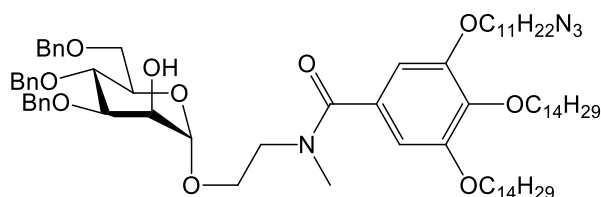


To a solution of (**45**) (1 g, 1.226 mmol, 1 eq.) and **7⁷** (1.32 g, 1.840 mmol, 1.5 eq.) in DCM (15 ml) was added 4Å Molecular Sieves (1 g). The mixture was stirred for 20 min under argon at -10 °C and NIS (0.28 g, 2.45 mmol, 2 eq.) was added followed by TfOH (0.09 ml, 6.133 mmol, 0.5 eq.). The mixture was stirred 20 min at -10°C and filtered through a celite pad, and the organic layer was washed with a solution of Na₂S₂O₃ and sat NaHCO₃. The organic layer was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 10:0 to 9:1) to give 0.938 g of **46** (70%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.09 (ddt, J = 7.5 Hz, J = 3.7 Hz, J = 2.1 Hz, 3H, CH_{Bz}), 7.68 – 7.16 (m, 14H, CH_{Bz}, CH_{Bn}), 6.61 (s, 2H, CH_{Ar}), 5.59 (d, $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, 1H, H₂), 4.98 (d, $J_{1,2}$ = 2.4 Hz, 1H), 4.94 – 4.50 (m, 6H, CH_{2Bn}), 4.19 – 3.69 (m, 17H, CH_{2N}, CH_{2CH2N}, H₃, H₄, H₅, H_{6a}, H_{6b}), 3.28 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_{2N3}), 3.03 (s, 3H, CH_{3N}), 1.77 (m, 6H, CH_{2alkyl}), 1.62 (m, 4H, CH_{2alkyl}), 1.10 – 1.47 (s, 56H, CH_{2alkyl}), 0.94 – 0.88 (m, 6H, CH_{3alkyl}). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 165.72, 153.14, 139.23, 138.33, 138.26, 137.79, 133.54 (C_{quaternaire Ar}),

133.22, 131.04 (CH_{Bz}), 130.12 (C_{quaternaire Ar}), 129.97 (CH_{Bz}), 129.77 (C_{quaternaire Ar}), 128.42, 128.35, 128.32, 128.06, 127.99, 127.70, 127.52 (CH_{2Bn}), 105.56 (CH_{Ar gallate}), 97.94 (C₁), 77.84 (C₃), 75.32 (CH_{2Bn}), 74.18 (C₅), 73.49 (CH_{2O para gallate}), 73.49 (CH_{2Bn}) 72.02 (C₄), 71.61 (CH_{2Bn}), 69.26 (CH_{2O meta gallate}), 69.06 (CH_{2N(Me)}, CH_{2CH₂N}), 69.00 (C₂), 66.28 (C₆), 51.50 (CH_{2N₃}), 31.95, 30.33, 29.73, 29.68, 29.60, 29.57, 29.46, 29.39, 29.23, 28.88, 26.77, 26.12, 22.71 (CH_{2 alkyl}), 14.14 (CH_{3 alkyl}).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₈₃H₁₂₂N₄O₁₁ : 1383.9002, found : 1383.9008

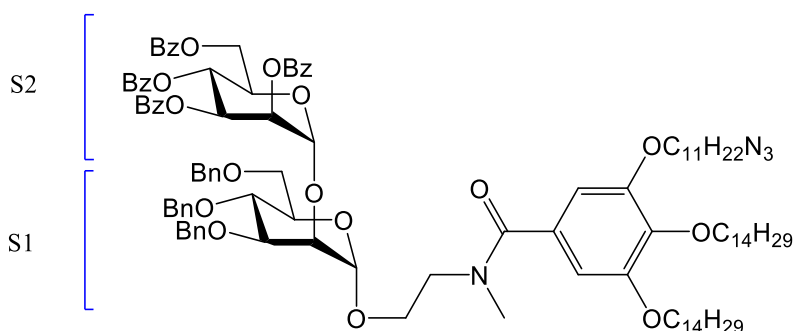
Compound (47)



To a solution of **46** (2.47 g, 1.9 mmol, 1 eq.) in MeOH, Na (cat.) was added and the mixture was stirring overnight. The solution was neutralized with IR120 “H” form and the organic layer was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOH 7:3 to 5:5) to give 1.80 g of **47** (80%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.45 – 7.13 (m, 15H, CH_{Bn}), 6.57 (s, 2H, CH_{Argallate}), 5.02 – 4.40 (m, 7H, CH_{2Bn}, H₁), 4.09 – 3.40 (m, 16H, CH_{2O}, CH_{2N}, CH_{2CH₂N}, H₂, H₃, H₄, H₅, H_{6a}, H_{6b}), 3.27 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, CH_{2N₃}), 3.00 (s, 3H, CH_{3N}), 1.88 – 1.68 (m, 6H, CH_{2Alkyl}), 1.66 – 1.53 (m, 2H, CH_{2Alkyl}), 1.53 – 1.06 (m, 54H, CH_{2Alkyl}), 0.97 – 0.77 (m, 6H, CH_{3Alkyl}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153.10, 139.21, 139.21, 138.15, 138.15, 137.73, 137.72, 131.09 (C_{quaternaire}), 127.97, 127.91, 127.83, 127.77, 127.61 (CH_{2Bn}), 105.59 (CH_{Ar}), 99.32(C₁), 79.90 (C₃), 75.16 (CH_{2Bn}), 74.12 (C₅), 73.50(CH_{2Ogallate}), 72.08 (C₄), 71.44 (CH_{2Bn}), 69.24 (CH_{2Ogallate}), 68.88 (CH_{2N(Me)}, CH_{2CH₂N}), 68.40 (C₂) 65.57 (C₆), 51.48 (CH_{2N}), 31.95, 30.32, 29.76, 29.73, 29.68, 29.62, 29.59, 29.51, 29.45, 29.39, 29.18, 28.85, 28.85, 26.73, 26.12, 26.09 (CH_{2Alkyl}), 22.71(CH_{3Alkyl}).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₇₆H₁₁₈N₄O₁₀ : 1269.8740, found : 1269.8742

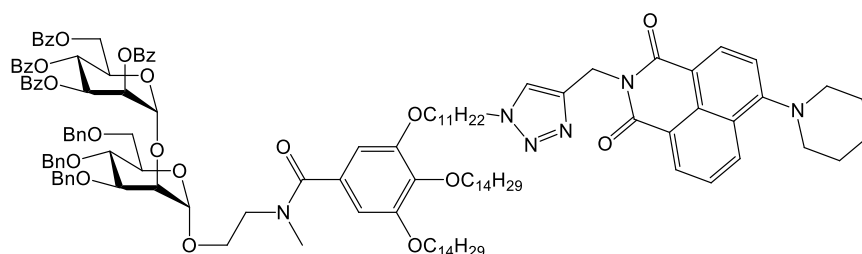
Compound (48)



To a solution of **47** (1.7 g, 1.0 mmol, 1 eq.) and **7⁷** (1.37 g, 1.5 mmol, 1.5 eq.) in DCM (15 ml) was added 4Å molecular sieves (1 g). The mixture was stirred for 20 min under argon at -10 °C and NIS (0.61 g, 3 mmol, 2 eq.) and TfOH (0.024 ml, 0.5 mmol, 0.2 eq.) were added. The mixture was stirred for 20 min at -10°C and filtered through a celite pad, and the organic layer was washed with a solution of Na₂S₂O₃ and sat NaHCO₃. The organic layer was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 10:0 to 9:1) to give 1.6 g of **48** (65%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.25 – 7.81 (m, 10H, CH_{Bz}), 7.72 – 7.01 (m, 20H, CH_{Bn}, CH_{Bz}), 6.57 (s, 2H, CH_{Argallate}), 6.30 – 5.89 (m, 3H, H_{2,S2}, H_{3,S2}, H_{4,S2}), 5.28 (s, 1H, H_{1,S2}), 5.05 (s, 1H, H_{1,S1}), 4.98 – 4.37 (m, 9H, CH_{2Bn}, H_{5,S2}, H_{6,S2}), 4.15 – 3.51 (m, 13H, H_{5,S1}, H_{6,S1}, CH_{2O}, CH_{2N}, CH_{2CH2N}), 3.27 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, CH_{2N3}), 2.95 (s, 3H, CH_{3N}), 1.86 – 1.10 (m, 60H, CH_{2Alkyl}), 0.98 – 0.80 (m, 6H, CH_{3Alkyl}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₁₀H₁₄₄N₄O₁₉ : 1825.0425, found : 1825.0420

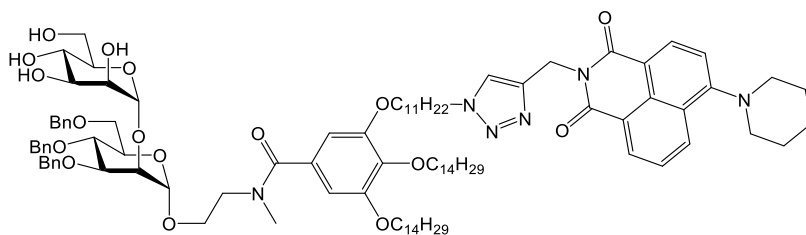
Compound (49)



To a solution of **48** (200 mg, 0.467 mmol, 1 eq) and **19** (83 mg, 0.93 mmol, 2 eq) in anhydrous THF (5 ml) was added DIEA (0.04 ml, 0.93 mmol, 2 eq) and CuI (83.0 mg, 0.93 mmol, 0.2 eq). The mixture was stirred overnight under argon atmosphere. The mixture was concentrated, dissolved in DCM and washed with EDTA 0.2 M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 9:1 to 7:3) to give 146 mg of **49** (70%) as a yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.52 (d, *J*=7.1, 1H, H_{ArNaphta}), 8.45 (d, *J*=8.2, 1H, H_{ArNaphta}), 8.33 (d, *J*=8.4, 1H, H_{ArNaphta}), 8.09 – 7.67 (m, 10H, H_{Bz}), 7.64 – 6.95 (m, 28H, H_{ArNaphta}, H_{Bz}, H_{Bn}, CH_{Triazol}), 6.48 (s, 2H, CH_{Argallate}), 6.20 - 5.88 (m, 3H, H_{2,S2}, H_{3,S2}, H_{4,S2}), 5.42 (s, 2H, CH_{2N}_{Naphta}), 5.21 (s, 1H, H_{1,S2}), 5.02 – 4.30 (m, 10H, CH_{2Bn}, H_{5,S2}, H_{6,S2}, H_{1,S1}), 4.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{2,triazole}), 4.08 – 3.40 (m, 13H, H_{5,S1}, H_{6,S1}, CH_{2O}, CH_{2N}, CH_{2CH2N}), 3.16 (m, *J*=4.5, 4H, CH_{2N}_{piperidine}), 2.87 (s, 2H, CH_{3N}), 2.03 – 0.94 (m, 70H, CH_{2Alkyl}, CH_{2piperidine}), 0.80 (t, *J*=7.0, 6H, CH_{3Alkyl}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₃₀H₁₆₂N₆O₂₁ : 2166.1685, found : 2166.1690

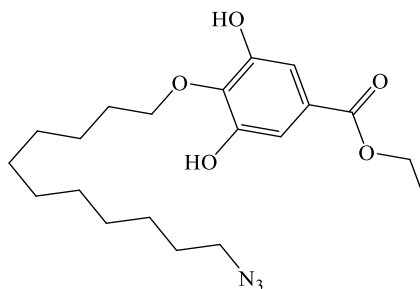
Compound (50)



To a solution of **49** (0.145 g, 0.01 mmol, 1 eq.) in MeOH, Na (cat.) was added and the mixture was stirred overnight. The residue was neutralized with IR120 "H⁺" form filtered and the organic layer was concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOH 10:0 to 9:1) to give 100 mg of **50** (90%) as a solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.6 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{ArNaphta}), 8.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{ArNaphta}), 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{ArNaphta}), 7.78 (d, 1H, 8.4 Hz, 1H, H_{ArNaphta}), 7.44 – 7.10 (m, 17H, H_{Bn}, CH_{Triazole}, CH_{ArNaphta}), 6.60 (s, 2H, H_{ArGallate}), 5.42 (s, 1H, CH_{2N_{Naphta}}), 5.18 – 4.97 (s, 1H, H_{1,S1}), 4.94 – 4.43 (m, 7H, CH_{2Bn}, H_{1,S2}), 4.36 – 4.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH_{2triazole}), 4.06 – 3.50 (m, 19H, H_{2,S2}, H_{3,S2}, H_{4,S2}, H_{5,S2}, H_{6,S2}, H_{5,S1}, H_{6,S1}, CH_{2O}, CH_{2N}, CH_{2CH₂N}), 3.25 (t, *J* = 5.7 Hz, 3H, CH_{2N_{piperidine}}), 3.13 – 2.82 (s, 4H, CH_{3N}), 2.25 – 1.00 (m, 70H, CH_{2Alkyl}, CH_{2piperidine}), 0.97 – 0.78 (t, 6H, CH_{3Alkyl}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₀₂H₁₄₆N₆O₁₇ : 1750.0636, found : 1750.0640

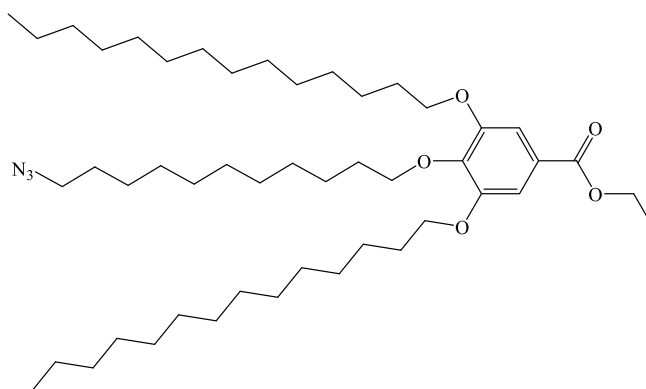
Ethyl 4-((11-azidoundécyl)oxy)-3,5-dihydroxybenzoate (**51**)



A mixture of **5** (5.27 g, 14 mmol, 1 eq.) and ethyl gallate (1.88 g, 0.9 mmol, 0.66 eq.) and K₂CO₃ (5.95 g, 43 mmol, 3 eq.) in anhydrous DMF (10 ml) was stirring overnight at 80°C under argon. The mixture was neutralized with aq HCl 1M, extracted with DCM and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 9:1 to 7:3) to give 1.70 g of **51** (40%) as a pale yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.33 – 1.54 (m, 16H, H_{alkyl}, CH_{3Ac}), 1.62 (p, *J* = 7.2, 2H, CH₂CH₂CH₂O), 1.80 (p, *J* = 6.8, 2H, CH₂CH₂O), 3.28 (t, *J* = 6.9, 2H, CH₂N₃), 4.15 (t, *J* = 6.8, 2H, CH₂O), 4.36 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂Ac), 6.04 (s, 2H, H_{ar}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 14.25 (CH_{3Ac}), 25.84 - 26.69 - 28.82 - 29.10 - 29.31 - 29.39 - 29.43 - 30.15 - 51.50 - 61.21 - 73.91 (CH₂), 109.63 (CH_{Ar}), 125.99, 137.66, 148.83, 166.49 (C_{quaternaire Ar}).

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₀H₃₁N₃O₅ : 416.2156, found : 416.2150

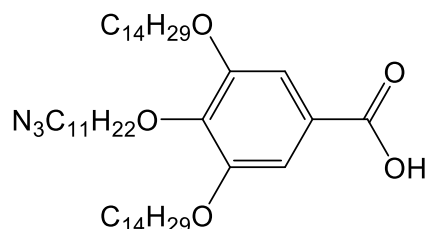
Ethyl 4-((11-azidoundécyl)oxy)-3,5-bis(tetradecyloxy)benzoate (**52**)



A mixture of **51** (5.0 g, 13 mmol, 1eq.), bromotetradecane (11.34 ml, 38 mmol, 3 eq.) and K_2CO_3 (17.56 g, 127 mmol, 10 eq.) in anhydrous DMF (20 ml) was stirring overnight at 80°C under argon. The mixture was neutralized with 1M HCl, extract with DCM and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100%) to give 9.30 g of **52** (93%) as a beige solid. 1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.86 – 0.94 (t, 6H), 1.28 – 1.92 (m, 64H, CH_{2alkyl} , CH_3Ac), 3.21 – 3.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.37 – 3.49 (t, J = 6.9 Hz, 4H, CH_2CH_2O), 3.97 – 4.07 (t, J = 6.5 Hz, 6H, CH_2O), 4.31 – 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2Ac), 7.25 – 7.28 (s, 2H, CH_{Ar}). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.11 - 14.41 (CH_3Ac , CH_{3alkyl}), 22.70 - 26.06 - 26.09 - 26.76 - 28.20 - 28.78 - 28.87 - 29.33 - 29.37 - 29.38 - 29.41 - 29.45 - 29.55 - 29.65 - 29.68 - 29.72 - 30.33 - 31.94 - 32.86 - 33.98 - 51.49 - 60.94 - 69.18 - 73.45 (CH_{2alkyl}), 108.01 (CH_{Ar}), 125.06 – 142.32 – 152.79 – 166.44 ($C_{quaternaireAr}$).

ESI-HRMS m/z [$M+Na^+$] calculated for $C_{48}H_{87}N_3O_5$: 808.6538, found : 808.6542

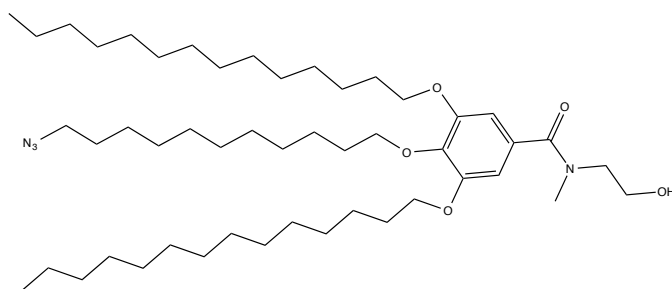
4-((11-azidoundécyl)oxy)-3,5-bis(tetradecyloxy)benzoic acid (**53**)



To a mixture of **52** (9.3 g, 11 mmol, 1 equiv.) in methanol (20 ml) was added NaOH (5 g, 125 mmol, 11 eq.) and H_2O (5 ml). The mixture was stirred at reflux overnight and concentrated under reduce pressure. The residue was dissolved in DCM and neutralized with aq HCl 1M and the organic layer was dried and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 9:1 to 8:2) to give 8.5 g of **53** (94%) as a tan solid. 1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.85 – 0.96 (t, J = 8.5 Hz, J = 6.4 Hz, 6H, CH_3), 1.15 – 1.96 (m, 62H, CH_2 alkyl), 3.23 – 3.31 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.37 – 3.47 (t, J = 6.8 Hz, 4H, $CH_2CH_2O_{meta}$), 4.00 – 4.09 (q, J = 6.3 Hz, 6H, CH_2O), 7.32 - 7.36 (s, 2H, H_{ar}). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.11 (CH_3), 15.22 - 34.00 (CH_2 alkyl), 51.49 (CH_2N_3), 69.20 (CH_2O_{meta}), 70.81 ($CH_2CH_2O_{meta}$), 73.52 (CH_2O_{para}), 108.56 (CH_{ar}), 123.69 - 143.10 - 152.84 - 161.21 - 171.26 ($C_{quaternaire}$).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₄₆H₈₃N₃O₅ : 780.6225, found : 780.6220

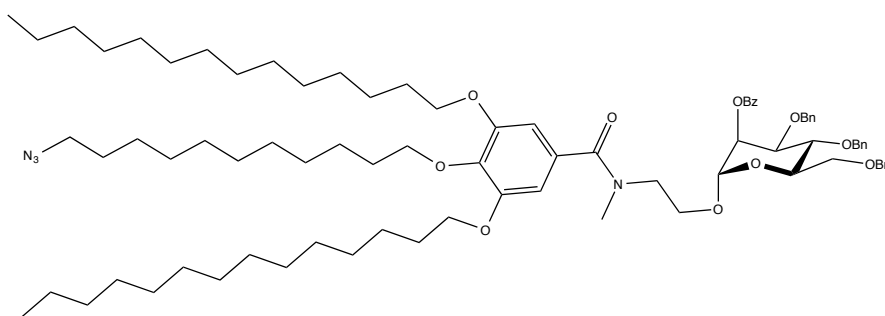
4-((11-azidoundécyl)oxy)-N-(2-hydroxyethyl)-N-méthyl-3,5-bis (tetradécyloxy) benzamide (54)



To a mixture of **53** (8.5 g, 11 mmol, 1 eq.) in anhydrous DCM (20 ml) was added oxalyl chloride (15.18 ml, 179 mmol, 16 eq.) and three drops of anhydrous DMF. The mixture was stirred for 7h and concentrated. The excess oxalyl chloride was co-evaporated three times with toluene. The residue was dissolved in DMF (20 ml) and méthyl ethanolamine (1.5 eq) and DMAP (137 mg, 1 mmol, 0.1 eq.) was added, the mixture was stirred overnight. The mixture was concentrated and the residue was dissolved in DCM and washed with aq HCl 1M. The organic layer was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 10:0 to 9:1) to give 5.7 g of **54** (65%) as a tan solid. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.80 – 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH₃), 1.07 – 1.90 (m, 63H, CH_{2Alkyl}), 3.01 – 3.18 (s, 3H, CH₃N), 3.21 – 3.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.56 – 3.81 (s, 2H, CH₂OH), 3.81 – 3.94 (s, 2H, CH₂N(Me)OC(O)), 3.94 – 4.09 (t, *J* = 6.5 Hz, 7H, CH₂O), 6.58 – 6.75 (s, 2H, H_{Ar}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 14.11 (CH₃), 22.69, 25.75, 26.08, 26.76, 28.87, 29.21, 29.37, 29.41, 29.44, 29.55, 29.56, 29.60, 29.64, 29.67, 29.71, 30.30, 31.93, 32.82 (CH_{2Alkyl}), 51.50 (CH₂OH, CH₂N₃), 63.09 (CH₂NMe), 69.29 (CH₂O_{meta}), 73.45 (CH₂O_{para}), 106.02 (CH_{Ar}), 153.06 (C_{quaternaire Ar}).

ESI-HRMS m/z [M+Na⁺] calculated for C₄₉H₉₀N₄O₅ : 837.6803, found : 837.6810

Compound (55)

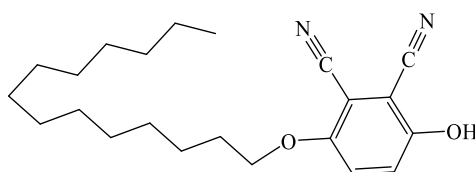


To a solution of **54** (1 g, 1.226 mmol, 1 eq.) and (2-Méthyl-5-tert-butyl phenyl)-2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-1-thio- α -D-glucopyranoside⁷ (1.32 g, 1.840 mmol, 1.5 eq.) in DCM (15 ml) was added 4Å molecular sieves (1 g). The mixture was stirred for 20 min under argon at -10 °C and NIS (0.28 g, 1.226 mmol, 1.1 eq.) and TfOH (0.09 ml, 6.133 mmol, 0.5 eq.) were added. The mixture was stirred

for 20 min at -10°C and filtered through a celite pad, and the organic layer was washed with a solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and sat NaHCO_3 . The organic layer was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/EtOAc 10:0 to 9:1) to give 0.938 g of **55** (56%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 8.09 (ddt, J = 7.5 Hz, J = 3.7 Hz, J = 2.1 Hz, 3H, CH_{Bz}), 7.68 – 7.16 (m, 14H, CH_{Bz} , CH_{Bn}), 6.61 (s, 2H, CH_{Ar}), 5.59 (d, $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, 1H, H_2), 4.98 (d, $J_{1,2}$ = 2.4 Hz, 1H), 4.94 – 4.50 (m, 6H, CH_2Bn), 4.19 – 3.69 (m, 17H, CH_2N , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, H_3 , H_4 , H_5 , H_{6a} , H_{6b}), 3.28 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.03 (s, 3H, CH_3N), 1.77 (m, 6H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 1.62 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 1.10 – 1.47 (s, 56H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 0.94 – 0.88 (m, 6H, $\text{CH}_{3\text{alkyl}}$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 165.72, 153.14, 139.23, 138.33, 138.26, 137.79, 133.54 ($\text{C}_{\text{quaternaire Ar}}$), 133.22, 131.04 (CH_{Bz}), 130.12 ($\text{C}_{\text{quaternaire Ar}}$), 129.97 (CH_{Bz}), 129.77 ($\text{C}_{\text{quaternaire Ar}}$), 128.42, 128.35, 128.32, 128.06, 127.99, 127.70, 127.52 (CH_2Bn), 105.56 ($\text{CH}_{\text{Ar gallate}}$), 97.94 (C_1), 77.84 (C_3), 75.32 (CH_2Bn), 74.18 (C_5), 73.49 ($\text{CH}_2\text{O para gallate}$), 73.49 (CH_2Bn), 72.02 (C_4), 71.61 (CH_2Bn), 69.26 ($\text{CH}_2\text{O meta gallate}$), 69.06 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 69.00 (C_2), 66.28 (C_6), 51.50 (CH_2N_3), 31.95, 30.33, 29.73, 29.68, 29.60, 29.57, 29.46, 29.39, 29.23, 28.88, 26.77, 26.12, 22.71 (CH_2 alkyl), 14.14 (CH_3 alkyl).

ESI-HRMS m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{83}\text{H}_{122}\text{N}_4\text{O}_{11}$: 1383.9002, found : 1383.9008

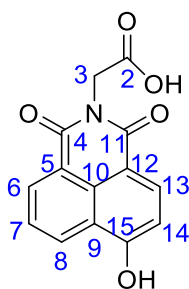
3-hydroxy-6-(tetradecyloxy)phthalonitrile (**57**)



K_2CO_3 (0.130 g, 1.0 mmol, 0.3 equiv) was added to a solution of dicyano hydroquinone (0.5 g, 1 mmol, 1 equiv) and 14 bromo tetradecane (0.26 g, 0.1 mmol, 0.3 equiv) in DMF (10 ml). The reaction mixture was stirred for 12 h at 60°C and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1) to give 308 mg of **57** (69%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 7.17 – 7.07 (d, J =9.4, 1H, CH_{Ar}), 7.04 – 6.94 (d, J =9.4, 1H, CH_{Ar}), 1.77 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 1.10 – 1.47 (s, 22H, $\text{CH}_{2\text{alkyl}}$), 0.94 – 0.88 (m, 3H, $\text{CH}_{3\text{alkyl}}$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 138.40, 138.36, 135.85, 135.54 ($\text{C}_{\text{quaternaire Ar}}$), 122.43, 119.68 (CN), 30.95, 30.32, 29.80, 29.78, 29.63, 29.56, 29.46, 29.28, 29.10, 28.89, 26.50, 26.11, 22.73 (CH_2 alkyl), 14.14 (CH_3 alkyl).

ESI-HRMS m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$: 379.2356, found : 379.2356

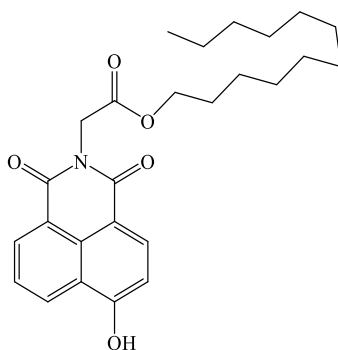
4-hydroxy- N-carboxyméthyl -1,8-naphtalimide (**58**)



To a solution of **1** (0.5 g, 1.496 mmol, 1eq), in H₂O was added NaOH (0.410 g, 10.475 mmol, 7 equiv) and stirred at reflux during 12h. The mixture was acidified (pH = 1) with aq HCl 1M to precipitate the product and filtered. The solid mass was dried on vacuum, to give 347 mg of **58** as a intense orange powder. ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.59 (2H, dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, H₆, H₁₃), 0), 8.39 (1H, d, *J* = 8 Hz, H₈), 7.85 - 7.75 (1H, m, H₁₄), 7.18 (1H, d, *J* = 8 Hz, H₇), 4.71 (2H, s, CH₂C=O). ¹³C NMR (75MHz), DMSO-*d* δ 163.82 (C₁₁), 163.25 (C₄), 157.67 (C₁₅), 133.11 (C₁₃), 131.41 (C₈), 131.05 (C₆), 130.10 (C₁₀), 125.36 (C₇), 122.8 (C₉), 115.41 (C₅), 114.73 (C₁₄), 114.30 (C₁₂), 77.45 (C₂), 70.20 (C₁), 29.23 (C₃)

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₁₄H₉NO₅ : 294.0372, found : 294.0373

Dodecyl -4-hydroxy-N-propargyl-1,8-naphthalimide (**56**)



To a suspension of **58** (0.250 g, 0.921 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (9.2 ml) was cooled to -15° C under argon. NMM (0.140 mg, 1.383 mmol, 1.5 equiv.) was added. The mixture was stirred 5 min at -15° C and isobutylchloroformiate (0.164 g, 1.20 mmol, 1.3 equiv.) was added and the mixture was stirred 5 min then lauryl amine (0.3 ml, 1.11 mmol, 1.3 equiv.) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 9 : 1) to give 260 mg of **3** as a solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ = 8.58 – 8.46 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1.3, 1H, H_{Ar}), 8.40 – 8.28 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.22 – 8.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.12 – 8.00 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.62 – 7.50 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.89 – 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.66 – 4.55 (s, 2H, CH₂N), 3.09 – 2.97 (dd, *J* = 12 Hz, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂alkyl), 1.44 – 1.31 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Alkyl), 1.27 – 1.21 (m, 15H, CH₂Alkyl), 0.91 – 0.80 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃Alkyl). ¹³C NMR (75MHz), DMSO-*d* δ 163.82 (C₁₁), 163.25 (C₄), 157.67 (C₁₅), 133.11 (C₁₃), 131.41 (C₈), 131.05 (C₆), 130.10 (C₁₀), 125.36 (C₇), 122.8 (C₉), 115.41 (C₅), 114.73 (C₁₄), 114.30 (C₁₂), 77.45 (C₂), 70.20 (C₁), 29.72, 29.68, 29.65, 29.55, 29.45, 29.41, 29.38, 29.37 (CH₂Alkyl), 29.23 (C₃) 28.87, 28.78, 28.20, 26.76, 26.09, 26.06, 22.70 (CH₂Alkyl)

ESI-HRMS *m/z* [M+Na⁺] calculated for C₂₆H₃₃NO₅ : 461.2411, found : 461.2413

II. Protocoles de physicochimie relatifs aux émulsions

A. Fabrication des émulsions au mortier

1. Dissoudre un volume de 100 μL de $5 \cdot 10^{-3}$ M dans du chloroforme de glycolipide dans 1 mL d'huile de soja (Sigma-Aldrich, Ref : S7381) pour avoir la concentration désirée de $5 \cdot 10^{-4}$ M
2. Évaporer le chloroforme pour obtenir l'huile avec les glycolipides.
3. Mélanger 170 μL d'alginate (Sigma-Aldrich Ref : 180947) à 2% et 170 μL de PE/F68 (Sigma-Aldrich Ref : 15759) à 30% m/m (phase aqueuse).
4. Ajouter goutte à goutte l'huile de soja et émulsifier à la main jusqu'à obtenir une crème.
5. Diluer l'émulsion obtenue (75%) de façon à avoir une fraction en huile de 5% et une fraction en tensioactifs de 1%
6. Introduire l'émulsion diluée dans une ampoule à décanter et laisser 24 h à l'abri de la lumière.
7. Éliminer le sous-nageant.
8. Recommencer l'étape de dilution jusqu'à ce que le sous-nageant devienne limpide
9. Récupérer l'émulsion dans un récipient en verre et la stocker à l'abri de la lumière et à 12°C .

B. Protocole de mise en contacts avec les lectines

1. Tampon

Le tampon pour la mise en contact est préparé à l'aide PBS commercial (DPBS-1X, Sigma Aldrich, Tampon phosphate 0,01 M, chlorure de potassium 0,0027 M et du chlorure de sodium 0,137 M, pH 7,4, à 25°C). La solution de PBS commercial est diluée 10 fois, et complétée avec 0,1 mM de CaCl_2 , 0,1 mM MnCl_2 et 0,007% de Tween.

2. Protocole de mise en contact des gouttes avec des lectines en solution

1. Prélever 20 μl de l'émulsion stock.
2. Ajouter 180 μl de solution tampon homogénéisé doucement.
3. Centrifuger et prélever le surnageant.
4. Recommencer le lavage.
5. Ajouter 40 μl de solution tampon et homogénéiser doucement.
6. Ajouter 10 μl de la solution de ConA Alexa 647 à 2 mg/ml (Molecular probes ref : C21421 lot : 1700378) ou de PNA 1 mg/ml (ref : Molecular probes ref : L-32460)
7. Agiter doucement avec l'agitateur rotatif pendant 30 min.
8. Ajouter 160 μl de solution tampon.
9. Homogénéiser et centrifuger
10. Prélever le sous-nageant.
11. Recommencer une fois ces étapes.
12. L'émulsion obtenue est passée au microscope après dilution dans la solution tampon.

Bibliographie

- [1] J. Kocourek and V. Horejsi, *Nature* **290**, 188 (1981).
- [2] I. J. Goldstein, L. A. Murphy, and S. Ebisu, *Pure Appl. Chem.* **49**, 1095 (1977).
- [3] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **96**, 683 (1996).
- [4] H. J. Gabius, H. C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, and H. Rüdiger, *ChemBioChem* **5**, 740 (2004).
- [5] H.-J. Gabius, *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1491 (2008).
- [6] C. L. Nilsson, in *Lectins Anal. Technol.* (2007), pp. 1–13.
- [7] D. Wiley and J. Skehel, *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 365 (1987).
- [8] T. B. H. Geijtenbeek, A. Engering, and Y. Van Kooyk, *J. Leukoc. Biol.* **71**, 921 (2002).
- [9] T. B. H. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. Van Vliet, G. C. F. Van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. Van Kooyk, and C. G. Figdor, *Cell* **100**, 575 (2000).
- [10] G. Tabarani, DC-SIGN, Un Récepteur Détourné Par Des Nombreux Pathogènes: Carcaterisation Biochimique, Structurale et Développement d'inhibiteurs, Université de Grenoble, 2008.
- [11] H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer, and W. I. Weis, *Science* **294**, 2163 (2001).
- [12] D. A. Bleijs, T. B. H. Geijtenbeek, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk, *Trends Immunol.* **22**, 457 (2001).
- [13] L. Cattiaux, V. Porkolab, F. Fieschi, and J. M. Mallet, *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 1006 (2018).
- [14] J. H. Naismith, C. Emmerich, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, W. N. Hunter, J. Raftery, A. J. Kalb, and J. Yariv, *Acta CrystallogrSectD* **50**, 847 (1994).
- [15] R. Banerjee, K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia, and M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **259**, 281 (1996).
- [16] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, and L. Wyns, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1383**, 9 (1998).
- [17] V. Kolb-Bachofen, J. Schlepper-Schäfer, W. Vogell, and H. Kolb, *Cell* **29**, 859 (1982).
- [18] H. Jaehnisch, S. Fuessel, A. Kiessling, R. Wehner, S. Zastrow, M. Bachmann, E. P. Rieber, M. P. Wirth, and M. Schmitz, *Clin. Dev. Immunol.* 517493 (2010).
- [19] S. Simoens, *Hum. Vaccines Immunother.* **8**, 506 (2012).
- [20] M. Mammen, S.-K. Choi, and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754 (1998).
- [21] M. Li, B. Wang, Z. Wu, J. Zhang, X. Shi, W. Cheng, and S. Han, *Tumor Biol.* **36**, 5497 (2015).
- [22] M. Li, B. Wang, Z. Wu, X. Shi, J. Zhang, and S. Han, *Tumor Biol.* **36**, 7961 (2015).
- [23] P. J. Tacken, I. J. M. de Vries, R. Torensma, and C. G. Figdor, *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 790 (2007).
- [24] W. Jahnke and D. A. Erlanson, editors, *Fragment-Based Approaches in Drug Discovery* (WILEY-VCH, Weinheim, 2006).
- [25] J. J. Lundquist and E. J. Toone, *Chem. Rev.* **102**, 555 (2002).
- [26] L. M. Ellis, D. S. Bernstein, E. E. Voest, J. D. Berlin, D. Sargent, P. Cortazar, E. Garrett-Mayer, R. S. Herbst, R. C. Lilenbaum, C. Sima, A. P. Venook, M. Gonen, R. L. Schilsky,

- N. J. Meropol, and L. E. Schnipper, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 1277 (2014).
- [27] S. Cecioni, *Approche Multivalente Des Interactions Saccharides-Lectines: Synthèse de Glycoclusters et Analyse de La Reconnaissance Biomoléculaire*, Université Claude Bernard-Lyon I, 2010.
- [28] S. M. Moghimi and J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.* **42**, 463 (2003).
- [29] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.* **53**, 283 (2001).
- [30] H. Tada, H. Higuchi, T. M. Wanatabe, and N. Ohuchi, *Cancer Res.* **67**, 1138 (2007).
- [31] W. B. Cai, D. W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Z. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir, and X. Y. Chen, *Nano Lett.* **6**, 669 (2006).
- [32] O. C. Farokhzad, J. J. Cheng, B. A. Tepy, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, and R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6315 (2006).
- [33] J. Chen, I. R. Corbin, H. Li, W. Cao, J. D. Glickson, and G. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5798 (2007).
- [34] Z. Zhang, S. H. Lee, and S.-S. Feng, *Biomaterials* **28**, 1889 (2007).
- [35] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161 (2005).
- [36] P. I. Kitov, H. Shimizu, S. W. Homans, and D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3284 (2003).
- [37] R. H. Kramer and J. W. Karpen, *Nature* **395**, 710 (1998).
- [38] S. Di Stefano, R. Cacciapaglia, and L. Mandolini, *Eur. J. Org. Chem.* 7304 (2014).
- [39] L. L'Haridon, *Glycodendrimères: de la synthèse aux interactions biologiques*, phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015.
- [40] J. Lu, C. Fu, S. Wang, L. Tao, L. Yan, D. M. Haddleton, G. Chen, and Y. Wei, *Macromolecules* **47**, 4676 (2014).
- [41] M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, and P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13343 (2004).
- [42] K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klivanov, and R. Langer, *Pharm. Res.* **17**, 100 (2000).
- [43] Z. El Rassi, *Adv. Chromatogr.-N. Y.-* **34**, 177 (1994).
- [44] X.-L. Hu, H.-Y. Jin, X.-P. He, T. D. James, G.-R. Chen, and Y.-T. Long, *Acs Appl. Mater. Interfaces* **7**, 1874 (2015).
- [45] A. K. Adak, B. Y. Li, and C. C. Lin, *Carbohydr. Res.* **405**, 2 (2015).
- [46] L. Lartigue, C. Innocenti, T. Kalaivani, A. Awwad, M. del M. S. Duque, Y. Guari, J. Larionova, C. Guerin, J.-L. G. Montero, V. Barragan-Montero, P. Arosio, A. Lascialfari, D. Gatteschi, and C. Sangregorio, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10459 (2011).
- [47] D. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym. J.* **17**, 117 (1985).
- [48] G. Newkome, Z. Yao, G. Baker, and V. Gupta, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **189**, 166 (1985).
- [49] L. Brumfield and H. Mclane, *Soft Matter and Colloidal Chemistry*. (Academic Studio, Delhi, 2012).
- [50] S. Theoharis, U. Krueger, P. H. Tan, D. O. Haskard, M. Weber, and A. J. T. George, *J. Immunol. Methods* **343**, 79 (2009).
- [51] R. Duncan and L. Izzo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2215 (2005).
- [52] *IntegratedHealthBlog.Com* (2017).
- [53] V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1532 (2006).
- [54] J. Weinstein and L. Leserman, *Pharmacol. Ther.* **24**, 207 (1984).
- [55] A. Gabizon, H. Shmeeda, and Y. Barenholz, *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 419 (2003).
- [56] G. Cevc, *Phospholipids Handbook* (CRC Press, 1993).

- [57] O. Sandre, L. Moreaux, and F. Brochard-Wyart, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 10591 (1999).
- [58] P. F. Fahey, D. E. Koppel, L. S. Barak, D. E. Wolf, E. L. Elson, and W. W. Webb, *Science* **195**, 305 (1977).
- [59] F. Perche, T. Benvegnu, M. Berchel, L. Lebegue, C. Pichon, P.-A. Jaffres, and P. Midoux, *Nanomedicine-Nanotechnol. Biol. Med.* **7**, 445 (2011).
- [60] H. Pinto-Alphandary, A. Andremont, and P. Couvreur, *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**, 155 (2000).
- [61] F. Leal-Calderon, V. Schmitt, and J. Bibette, *Emulsion Science: Basic Principles*, 2nd ed. (Springer, 2007).
- [62] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, and American Pharmacists Association, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Pharmaceutical Press; American Pharmacists Association, London; Greyslake, IL; Washington, DC, 2006).
- [63] CRC Press (1995).
- [64] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, and G. D. Stucky, *J Am Chem Soc* **120**, 6024 (1998).
- [65] CRC Press (1996).
- [66] W. B. Liechty, D. R. Kryscio, B. V. Slaughter, and N. A. Peppas, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **1**, 149 (2010).
- [67] CRC Press (1987).
- [68] M. Avci-Adali, A. Behring, T. Keller, S. Krajewski, C. Schlensak, and H. P. Wendel, *J. Biol. Eng.* **8**, 8 (2014).
- [69] M. Currò, A. Trovato-Salinaro, A. Gugliandolo, G. Koverech, F. Lodato, D. Caccamo, V. Calabrese, and R. Ientile, *J. Neurosci. Res.* **93**, 149 (2015).
- [70] S. a Maskarinec, J. Hannig, R. C. Lee, and K. Y. C. Lee, *Biophys. J.* **82**, 1453 (2002).
- [71] T. M. Obey and B. Vincent, *J. Colloid Interface Sci.* **163**, 454 (1994).
- [72] E. Dickinson and B. Bergenstahl, *Food Colloids. Proteins, Lipids and Polysaccharides* (WILEY-VCH Verlag GmbH, 1997).
- [73] M. Poux and J.-P. Canselier, *Tech. Ing. Génie Procédés* (2004).
- [74] F. Leal-Calderon, V. Schmitt, and J. Bibette, *Emulsion Science: Basic Principles* (Springer, 2007).
- [75] S. M. Joscelyne and G. Trägårdh, *J. Membr. Sci.* **169**, 107 (2000).
- [76] T. Delmas, H. Piraux, A.-C. C. Couffin, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M. E. Cates, and J. J. Bibette, *Langmuir* **27**, 1683 (2011).
- [77] T. S. H. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish, and M. Ashokkumar, *Ultrason. Sonochem.* **16**, 721 (2009).
- [78] B. Abismaïl, J. Canselier, A. Wilhelm, H. Delmas, and C. Gourdon, *Ultrason. Sonochem.* **6**, 75 (1999).
- [79] N. Bremond and J. Bibette, *Soft Matter* **8**, 10549 (2012).
- [80] W. C. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **41**, 940 (1919).
- [81] B. P. Binks and T. S. Horozov, editors, *Colloidal Particles at Liquid Interfaces* (Cambridge University Press, Cambridge ; New York, 2006).
- [82] J. Bibette and D. Roux, *Phys. Rev. Lett.* (1990).
- [83] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (2011).
- [84] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, *Capillarity and Wetting Phenomena* (Springer New York, New York, NY, 2004).
- [85] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. C. Chan, and R. F. Tabor, *J. Colloid Interface Sci.* **454**, 226 (2015).
- [86] C. E. Stauffer, *J. Phys. Chem.* **69**, 1933 (1965).

- [87] T. Chakraborty, I. Chakraborty, and S. Ghosh, *Arab. J. Chem.* **4**, 265 (2011).
- [88] V. D. Samith, G. Miño, E. Ramos-Moore, and N. Arancibia-Miranda, *J. Appl. Polym. Sci.* **130**, 2159 (2013).
- [89] M. Hashida, M. Egawa, S. Muranishi, and H. Sezaki, ... *Pharmacokinet. ...* **5**, (1977).
- [90] S. Kawakami, F. Yamashita, and M. Hashida, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**, 77 (2000).
- [91] Y. Mizushima, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **20**, 113 (1996).
- [92] M. Hashida, S. Kawakami, and F. Yamashita, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **53**, 871 (2005).
- [93] S. Tamilvanan, *Prog. Lipid Res.* **43**, 489 (2004).
- [94] F. Leal-Calderon and M. Cansell, *Soft Matter* **8**, 10213 (2012).
- [95] H. M. Deckers, G. van Rooijen, J. Boothe, J. Goll, M. M. Moloney, A. B. Schryvers, J. Alcantara, and W. A. Hutchins, US6761914 B2 (July 2004).
- [96] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, and A. P. Association, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Pharmaceutical press London, 2006).
- [97] O. Campàs, T. Mammoto, S. Hasso, R. a Sperling, D. O'Connell, A. G. Bischof, R. Maas, D. a Weitz, L. Mahadevan, and D. E. Ingber, *Nat. Methods* **11**, 183 (2013).
- [98] J. Fattaccioli, J. Baudry, N. Henry, F. Brochard-Wyart, and J. Bibette, *Soft Matter* **4**, 2434 (2008).
- [99] J. Emerard, *Utilisation de Gouttelettes d'émulsion Pour l'étude de l'adhésion Spécifique Entre Deux Surfaces Fluides*, 2010.
- [100] N. Bourouina, J. Husson, F. Waharte, R. B. Pansu, and N. Henry, *Soft Matter* **7**, 9130 (2011).
- [101] N. Bourouina, J. Husson, C. Hivroz, and N. Henry, *Langmuir* **28**, 6106 (2012).
- [102] K. Ben M'Barek, *Adhésion et Phagocytose de Gouttes d'émulsions Fonctionnalisées*, Université Pierre et Marie Curie, 2015.
- [103] Y. Yao, W. Huang, X. Yang, W. Sun, X. Liu, W. Cun, and Y. Ma, *Vaccine* **31**, 2289 (2013).
- [104] S. Liang, H. Yu, J. Xiang, W. Yang, X. Chen, Y. Liu, C. Gao, and G. Yan, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **97**, 359 (2012).
- [105] C. Jia, H. Li, J. Jiang, J. Wang, H. Chen, D. Cao, J. F. Stoddart, and X. Guo, *Adv. Mater.* **25**, 6752 (2013).
- [106] L. Pessoni, J. De Winter, M. Surin, N. Hergué, N. Delbosc, R. Lazzaroni, P. Dubois, P. Gerbaux, and O. Coulembier, *Macromolecules* **49**, 3001 (2016).
- [107] X. Liu, Y. Wang, C. Chen, A. Tintaru, Y. Cao, J. Liu, F. Ziarelli, J. Tang, H. Guo, R. Rosas, S. Giorgio, L. Charles, P. Rocchi, and L. Peng, *Adv. Funct. Mater.* **26**, 8594 (2016).
- [108] (n.d.).
- [109] M. Collot, J. Savreux, and J.-M. Mallet, *Tetrahedron* **64**, 1523 (2008).
- [110] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **40**, 2004 (2001).
- [111] R. Huisgen, R. Grashey, M. Seidel, R. Schmidt, H. Knupfer, and G. Wallbillich, *Ann. Chem.-Justus Liebig* **653**, 105 (1962).
- [112] M. Yamashita, K. Suzuki, Y. Kato, A. Iida, K. Ikai, P. M. Reddy, and T. Oshikawa, *J. Carbohydr. Chem.* **18**, 915 (1999).
- [113] W. Rudolf and D. Janietz, *J. Prakt. Chem.* **329**, 55 (1987).
- [114] D. Hlasta and J. Ackerman, *J. Org. Chem.* **59**, 6184 (1994).
- [115] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **41**, 2596 (2002).
- [116] M. Meldal and C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **108**, 2952 (2008).

- [117] Y. Ding, J. Han, B. Tian, J. Han, J. Zhang, H. Zheng, Y. Han, and M. Pei, *Int. J. Pharm.* **477**, 187 (2014).
- [118] J. Yang, Y. Wang, A. Rassat, Y. Zhang, and P. Sinaÿ, *Tetrahedron* **60**, 12163 (2004).
- [119] C.-C. Cheng, H.-W. Liao, J.-K. Chen, D.-J. Lee, and Z. Xin, *RSC Adv* **6**, 23949 (2016).
- [120] M. Albrecht, P. Stortz, J. Runsink, and P. Weis, *Chem. – Eur. J.* **10**, 3657 (2004).
- [121] E. H. Ryu and Y. Zhao, *Org. Lett.* **7**, 1035 (2005).
- [122] P. Lécorché, *Conception, Synthèse et Évaluations de Peptides Vecteurs Glycosylés Pour Une Application En Vectorologie* (Paris 6, 2010).
- [123] M. Domurado, D. Domurado, S. Vansteenkiste, A. De Marre, and E. Schacht, *J. Controlled Release* **33**, 115 (1995).
- [124] A. Engel, S. K. Chatterjee, A. Al-Arifi, and P. Nuhn, *J. Pharm. Sci.* **92**, 2229 (2003).
- [125] H. Yoshioka, T. Ohmura, M. Hasegawa, S. Hirota, M. Makino, and M. Kamiya, *J. Pharm. Sci.* **82**, 273 (1993).
- [126] K. Shimada, J. A. A. M. Kamps, J. Regts, K. Ikeda, T. Shiozawa, S. Hirota, and G. L. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1326**, 329 (1997).
- [127] S.-W. Tam-Chang, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, N. Jeon, and R. G. Nuzzo, *Langmuir* **11**, 4371 (1995).
- [128] N. Harada, S. Nishiyama, M. Kanazawa, and H. Tsukada, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **56**, 553 (2013).
- [129] Z. C. Kennedy, C. E. Lisowski, D. S. Mitaru-Berceanu, and J. E. Hutchison, *Langmuir* **31**, 12742 (2015).
- [130] M. Mach, U. Schlueter, F. Mathew, B. Fraser-Reid, and K. C. Hazen, *Tetrahedron* **58**, 7345 (2002).
- [131] N. Varga, I. Sutkeviciute, R. Ribeiro-Viana, A. Berzi, R. Ramdasi, A. Daggetti, G. Vettoretti, A. Amara, M. Clerici, J. Rojo, F. Fieschi, and A. Bernardi, *Biomaterials* **35**, 4175 (2014).
- [132] R. Aveyard, B. P. Binks, J. Chen, J. Esquena, P. D. I. Fletcher, R. Buscall, and S. Davies, *Langmuir* **14**, 4699 (1998).
- [133] B. J. Boyd, C. J. Drummond, I. Krodkiewska, and F. Grieser, *Langmuir* **16**, 7359 (2000).
- [134] M. J. Rosen, A. W. Cohen, M. Dahanayake, and X. Y. Hua, *J. Phys. Chem.* **86**, 541 (1982).
- [135] T. Mason and J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3481 (1996).
- [136] D. S. Ivanov, J. D. Lević, and S. A. Sredanović, *J Inst Food Technol Novi Sad* **37**, 65 (2010).
- [137] H. Chung, T. W. Kim, M. Kwon, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, *J. Controlled Release* **71**, 339 (2001).
- [138] A. Al-Saden, T. Whateley, and A. Florence, *J. Colloid Interface Sci.* **90**, 303 (1982).
- [139] G. Wu, J. Majewski, C. Ege, K. Kjaer, J. Weygand, and K. Y. C. Lee, **89**, (2005).
- [140] T. F. Svitova and C. J. Radke, *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 1129 (2005).
- [141] L. M. Pérez-Mosqueda, J. Maldonado-Valderrama, P. Ramírez, M. a Cabrerizo-Vílchez, and J. Muñoz, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **111**, 171 (2013).
- [142] a. Torcello-Gómez, a. B. Jódar-Reyes, J. Maldonado-Valderrama, and a. Martín-Rodríguez, *Food Res. Int.* **48**, 140 (2012).
- [143] R. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, editors, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed. (Pharmaceutical Press, 2009).
- [144] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, *Nat. Methods* **9**, 676 (2012).
- [145] C. a Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **9**, 671 (2012).

- [146] T. J. Rink, R. Y. Tsien, and T. Pozzan, *J. Cell Biol.* **95**, 189 (1982).
- [147] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, A. Orte, E. M. Talavera, and J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A* **110**, 9334 (2006).
- [148] J. Han and K. Burgess, *Chem. Rev.* **110**, 2709 (2010).
- [149] J. E. Whitaker, R. P. Haugland, and F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.* **194**, 330 (1991).
- [150] J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, and K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 1642 (2009).
- [151] I. Kurtz and R. S. Balaban, *Biophys. J.* **48**, 499 (1985).
- [152] H. T. S. Britton and R. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Resumed* 1456 (1931).
- [153] M. Berchel, J.-P. Haelters, H. Couthon-Gourvès, L. Deschamps, P. Midoux, P. Lehn, and P.-A. Jaffrès, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6294 (2011).
- [154] A. Gille and M. Hiersemann, *Org. Lett.* **12**, 5258 (2010).

Résumé

Certains agents pathogènes ou cellules tumorales échappent au système immunitaire parce que les cellules immunitaires ne reconnaissent pas les peptides ou protéines présents à leur surface. Les approches thérapeutiques favorisant la reconnaissance de ces peptides ou protéines faiblement immunogènes sont donc très attractives. Pour ainsi forcer l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, plusieurs systèmes ont été décrits, à base de liposomes ou de nanoparticules inorganiques. Nous proposons ici d'utiliser un système à base de gouttelettes d'huile.

Les micro ou nanogouttelettes d'huile végétale présentent de nombreux avantages par rapport aux microparticules solides inorganiques. Faites de triglycérides naturels, elles sont biocompatibles et biodégradables tout en étant plus robustes que les liposomes. Ce sont des plates-formes idéales pour construire des assemblages multifonctionnels pour la vectorisation.

La première partie du projet traite de la synthèse de glycolipides nécessaires pour avoir une reconnaissance des gouttelettes par les lectines présentes dans le système immunitaire (DC-sign). La seconde partie du projet traite de la fabrication des gouttelettes d'huile fonctionnalisées avec les glycolipides précédemment synthétisés et la mise en évidence de leurs interactions avec des lectines.

Mots Clés

Nanogouttelettes, glycolipides, DC-sign, vectorisation.

Abstract

Some pathogens or tumour cells escape the immune system because the immune cells misrecognize their surface peptides or proteins. Therapeutic approaches, promoting the recognition of these poorly immunogenic peptides or proteins are thus very attractive. The strategy is then to process directly peptides or proteins through cell presenting cells. To this end, some systems have been described, based on liposome or nanoparticles. We propose to use an oil droplet based system.

Among the microparticles, vegetal oil microdroplets have numerous advantages over solid microparticles. Made of natural triglycerides, they are biocompatible and biodegradable. They are ideal platforms to build multifunctional assemblies for vectorization.

In this project, we aim to design and address lipid (soya oil) droplet to dendritic cells via the lectin DC -sign. The first part deals of the synthesis of glycolipids necessary for the recognition by lectins. The second part presents the fabrication of functionalized oil droplets with previously synthesized glycolipids and their interaction with lectins.

Keywords

Nanodroplets, glycolipids, DC-sign, vectorization.