



Conception et synthèse d'auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques pour les applications en nanomédecine et en catalyse

Minh Duc Hoang

► To cite this version:

Minh Duc Hoang. Conception et synthèse d'auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques pour les applications en nanomédecine et en catalyse. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2019. Français. NNT : 2019SACLS371 . tel-02420650

HAL Id: tel-02420650

<https://theses.hal.science/tel-02420650>

Submitted on 20 Dec 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.

Conception et synthèse d'auto- assemblages d'amphiphiles diacétyléniques pour les applications en nanomédecine et en catalyse

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Paris Sud

École doctorale n°571 : Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 7 Novembre 2019, par

Minh Duc Hoang

Composition du Jury :

Mme Cécilia Ménard-Moyon
Chargée de recherche, CNRS Strasbourg
M. François-Xavier Felpin
Professeur, Université de Nantes
M. Nicolas Tsapis
Directeur de recherche, Institut Galien
M. Edmond Gravel
Chercheur, CEA Saclay
M. Eric Doris
Chercheur, CEA Saclay

Rapporteur

Rapporteur

Président

Directeur de thèse

Invité

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier Frédéric Taran de m'avoir accueilli au SCBM.

Je suis également reconnaissant à mon directeur de thèse Edmond Gravel et mon chef d'équipe Éric Doris de m'avoir proposé ce sujet, pour les orientations scientifiques qu'ils m'ont suggérées et surtout d'avoir pris le temps nécessaire pour la correction de ce manuscrit.

Je souhaite remercier aussi les membres du jury, le Dr. Cecilia Menard-Moyon, le Prof. Francois-Xavier Felpin et le Dr. Nicolas Tsapis, d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Merci à l'équipe du Dr. Guillaume Pinna de m'avoir aidé dans la réalisation des tests biologiques *in vitro*. Je n'ose pas imaginer ce qu'aurait été ma thèse sans vous.

En ce qui concerne mes collègues du Tritium, je tiens tout particulièrement à remercier Anaëlle de m'avoir bien soutenu au début de la thèse et de m'avoir appris ce qu'il fallait savoir pour travailler avec des micelles. Merci à Praveen et Gopi d'avoir été des voisins de paillasse très agréables et m'avoir fait découvrir l'Inde. Merci à Arun, mon cher collaborateur pour tous les composés que tu as préparés pour nos projets communs. Merci beaucoup Florence pour ta bonne humeur tous les matins et tes gâteaux délicieux. Cela m'a fait un grand plaisir que de travailler avec toi. Sébastien, tu es un excellent technicien. Merci beaucoup pour tout ce que tu m'as montré au laboratoire. Alaric, merci de m'avoir appris à utiliser la CombiFlash. Grâce à toi, j'ai pu économiser énormément de temps pour les purifications. Lucas, merci également pour les discussions que l'on a pu avoir que ce soit pour la chimie ou le reste, c'était agréable d'être dans le même labo. Enfin, je voudrais aussi remercier toutes les autres personnes qui ont fait ou font encore partie du labo Tritium : Olivia, Marielle, Alberto, Viktor, Lucie, Jérémy, et les autres si j'en oublie...

Ensuite, je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer au sein du SCBM pendant ces trois années. Merci aux filles du C14, Karine, Margaux, Sabrina, j'ai apprécié de pouvoir discuter avec vous. Merci à Antonio, Gianluca, Mingheo ainsi que tous les autres membres du C14, je suis content d'avoir fait votre rencontre. Merci à ceux de la combi et la recherche, Robin, Florian, Egor, Wei et Jean-Christophe. Bien évidemment, je ne peux pas oublier l'équipe d'analyse, David, Céline, Élodie, Amélie et Sabrina qui ont analysé de nombreux échantillons issus de mes synthèses. Je ne perdrais jamais le souvenir des personnes qui m'ont aidé de manière indirecte tout au long de mon travail, à commencer par Chantal pour tout le support administratif. Je remercie également Cristelle et Fabrice non seulement pour leur bonne humeur mais aussi pour les commandes de produits chimiques et la réparation des appareils.

Je suis reconnaissant à toute ma famille et plus particulièrement mes parents, mon frère et ma sœur de m'avoir soutenu pendant ces trois années qui n'ont pas été de tout repos. Je suis très triste que vous ne puissiez pas assister à ma soutenance. J'aurais aimé partager ce moment avec vous.

Mais qu'aurait été ma thèse sans cette rencontre avec toi ? Tu t'es présentée à moi comme une évidence et depuis tu constitues mon bonheur au quotidien. Tu as été une confidente, un soutien et une source de motivation. Merci tout simplement d'être toi...

TABLE DES MATIERES

Remerciement	3
Table des matières	5
Liste des abréviations	11
Avant-propos	13
Chapitre I : Introduction générale	15
I. Bref historique : découverte et développement des polydiacétylènes	17
II. Propriétés chromatiques des polydiacétylènes	19
III. Propriétés d'auto-assemblage des amphiphiles DA.....	20
1. Films de Langmuir et Langmuir-Blodgett (LB)	23
2. Liposomes/vésicules.....	24
3. Colloïdes non sphériques	27
4. Micelle PDA	29
IV. Accroissement des propriétés physiques à l'aide de la polymérisation	30
V. Conclusion et objectifs de la thèse.....	32
Chapitre II : Micelles polydiacétyléniques pour la transfection d'ARN interférent	35
I. La délivrance de siARN	37
1. La découverte des ARN interférents	37
2. Mécanisme d'interférence par ARN	37
3. Contraintes associées à la transfection des siARN	38
4. Les outils disponibles pour la transfection de siARN.....	39
a. Modification chimique des siARN.....	39
b. Les vecteurs viraux	40
c. Les vecteurs synthétiques	41
II. Micelles PDA précédemment développées dans notre laboratoire.	42
III. Micelles cationiques pour la transfection de siARN	44
1. Synthèses de nouveaux amphiphiles cationiques diacétyléniques.....	44
2. Formation des micelles cationiques polymérisées.....	45
3. Caractérisation des micelles II.1 formées.....	45
a. Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)	45
b. Analyse par DLS et mesure du potentiel zêta.....	46
c. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose	47
4. Transfection de siARN	47

IV.	Étude structure-activité du composé actif II.1	49
1.	Conception rationnelle de nouveaux amphiphiles cationiques	49
2.	Synthèse des amphiphiles II.5 et II.8 et formation des micelles	50
3.	Transfection de siARN avec les micelles II.5 et II.8.....	51
V.	Modifications de la tête amine de l'amphiphile II.1.....	53
1.	Conception et synthèse de nouveaux amphiphiles.....	53
2.	Formations et caractérisation des micelles.....	54
3.	Transfection de siARN avec micelles II.10, II.11 et II.13	55
VI.	Optimisation de la transfection et caractérisation des complexes micelle II.10@siARN	57
1.	Optimisation de la transfection des micelles II.10	57
2.	Caractérisation des complexes micelle II.10@siARN	58
a.	Analyse par DLS et mesure du potentiel zêta.....	58
b.	Visualisation de l'internalisation des complexes micelle@siARN	59
VII.	Conclusion	60
Chapitre III : Micelles pour la catalyse <i>in vitro</i>		63
I.	La catalyse en milieu micellaire	65
II.	La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen	67
III.	Préparation du catalyseur	71
1.	Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde cuivreux (Cu ₂ O NP).....	71
2.	Formation et caractérisation des micelles	72
a.	Synthèse de l'amphiphile DAPEG ₅₅₀	72
b.	Formation et caractérisation des micelles polymérisées (pDAPEG ₅₅₀)	73
3.	Assemblage du catalyseur micellaire	73
IV.	Évaluation de l'activité catalytique du catalyseur en cellules.....	74
1.	Stratégie	74
2.	Préparation des réactifs	75
a.	Synthèse organique des composés III.2 et III.3	75
b.	Protocole d'encapsulation des composés d'intérêt dans les micelles	76
c.	Détermination du taux d'encapsulation.....	76
3.	Contrôle de l'intensité de fluorescence des échantillons	77
4.	Évaluation préliminaire de la réaction de cycloaddition	78
5.	Évaluation de l'activité catalytique dans les cellules.....	80
V.	Conclusion	84

Chapitre IV : Assemblages supramoléculaires pour la catalyse énantiosélective de réactions d'aldolisation dans l'eau.....	85
I. Réactions d'aldolisation asymétriques directes en milieu aqueux	87
II. Utilisation des nanotubes PDA comme catalyseur.....	92
III. Développement de nouveaux catalyseurs supramoléculaires.....	93
1. Conception et synthèse de l'amphiphile	93
2. Préparation des catalyseurs	94
a. Préparation des micelles pDAPro	95
b. Préparation des nano-rubans pDAPro.....	95
3. Application à la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau.	96
a. Criblage du système catalytique.....	96
b. Criblage des conditions pour la réaction d'aldolisation catalysée par les nano-rubans rouges pDAPro.....	98
c. Exemplification du système des nano-rubans pDAPro	99
d. Recyclage du catalyseur	101
4. Application à la réaction de Michael asymétrique dans l'eau	103
5. Application à la réaction de Mannich directe asymétrique dans l'eau	105
IV. Développement d'un nouveau catalyseur supramoléculaire	107
1. Synthèse de l'amphiphile	107
2. Formulation de l'amphiphile IV.10 en nano-bâtonnets	108
3. Application des nano-bâtonnets à la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau	109
V. Conclusion	109
Conclusion générale	111
Partie expérimentale	115
Chapter II : Micelles polydiacétyléniques pour la transfection d'ARN interférent	118
I. Organic synthesis.....	118
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pentacos-10,12-dienoate (II.1')	118
N-(2-aminoethyl)pentacos-10,12-dienamide (II.1)	119
Pentacos-10,12-dien-1-ol (II.2).....	120
Pentacos-10,12-dienyl-4-methylbenzenesulfonate (II.3).....	121
tert-butyl (2-(pentacos-10,12-dien-1-ylamino)ethyl)carbamate (II.4)	122
N ¹ -(pentacos-10,12-dien-1-yl)ethane-1,2-diaminium chloride (II.5)	123
N ¹ ,N ² ,N ³ -tri-tert-BOC-spermine (II.6)	124

<i>tert</i> -butyl (4-((<i>tert</i> -butoxycarbonyl)(3-((<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)butyl)(3-(pentacosa-10,12-diynamido)propyl)carbamate (II.7)	125
<i>N</i> ¹ -(3-ammoniopropyl)- <i>N</i> ⁴ -(3-(pentacosa-10,12-diynamido)propyl)butane-1,4-diaminium chloride (II.8)	126
<i>tert</i> -butyl methyl(2-(pentacosa-10,12-diynoylamino)ethyl)carbamate (II.9)	127
<i>N</i> -methyl-2-(pentacosa-10,12-diynoylamino)ethanaminium chloride (II.10)	128
<i>N</i> -(2-(dimethylamino)ethyl)pentacosa-10,12-diynamide (II.11).....	129
<i>N,N,N</i> -trimethyl-2-(pentacosa-10,12-diynamido) ethan-1-aminium iodide (II.12)	130
<i>N,N,N</i> -trimethyl-2-(pentacosa-10,12-diynamido) ethan-1-aminium chloride (II.13)	131
II. Synthesis and characterization of polymerized micelle	132
1. Assembly and dialysis of the micelles	132
2. Critical Micelle Concentration (CMC) measurements.....	132
3. Size measurements by Dynamic Light Scattering (DLS)	132
4. Zeta potential measurements	132
5. Gel retardation assay.....	133
III. siRNA transfection and proliferation/survival assay	133
IV. Optimization of transfection of micelle II.10 and characterization of complexes micelle II.10@siRNA	134
1. Optimization of transfection of micelle II.10.....	134
2. Size distribution and zeta potential measurement of complexes micelle II.10@siRNA	134
3. Cellular uptake of complexes micelle@siRNA.....	135
Chapter III : Micelles PDA pour la catalyse <i>in vitro</i>	136
I. Organic synthesis.....	136
DAPEG ₅₅₀ (III.1)	136
3-Azido-7-hydroxycoumarin (III.2)	137
7-hydroxy-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromen-2-one (III.3)	138
II. Formation of catalysts and reagents	139
1. Synthesis and characterization of pDAPEG ₅₅₀ micelles	139
2. Synthesis and characterization of Cu ₂ O nanoparticles.....	139
3. Encapsulation of Cu ₂ O nanoparticles in micelles	139
4. Encapsulation of reagents in micelles	140
III. Evaluation of the click reaction in vial.....	140
1. Evaluation of the click reaction at high dilution.....	140
2. Evaluation of the click reaction with encapsulated reagents.....	140
IV. Evaluation of the click reaction in living cell	141

Chapter IV : Des assemblages PDA pour la catalyse énantiosélective de réactions d'aldolisation dans l'eau	142
I. Organic synthesis	142
<i>tert</i> -Butyl-2-((2-(pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)carbamoyle)pyrrolidine-1-carboxylate	142
2-((2-(Pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)carbamoyle)pyrrolidin-1-ium chloride (IV.1).....	143
1- <i>tert</i> -butyl 2-methyl (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-(((4-methylphenyl)sulfonyl)oxy)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.5)	144
1- <i>tert</i> -butyl 2-methyl (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-azidopyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.6)	145
1- <i>tert</i> -butyl 2-methyl (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-aminopyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.7)	146
1- <i>tert</i> -butyl 2-methyl (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(pentacosa-10,12-diynoylamino)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.8)	147
(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4-(pentacosa-10,12-diynoylamino)pyrrolidine-2-carboxylic acid (IV.9)	148
(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-carboxy-4-(pentacosa-10,12-diynoylamino)pyrrolidinium chloride (IV.10)	149
<i>N</i> -(4-methoxyphenyl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine	150
Analytical data for aldol, Mannich and Michael product.....	151
2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4aa)	152
2-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ab)	152
2-(Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ac)	152
Methyl 4-(hydroxy(2-oxocyclohexyl)methyl)benzoate (IV.4ad).....	152
2-((4-Chlorophenyl)(hydroxy)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ae)	153
2-((4-Bromophenyl)(hydroxy)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4af).....	153
4-(Hydroxy(2-oxocyclohexyl)methyl)benzonitrile (IV.4ag).....	153
2-(Hydroxy(phenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ah)	153
2-(Hydroxy(4-methoxyphenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ai).....	154
2-(Hydroxy(pyridin-4-yl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4aj).....	154
2-(Hydroxy(naphthalen-1-yl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ak).....	154
2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cyclopentan-1-one (IV.4ba)	154
2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cycloheptan-1-one (IV.4ca).....	155
4-Hydroxy-4-(4-nitrophenyl)butan-2-one (IV.4da).....	155
1-Hydroxy-1-(4-nitrophenyl)nonan-3-one (IV.4ea)	155
2-(2-nitro-1-phenylethyl)cyclohexan-1-one	155
2-(((4-methoxyphenyl)amino)(4-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one.....	156
II. Self-assembly procedure	156
1. Micelle assembly from amphiphile IV.1	156

2.	Nanoribbon assembly from amphiphile IV.1.....	156
3.	Nanorod assembly from amphiphile IV.10.....	157
III.	Characterization of all the assemblies.....	157
1.	Size measurements by Dynamic Light Scattering (DLS) of micelles	157
2.	TEM observation of the nanoribbon and the nanorod systems	157
3.	UV-absorption and Circular dichroism (CD) spectra of the nanoribbons.....	158
IV.	Catalysis	158
1.	General procedure for the aldol reaction	158
2.	Recycling procedure of the nanoribbon.....	158
3.	Procedure for the Mannich reaction catalyzed by the nanoribbon system.....	158
4.	Procedure for the Michael reaction catalyzed by the nanoribbon system.....	159
	Bibliographie.....	161

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	Adeno-associated virus
Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
BAC	Benzalkonium Chloride
BTAA	2-(4-((bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid
BTES	3-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propane-1-sulfonic acid
CD	Dichroïsme circulaire
CHS	Chalcone synthase
CMC	Concentration Micellaire Critique
CPC	Cetyl-pyridinium chloride
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CuAAC	Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
Cu ₂ O@pDAPEG	Nanoparticule de Cu ₂ O encapsulé dans les micelles/le catalyseur
DA	Diacétylène
DCM	Dichlorométhane
DDAB	Dialkyldimethylammonium Bromide
DDAC	Dialkyldimethylammonium Chloride
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMF	Diméthylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dr	Rapport diastéréomérique
dsARN	Double-stranded RNA
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EDCI	N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ee	Excès énantiomérique
h	Constante de Planck
HATU	Hexafluorophosphate de N,N-diméthylméthaniminium
HBG	HEPES buffered Glucose/Tampon HEPES glucose
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance/Balance hydrophile-lipophile
HOMO	Orbitale moléculaire la plus haute occupée
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LB	Langmuir-Blodgett
LEC	Longueur effective de conjugaison
LNA	Locked nucleic acid
LUMO	Orbitale moléculaire la plus basse vacante

MOF	Metal Organic Framework
MWCO	Molecular weight Cut-off
NP	Nanoparticules
NTA	Nitrilo-triacétique
OA	Acide oléique
P	Critical packing parameter/paramètre d'empilement critique
PCDA	Acide 10,12-pentacosadiyoniq
PDA	Polydiacétylène
PDADMAC	poly(diallyldimethylammonium chloride)
PDTM	N-(11-O-R-D-Mannopyranosyl-3,6,9-trioxa)undecyl 10,12-pentacosadiynamide
PEG	Polyéthylèneglycol
PEI	Polyéthylèneimines
PTX	Paclitaxel
QAC	Composés d'ammonium quaternaire
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNase	Ribonucléase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Scanning Electron Microscope
siARN	Small interfering ARN/petit ARN interférent
Tampon TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBSA	tert-Butylsulfonamide
TBTA	Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine
TEM	Microscopie électronique à transmission
TFA	Acide trifluoroacétique
THAP	Gallacetophenone
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TRCDA	Acide 10,12-tricosadiynoïque
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
XPS	Spectroscopie photoélectronique aux rayons X
γ	Gamma

AVANT-PROPOS

Les travaux décrits dans ce manuscrit portent sur l'étude de nanostructures obtenues par auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques polymérisables. Essentiellement deux familles de composés ont été étudiées (micelles sphériques et rubans en bicouches) et valorisées, d'une part, pour des applications biomédicales et, d'autre part, pour la catalyse.

Dans un **premier chapitre**, une étude bibliographique sur des molécules incorporant des motifs diacétyléniques sera présentée. Ce chapitre a pour but d'introduire la chimie des polydiacétylènes, leurs différentes structurations supramoléculaires et leurs domaines d'applications potentielles.

Un **second chapitre** sera consacré à la synthèse de micelles cationiques polymérisées assemblées à partir d'amphiphiles diacétyléniques. Ces micelles ont été valorisées pour la prise en charge et la transfection d'ARN interférents *in vitro*.

Dans un **troisième chapitre**, un catalyseur micellaire « biocompatible » incorporant du cuivre a été développé pour promouvoir des transformations chimiques *in vitro*. Nos études ont ainsi porté sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen que nous avons mise en œuvre dans le compartiment intracellulaire.

Une dernière partie sera dédiée à la synthèse et à la formulation d'amphiphiles diacétyléniques en différentes architectures supramoléculaires qui ont été ensuite utilisées pour la catalyse asymétrique et semi-hétérogène de la réaction d'aldolisation.

Enfin, l'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés au cours de cette thèse fera l'objet d'un dernier chapitre rédigé en anglais.

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les composés polydiacétyléniques (PDA) constituent une famille de polymères dotés de propriétés optiques uniques. Ces polymères sont obtenus par auto-assemblage puis polymérisation (par exemple par irradiation lumineuse sous UV) d'unités monomères diacétyléniques donnant classiquement naissance à un système conjugué linéaire étendu non fluorescent, d'un bleu profond. Ce polymère peut évoluer vers un polymère fluorescent rouge en réponse à divers stress environnementaux. Cette dernière propriété associée au caractère chromatique et émissif des polydiacétylènes a été exploitée pour la fabrication de capteurs biologiques et chimiques. Ces applications en chemo- et biodétection sont essentiellement réservées à des auto-assemblages structurés en bicouches lipidiques.

Il existe par ailleurs des amphiphiles diacétyléniques qui peuvent s'auto-assembler sous forme de structures micellaires sphériques exploitables dans le domaine de la nanomédecine. Des études antérieures menées par notre laboratoire ont en effet mis en évidence que des micelles polydiacétyléniques pouvaient être obtenues dans certaines conditions opératoires. Ces micelles ont été valorisées précédemment *in vivo* comme système d'administration et de vectorisation de médicaments ainsi que pour l'imagerie tumorale. Des catalyseurs construits à partir de micelles PDA ont également été développées au sein de notre groupe de recherche.

En m'appuyant sur l'expertise de mon laboratoire, j'ai eu pour objectif au cours de cette thèse de valoriser différentes structurations polydiacétyléniques pour des applications en nanomédecine et en catalyse.

I. Bref historique : découverte et développement des polydiacétylènes

La première étude sur des matériaux polydiacétyléniques (PDA) a été réalisée par Wegner en 1969.¹ Dans cette étude, l'auteur a étudié la polymérisation induite par la lumière ou par la chaleur de dérivés fonctionnels du 2,4-hexadiyne-1,6-diol. Le motif 2,4-hexadiyne-1,6-diol-bis-phényluréthane s'est montré être le plus réactif des composés évalués et conduit, après polymérisation, à des fibres hautement cristallines (Figure 1).

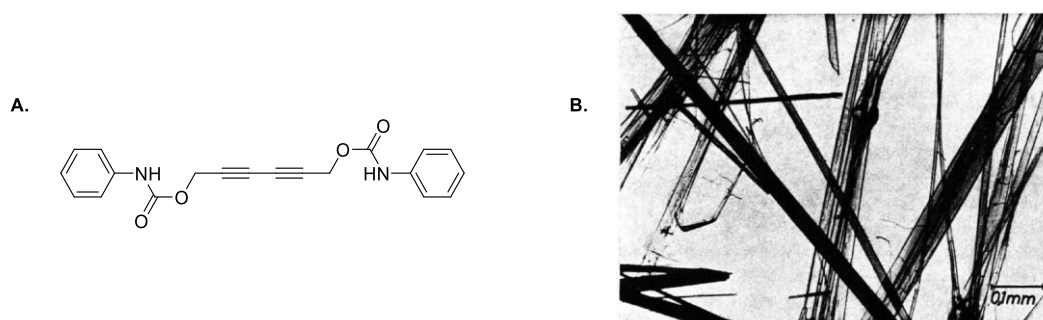


Figure 1. A. Le 2,4-hexadiyne-1,6-diol-bis-phényluréthane utilisé dans l'étude de Wegner en 1969; B. Forme cristalline du 2,4-hexadiyne-1,6-diol-bis-phényluréthane après polymérisation.

¹ G. Wegner. Z. Naturforsch., Teil B, 1969, 24, 824-832.

D'autres études plus récentes ont mis en évidence qu'une irradiation UV de monomères lipidiques diacétyléniques structurés en monocouche, conduisait également à une polymérisation.² Dans certaines conditions de pH ou de température, ces polymères classiquement bleus peuvent évoluer vers un matériau rouge carmin.³ En se basant sur ces propriétés chromophoriques des polymères PDA, Charych et ses collègues ont eu l'idée de concevoir un film de PDA portant des ligands de type acide sialique. Ces derniers sont capables d'interagir sélectivement avec le virus de la grippe, conduisant ainsi à un changement de couleur à la suite de l'interaction.⁴ Les auteurs ont en effet observé une transition de couleur du bleu vers le rouge du film PDA lorsqu'il est mis en contact avec le virus (Figure 2B). Ce changement de couleur est spécifique et n'apparaît que quand l'interaction entre l'acide sialique et le virus a eu lieu. Etant donné que d'autres ligands que l'acide sialique pourraient être incorporés dans le film, ce type d'approche offre la possibilité de développer une méthode générale pour la détection directe des interactions entre des récepteurs et leurs ligands.

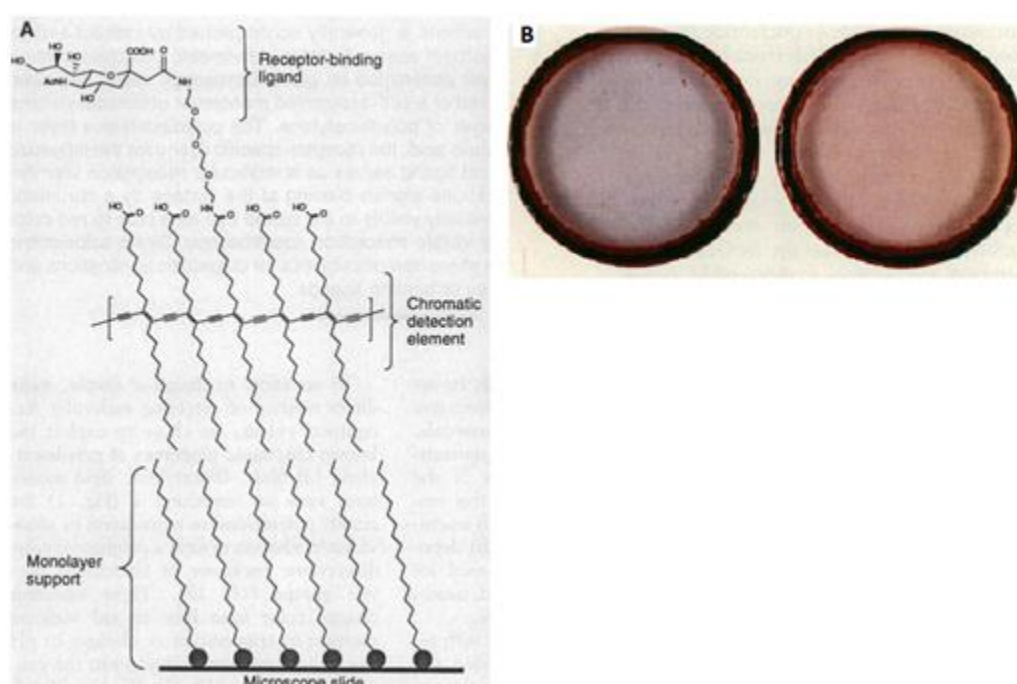


Figure 2. A. Schéma de la formation du film dans l'étude de Charych ; B. Réponse colorimétrique du film en interaction avec le virus. Le film de gauche (bleu) a été exposé à une solution de PBS et le film de droite (rouge) au virus.

Depuis cette étude initiale, les matériaux à base de PDA ont continué à attirer l'attention des scientifiques et une variété de chemo/biosenseurs a été développée. Les amphiphiles diacétyléniques peuvent s'auto-assembler sous différentes formes, ce qui permet d'avoir accès à plusieurs types de matériaux PDA qui sont robustes puisque l'étape de polymérisation permet de renforcer la structure du matériau.

² (a) B. Tieke, H. J. Graf, G. Wegner, B. Naegel, H. Ringsdorf, A. Banerjee, D. Day and J. B. Leto. *Colloid Polym. Sci.*, 1977, 255, 521-531; (b) D. Day and H. J. Ringsdorf. *Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 1978, 16, 205-210.

³ (a) N. Mino, H. Tamura and K. Ogawa. *Langmuir* 1992, 8, 594-598; (b) R. R. Chance, G. N. Patel and J. D. Witt. *J. Chem. Phys.*, 1979, 71, 206; (c) M. Shibata, F. Kaneko, M. Aketagawa and S. Kobayashi. *Thin Solid Films* 1989, 179, 433-437.

⁴ D. Charych, J. Nagy, W. Spevak and M. Bednarski. *Science* 1993, 261, 585-588.

II. Propriétés chromatiques des polydiacétylènes

Les polydiacétylènes sont obtenus par un mécanisme chimique d'addition conjuguée 1,4 entre les motifs diacétyléniques de différents monomères contigus à la suite d'une irradiation UV ou d'une exposition à des rayonnements γ . Pour que cette réaction ait lieu, les monomères doivent être distants deux à deux d'environ 5 Å (Figure 3).⁵ Cette polymérisation, dite « topochimique », est donc favorisée au sein de structures organisées telles que les auto-assemblages d'amphiphiles. Si l'assemblage supramoléculaire des monomères ne remplit pas ce cahier des charges, des réactions parasites sont privilégiées et n'entraînent pas la formation de PDA.⁶

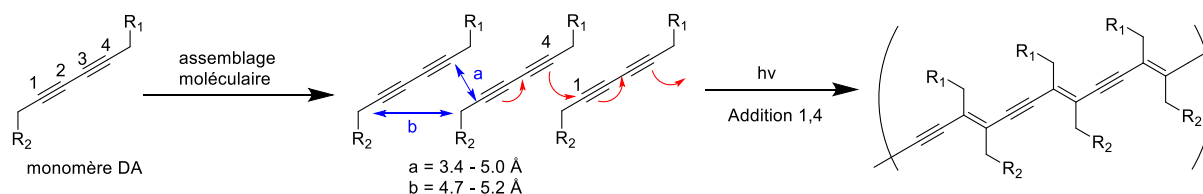


Figure 3. Polymérisation de diacétylènes par addition de 1,4.

Lors de l'irradiation dans l'ultra-violet à 254 nm, la formation du réseau ène-yne hautement conjugué permet une délocalisation forte des électrons π . Les assemblages PDA prennent alors une couleur d'un bleu profond ($Abs_{max} \sim 640$ nm) (Figure 4). L'application d'un stimulus externe au polymère bleu provoque un décalage irréversible de l'absorbance vers de plus hautes énergies, entraînant l'apparition d'un PDA de couleur rouge ($Abs_{max} \sim 540$ nm).⁷ La réponse colorimétrique d'un système PDA face à un stimulus peut donc être quantifiée en mesurant l'intensité relative à ces deux maximums d'absorption.

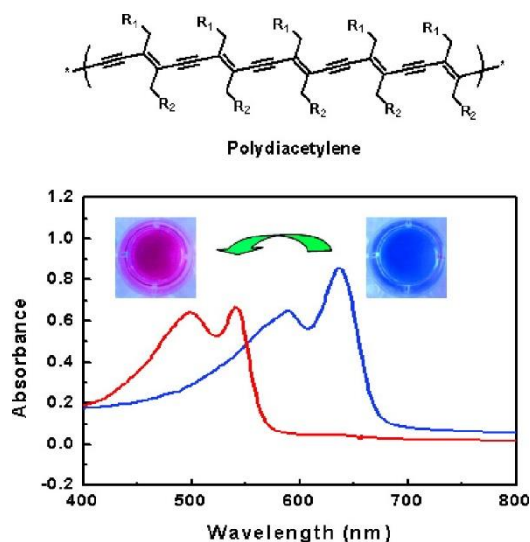


Figure 4. Changement spectral et colorimétrique suite à la stimulation d'une solution de PDA bleu.⁸

Le mécanisme de la transition d'un PDA en phase bleue vers la phase rouge reste à élucider. Il a été suggéré qu'après photopolymérisation, le squelette PDA en phase bleue ne puisse adopter une

⁵ M. D. Mowery, M. Cai, H. Menzel and C. E. Evans. *J. Vac. Sci. Technol.*, A 1999, 17, 2136.

⁶ S. R. Diegelmann and J. D. Tovar. *Macromol. Rapid Commun.*, 2013, 34, 1343-1350.

⁷ J. T. Wen, J. M. Roper and H. Tsutsui. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2018, 57, 9037.

⁸ D. J. Ahn and J. M. Kim. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 805.

configuration totalement détendue en raison des restrictions géométriques. En effet, sous la forme non polymérisée, les groupes latéraux ont un arrangement préféré dicté par les liaisons H ou simplement par l'effet hydrophobe des longues chaînes alkyles. La polymérisation modifie l'hybridation des carbones alcynes de sp en sp^2 et fait donc passer l'angle de liaison de 180° à 120° , mais l'arrangement des chaînes latérales ne permet pas au squelette du polymère de se réorienter et d'alléger les contraintes, entraînant une accumulation de ces dernières dans le matériau au cours du processus de polymérisation.⁹ L'application ultérieure de chaleur, de stress ou d'autres stimuli conduit à des fluctuations ou à des reconfigurations des groupes latéraux et permet au squelette PDA d'adopter une conformation plus détendue. Ceci implique une rotation autour des liaisons C – C, conduisant ainsi à des modifications du spectre d'absorption. Les calculs théoriques indiquent qu'une rotation de quelques degrés seulement autour de cette liaison modifie considérablement le chevauchement des orbitales π , entraînant un décalage significatif vers le bleu du spectre d'absorption.¹⁰

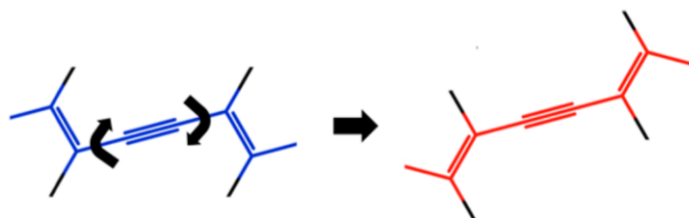


Figure 5. De légères rotations dans le squelette du PDA entraînent la conversion de la phase bleue en phase rouge.

En raison de ces propriétés physiques, les composés diacétyléniques sont devenus incontournables, notamment pour la fabrication de senseurs utilisés pour la détection de molécules chimiques ou biologiques.¹¹

III. Propriétés d'auto-assemblage des amphiphiles DA

Des amphiphiles « monomères » diacétyléniques (DA) sont constitués d'un motif di-yne inséré dans une chaîne carbonée hydrophobe reliée *via* un bras espaceur à une tête polaire. Comme d'autres amphiphiles, ils possèdent des propriétés d'auto-assemblage en solution aqueuse. En effet, des études antérieures ont montré que les amphiphiles DA étaient capables de se structurer sous différentes formes telles que des vésicules,¹² des monocouches de Langmuir¹³ ou encore sous forme de cristaux¹⁴ (Figure 6).

⁹ R. W. Carpick, D. Y. Sasaki, M. S. Marcus, M. A. Eriksson, A. R. Burns. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2004, 16, R679-R697.

¹⁰ (a) B. J. Orchard, S. K. Tripathy. *Macromolecules*, 1986, 19, 1844; (b) H. Eckhardt, D. S. Boudreaux, R. R. Chance. *J. Chem. Phys.*, 1986, 85, 4116; (c) S. H. W. Hankin, M. J. Downey, D. J. Setman. *Polymer*, 1992, 33, 5098.

¹¹ (a) B. Yoon, S. Lee, J.-M. Kim. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1958-1968; (b) R. Jelinek, M. Ritenberg. *RSC Adv.*, 2013, 3, 21192-21201.

¹² S. Okada, S. Peng, W. Spevak, D. Charych. *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 5, 229-239.

¹³ (a) Y. J. Chen, G. M. Carter, S. K. Tripathy. *Solid State Commun.*, 1985, 54, 19-22; (b) P. S. Vincett, G. G. Roberts. *Thin Solid Films*, 1980, 68, 135-171.

¹⁴ J.-S. Filhol, J. Deschamps, S. G. Dutremez, B. Boury, T. Barisien, L. Legret and M. Schott. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 6976-6988.

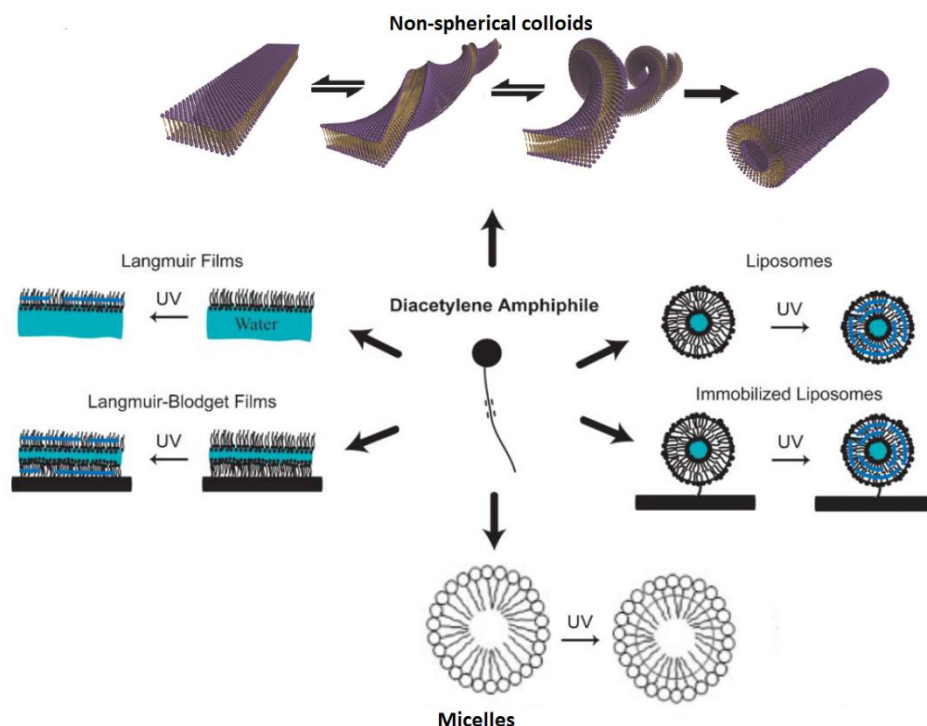


Figure 6. Les amphiphiles diacétyléniques forment une variété de structures auto-assemblées pouvant être photopolymérisées ensuite.

Les forces impliquées dans les auto-assemblages, avant l'étape de polymérisation, résultent d'interactions faibles. Malgré la faiblesse de ces interactions, leur nombre produit un effet global suffisamment fort pour maintenir cohésives les différentes molécules amphiphiles et assurer ainsi leur stabilité en suspension.¹⁵ De plus, la faiblesse de ces interactions rend aussi la structure plus flexible, ce qui permet au système de supporter des perturbations mineures tout en préservant sa capacité à revenir à son état structuré initial. Parmi les forces motrices non covalentes, on retrouve :

- Les liaisons hydrogènes,
- L'effet hydrophobe,
- Les interactions électrostatiques,
- Les forces de van der Waals,

La forme et la taille des auto-assemblages dépendent de plusieurs paramètres tels que la géométrie et la concentration de l'amphiphile, la température, le pH et la force ionique. En contrôlant ces paramètres, différentes architectures peuvent être conçues et il est possible de « prédire » la structure qui sera adoptée.

Un premier paramètre est la balance hydrophile-lipophile (HLB) qui a été introduite pour la première fois par William Griffin en 1949 pour des tensio-actifs non ioniques. Cette échelle empirique permet de chiffrer un « rapport » entre la partie hydrophile et la partie lipophile d'une molécule de tensio-actif. Ce rapport est directement lié à la capacité de solubilisation des amphiphiles dans l'eau.¹⁶ Il est calculée à partir de la formule suivante :

¹⁵ D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra. Adv. Condens. Matter Phys. 2015, 2015, 1-22.

¹⁶ W. C. Griffin. J. Soc. Cosmet. Chem. 1949, 1, 311.

$$HLB = 20 \times \frac{M_h}{M}$$

Où M_h représente la masse molaire de la partie hydrophile et M la masse molaire totale du tensio-actif.

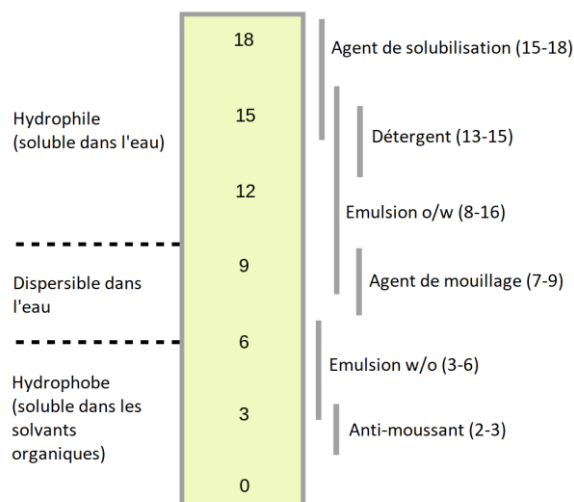


Figure 7. Propriétés des amphiphiles selon leur balance hydrophile-lipophile.

Très facile d'utilisation, cette échelle allant de 0 à 20, permet d'indiquer la solubilité globale du complexe, son affinité par rapport à certains solvants et donc potentiellement la nature des objets formés (Figure 7).¹⁷ Cependant, cet indice est peu adapté à la compréhension de la relation entre la structure chimique des amphiphiles et la structure des auto-assemblages.

La structure des auto-assemblages peut aussi être prédite à partir de ce qu'on appelle le paramètre d'empilement critique (P , *critical packing parameter*).¹⁵ Ce dernier est calculé à partir de la formule suivante :

$$P = \frac{V_o}{A_o \times l_c}$$

Où V_o est le volume occupé par la chaîne hydrophobe, A_o la surface de la tête polaire et l_c la longueur de la chaîne.

En fonction de la valeur de ce paramètre, les amphiphiles s'auto-assemblent en micelles sphériques ($P < 1/3$) ou cylindriques ($1/3 < P < 1/2$), en liposomes ($1/2 < P < 1$), en bicouches planes ($P = 1$) ou en micelles inverses ($P > 1$) (Figure 8).

¹⁷ W. C. Griffin. J. Soc. Cosmet. Chem. 1954, 249-256.

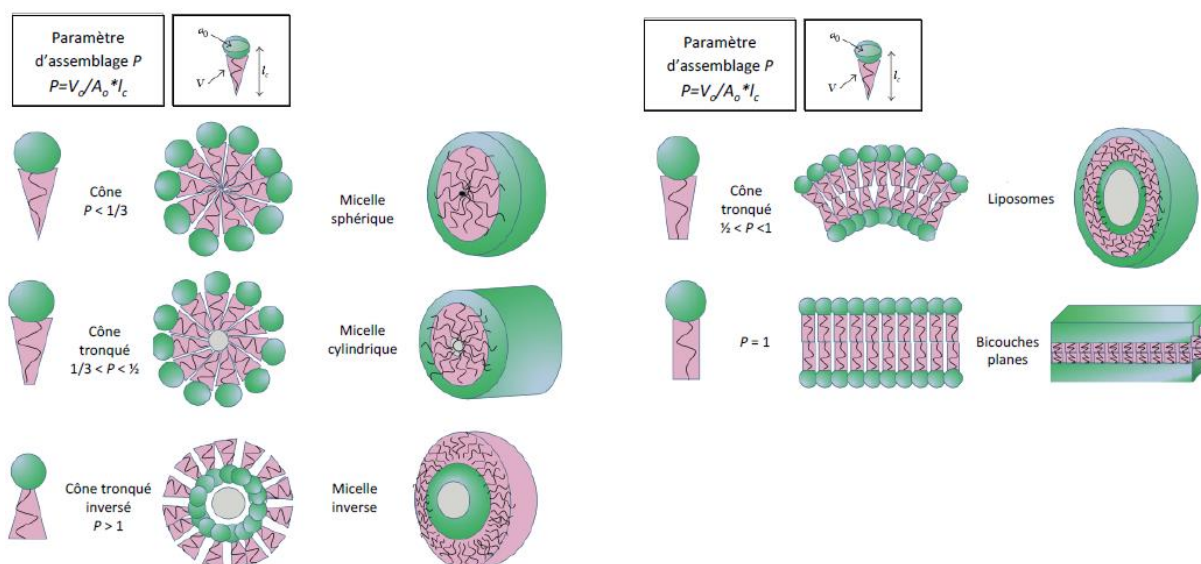


Figure 8. Différentes structures obtenues selon le paramètre d'empilement critique P .

Selon la structure des amphiphiles utilisés, il est donc possible d'avoir accès à de nombreux types d'auto-assemblages différents. Les études sur ces différents objets étant très exhaustives, nous allons détailler uniquement quelques exemples de structures auto-assemblées PDA.

1. Films de Langmuir et Langmuir-Blodgett (LB)

Les films de Langmuir sont formés d'une monocouche de molécules amphiphiles à l'interface air/eau comprimée dans des matrices très compactes (Figure 9).

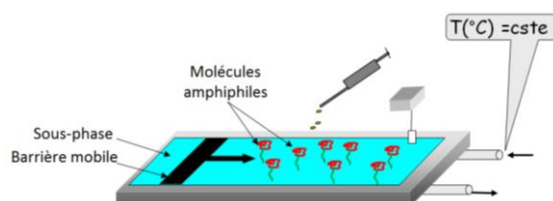


Figure 9. Représentation schématique d'une cuve de Langmuir. A l'aide d'une microseringue, les molécules amphiphiles sont déposées goutte à goutte à la surface de la sous-phase (eau).

Ces films peuvent être étudiés tels que ou transférés sur divers supports solides pour la fabrication de films de type Langmuir-Blodgett (LB) (Figure 10).

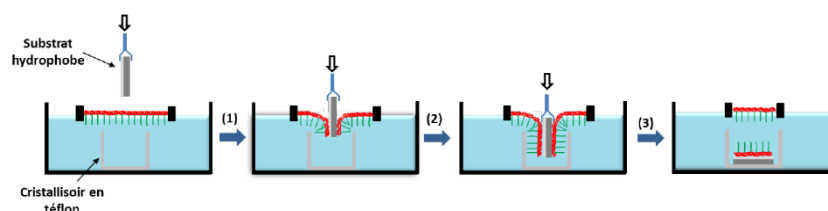


Figure 10. Schéma du transfert de films de Langmuir-Blodgett.

Des films polydiacétyléniques de Langmuir ont été préparés sur l'eau pure, ainsi que sur des solutions contenant des cations mono- ou divalents tels que CdCl_2 car la présence de Cd^{2+} permet d'augmenter

la stabilité du film.¹⁸ Les acides gras diacétyléniques qui sont fréquemment employés pour la fabrication de films prennent une charge négative dans l'eau (pH = 7) et se repoussent. La charge négative inhibe le compactage de la monocouche et la formation de grands domaines ordonnés. Dans ce contexte, les ions Cd^{2+} permettent de diminuer les répulsions électrostatiques des amphiphiles en neutralisant les charges.¹⁹

Les solutions employées contiennent souvent des amphiphiles DA²⁰ seuls ou en mélange avec des phospholipides. Dans ce mélange, l'un des amphiphiles, qui sert à construire le système polydiacétylénique, est présent majoritairement. Les acides gras diacétyléniques, comme l'acide 10,12-pentacosadiyoniq (PCDA), se voient souvent attribuer ce rôle. Un ligand peut être utilisé pour fonctionnaliser la surface du film. Des phospholipides peuvent également être ajoutés afin d'augmenter le caractère biomimétique du film ou augmenter la réponse chromatique du système PDA.²¹ À titre d'exemple, dans une étude de Leblanc, la monocouche a été fabriquée à partir d'un mélange de 10,12-PCDA et un dérivé de mannose PDTM (Figure 11) à l'interface air/eau.²² Les auteurs ont voulu étudier l'impact de la présence du sucre sur le comportement chromatique de la monocouche de polydiacétylène. En utilisant la spectroscopie d'absorption, les auteurs ont étudié la polymérisation de différents mélanges de PDTM et PCDA en fonction du temps. Il a été montré que l'augmentation de la quantité de PDTM peut perturber l'auto-assemblage de la matrice PDA, réduisant ainsi la stabilité du film et empêchant la polymérisation. En fait, aucune polymérisation n'a été observée avec plus de 60 % de PDTM.

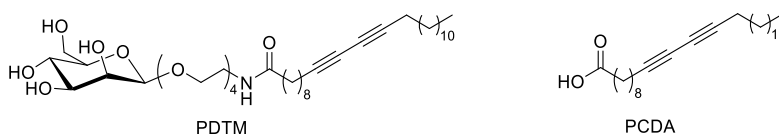


Figure 11. Les amphiphiles DA employés pour la fabrication des films de Langmuir dans l'étude de Leblanc *et al.*

Un des inconvénients des films est leur préparation relativement compliquée qui nécessite souvent une automatisation sophistiquée. Il est aussi difficile de créer des films de grande surface possédant une qualité constante.

2. Liposomes/vésicules

Les travaux concernant la formation et la polymérisation de liposomes (ou vésicules) de diacétylènes ont été initiés quelques années après les travaux sur les films de Langmuir.²³ Les mots liposomes et vésicules ont été utilisés de manière interchangeable pour désigner des particules sphériques composées de bicouches ; pour plus de simplicité, nous les appellerons liposomes ci-après. Une procédure générale pour la préparation de liposomes PDA implique la dissolution préalable des

¹⁸ B. Tiede and G. Lieser. *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, 88, 471-486.

¹⁹ (a) R. Viswanathan, J. A. Zasadzinski, D. K. Schwartz. *Science* 1993, 261, 449; (b) J. A. Zasadzinski, R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnæs, D. K. Schwartz. *Science* 1994, 263, 1726.

²⁰ (a) T. E. Wilson and M. D. Bednarski. *Langmuir*, 1992, 8, 2361-2364; (b) A. A. Deckert, J. C. Horne, B. Valentine, L. Kiernan, L. Fallon. *Langmuir*, 1995, 11, 643-649.

²¹ Y. Scindia, L. Silbert, R. Volinsky, S. Kolusheva, R. Jelinek. *Langmuir*, 2007, 23, 4682-4687.

²² S. Wang, J. Ramirez, Y. Chen, P. G. Wang, R. M. Leblanc. *Langmuir*, 1999, 15, 5623-5629.

²³ D. Day, H.-H. Hub, H. Ringsdorf. *Isr. J. Chem.*, 1979, 18, 325-329.

monomères DA, ainsi que de tout autre constituant lipidique désiré, dans du chloroforme afin de créer une distribution uniforme des monomères. Il est possible d'incorporer des lipides non polymérisables dans des liposomes de diacétylène afin de leur conférer un caractère biocompatible. Si aucun additif n'est souhaité ou si un seul type de monomère DA est utilisé, cette étape peut être omise. Le chloroforme est ensuite évaporé. Le mélange résultant est remis en suspension dans de l'eau ou dans un tampon aqueux et dispersé par sonication à une température supérieure à la température de transition de phase des DA. La solution résultante est généralement filtrée à travers une membrane poreuse pour éliminer les agrégats. Pour favoriser la stabilité des liposomes et l'alignement du squelette DA, la suspension colloïdale est conservée à 4 °C pendant au moins 4 h. La solution transparente est ensuite irradiée sous une lumière UV à 254 nm, ce qui entraîne l'apparition d'une coloration bleue témoignant de la formation du polymère PDA.

Les liposomes sont souvent utilisés dans des plateformes de détection. À titre d'exemple, un amphiphile DA conjugué avec de l'acide L-glutamique a été conçu par le groupe de Liu.²⁴ Cet amphiphile a été auto-assemblé en liposomes et irradié sous UV conduisant à des structures de couleur bleue. Ces liposomes ont montré des propriétés de reconnaissance sélective d'un des énantiomères du *tert*-butylsulfinamide (TBSA) en induisant une coloration rouge en présence de l'énantiomère *S* (Figure 12). La transition de couleur est attribuée à la formation de liaisons hydrogènes entre l'acide L-glutamique et le TBSA, ce qui entraîne une distorsion du squelette PDA et un changement de couleur.

Pourquoi le *S*-TBSA déclenche-t-il ce mécanisme alors que l'énantiomère *R* n'a pas d'effet ? Quelques hypothèses ont été émises par les auteurs mais l'origine exacte du phénomène reste encore floue. Une chose est sûre, en revanche ; la chiralité créée dans la structure d'auto-assemblage grâce à la présence de l'acide L-glutamique est importante pour la reconnaissance chirale. En effet, dans une expérience contrôle, les liposomes préparés à partir de la polymérisation d'amphiphiles contenant l'acide D-glutamique sont sensibles au *R*-TBSA et non plus au *S*-TBSA.

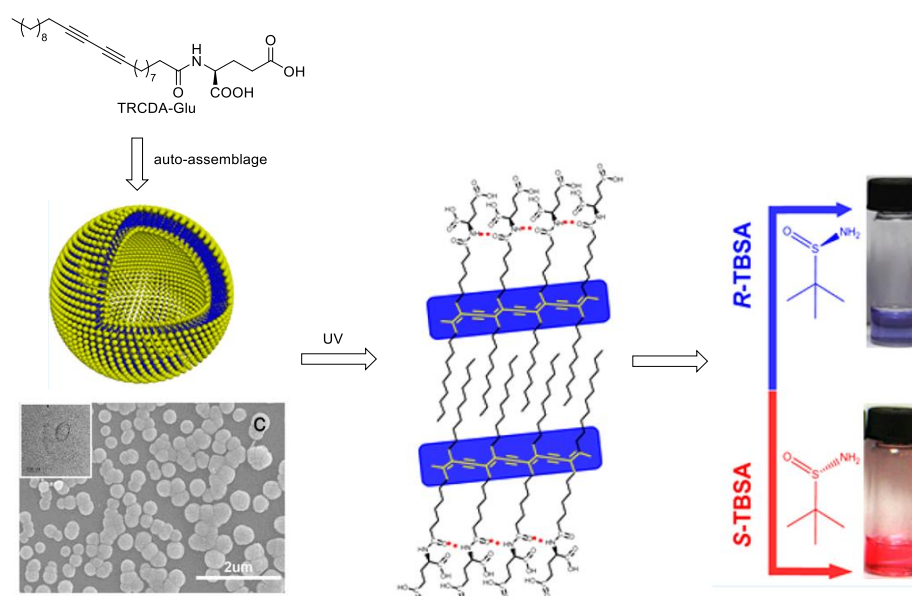


Figure 12. La formation des PDA-Glu liposomes et la reconnaissance énantiomérique de TBSA.

²⁴ S. Li, L. Zhang, J. Jiang, Y. Meng, M. Liu. ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 37386-37394.

La facilité de préparation et la nature biomimétique des liposomes PDA en ont fait une plateforme populaire. Cependant, un des inconvénients des liposomes est qu'ils peuvent se dégrader et précipiter en solution. Afin de remédier à ce problème, les liposomes ont été immobilisés dans une matrice hôte.

Un exemple est le travail réalisé par l'équipe de Jelinek. Les auteurs ont étudié l'immobilisation de liposomes PDA dans de l'agarose pour la détection bactérienne.²⁵ Des liposomes sont formés à partir d'une solution à 60 % d'acide 10,12-tricosadiynoïque (TRCDA) et 40 % de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC). Le TRCDA permet de construire le système PDA bleu après photopolymérisation dans le liposome. Le DMPC, quant à lui, apporte un caractère biomimétique à la bicouche. Afin de développer une méthode de détection générique, le liposome n'a pas été fonctionnalisé avec un ligand spécifique. En effet, la réponse chromatique est induite et peut être observée à l'œil nu lors de l'interaction d'assemblages PDA avec des substances actives produites par des bactéries pendant leur prolifération (Figure 13).

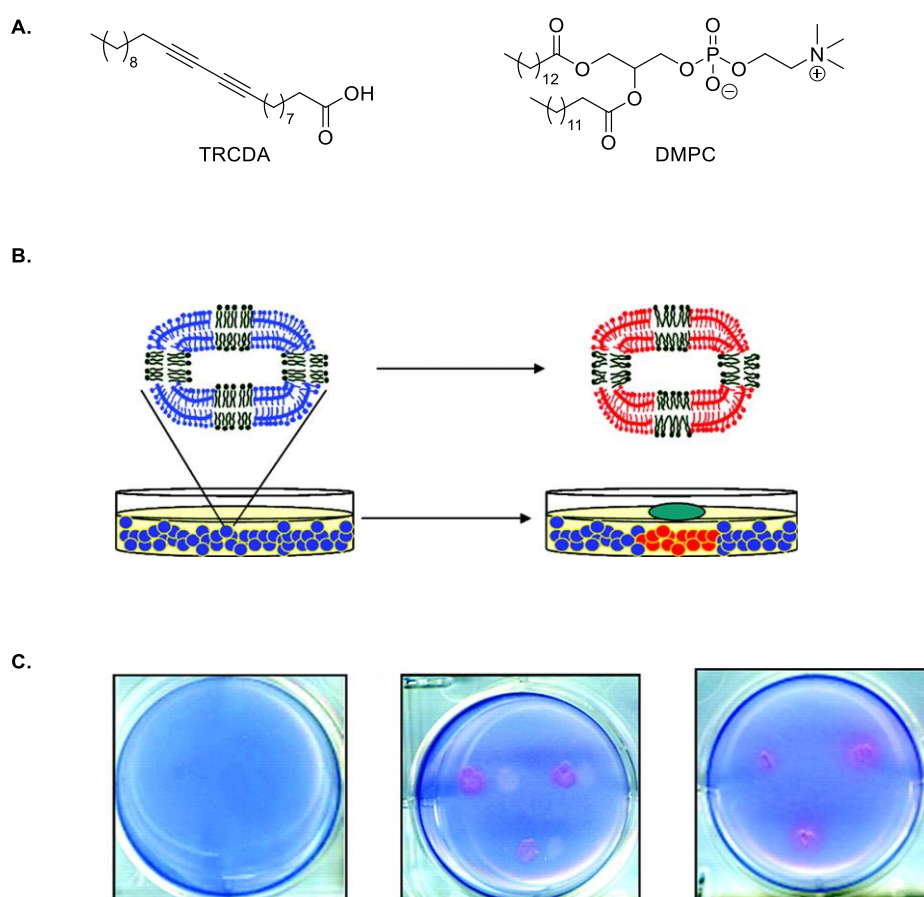


Figure 13. **A.** Structure de TRCDA et DMPC utilisée pour former les liposomes ; **B.** Concept du détecteur : la prolifération bactérienne (ovale verte) à la surface de l'agarose produit des composés qui peuvent provoquer la transition bleu-rouge des liposomes immobilisés ; **C.** De gauche à droite : plaques de l'agarose contenant des liposomes DMPC-PDA avant la croissance bactérienne, 18 heures après le transfert de trois colonies de *Bacillus cereus* et 18 heures après le transfert de trois colonies de *E. coli*.

La généralité de ce concept de détection et la non-spécificité de la plateforme chromatique peuvent en fait constituer des avantages pour les applications dans lesquelles il est nécessaire de signaler la

²⁵ L. Silbert, I. Ben Shlush, E. Israel, A. Porgador, S. Kolusheva, R. Jelinek. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72, 7339-7344.

présence de tout type de bactérie, par exemple la surveillance des environnements stériles, l'évaluation de la fraîcheur des aliments et le criblage aux nouveaux composés antibiotiques.

3. Colloïdes non sphériques

Un certain nombre de lipides diacétyléniques peuvent s'auto-assembler en diverses structures en bicouches non sphériques telles que des tubules,²⁶ des hélices, des rubans et des feuilletts.²⁷ Un des modèles théoriques les plus couramment admis pour expliquer la formation des nanotubules débute par l'auto-assemblage des composés amphiphiles en bicouche, sous forme de ruban. Puis dans une deuxième étape, ce ruban subit une torsion qui induit l'enroulement de la structure sous forme d'hélice. Lorsque cet enroulement se poursuit, l'hélice se referme sur elle-même engendrant ainsi la création des nanotubules (Figure 14).²⁸

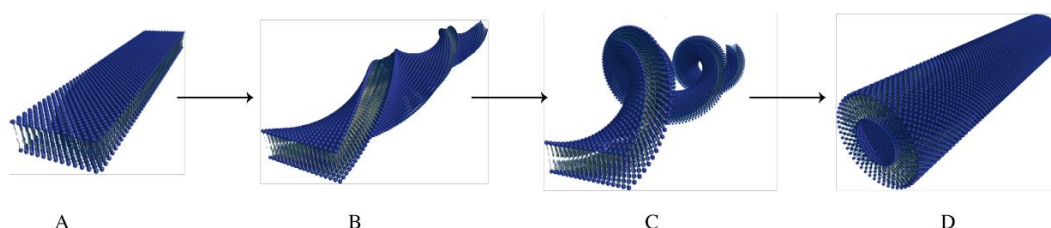


Figure 14. Formation d'un nanotubule. A : ruban plan, B : ruban torsadé, C : hélice, D : nanotubule.

Les premiers travaux sur les tubules lipidiques de diacétylène ont été réalisés sur des phosphocholines diacétyléniques chirales telles que la *bis*-(10,12-TRCDA)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine **1** (Figure 15).^{26a} D'autres travaux ultérieurs ont également impliqué des amphiphiles chiraux pour former le même type d'auto-assemblages,²⁹ car les auteurs ont cru pendant longtemps que la présence d'un motif chiral était une condition indispensable pour former des hélices.

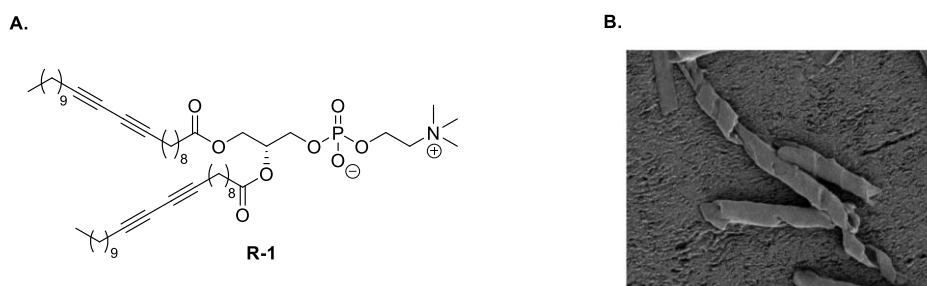


Figure 15. A. Structure de l'énantiomère R de l'amphiphile **1** utilisé pour la formation des tubules ; B. Image SEM des nanotubules formés à partir de R-1.

²⁶ (a) J. M. Schnur, R. Price, P. Schoen, P. Yager, J. M. Calvert, J. Georger, A. Singh. *Thin Solid Films*, 1987, 152, 181-206; (b) A. L. Plant, D. M. Benson, G. L. Trusty. *Biophys. J.*, 1990, 57, 925-933.

²⁷ (a) D. A. Frankel, D. F. O'Brien. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 10057-10069; (b) G. Wang, R. I. Hollingsworth. *Adv. Mater.*, 2000, 12, 871-874; (c) Q. Cheng, M. Yamamoto, R. C. Stevens. *Langmuir*, 2000, 16, 5333-5342.

²⁸ Y. Zhou, T. Shimizu. *Chem. Mater.*, 2008, 20, 625-633.

²⁹ (a) J. Song, Q. Cheng, S. Kopta, R. C. Stevens. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3205-3213; (b) J. Song, Q. Cheng, R. C. Stevens. *Chem. Phys. Lipids*, 2002, 2002, 203-214; (c) J. Song, J. S. Cisar, C. R. Bertozzi. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 8459-8465.

Cependant, par la suite, un isomère achiral de **1** (molécule **2**, Figure 16A) a été préparée et utilisée pour démontrer que la chiralité moléculaire n'était pas nécessaire pour la génération de tubules.³⁰ Les molécules **2** forment des tubules hélicoïdaux, sous la forme d'un mélange racémique de tubules gauches et droits (Figure 16B).

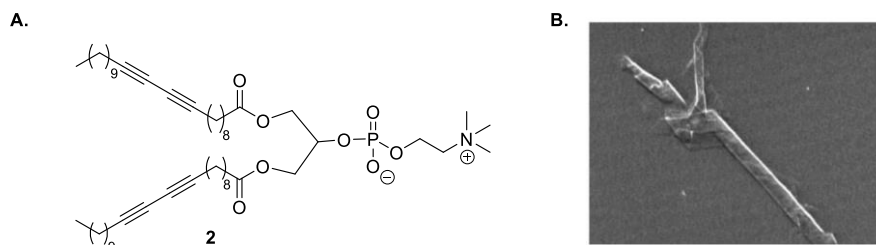


Figure 16. A. Structure de l'amphiphile **2** ; B. Image SEM des nanotubules formés à partir de **2**.

Plus récemment, des tubules ont été formés à partir du sel (bromhydrate) d'un motif diacétylène comportant une amine terminale achirale **3** (Figure 17A) dans l'eau.³¹ Ces tubules ont été observés comme étant monodisperses et présentant un signal non nul en dichroïsme circulaire, indiquant une chiralité de l'assemblage malgré l'absence de chiralité dans le monomère. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les deux protons de la tête ammonium ne sont pas équivalents et qu'un seul est en interaction avec l'ion bromure. Cette interaction créerait un centre chiral au niveau de la tête polaire de l'amphiphile. Une autre hypothèse serait que les deux protons interagissent avec le bromure pour former une structure cyclique qui bloque l'azote dans une configuration chirale. Ces hypothèses n'ont jamais été vérifiées et la nature précise de la chiralité autour de l'atome d'azote n'est donc toujours pas connue.

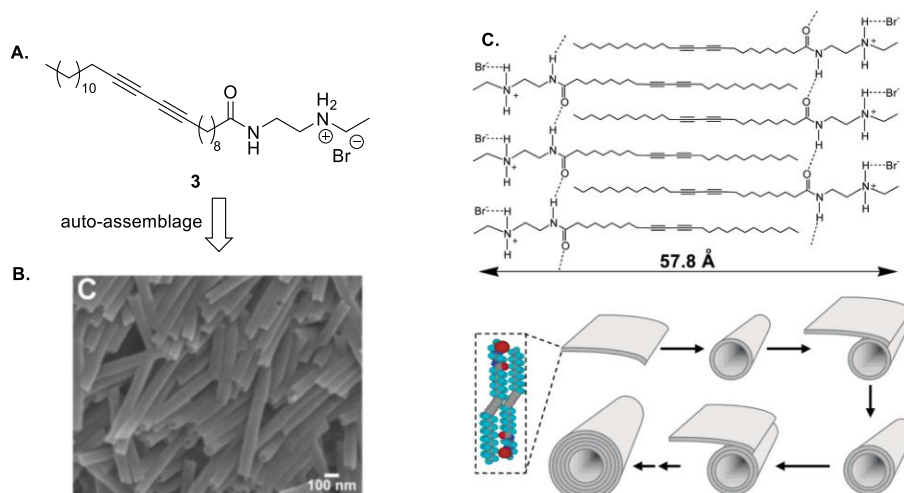


Figure 17. A. Structure de l'amphiphile **3** ; B. Image SEM des nanotubules formés à partir de **3** ; C. Schéma d'une bicouche et son assemblage en nanotube.

Différentes approches théoriques ne faisant pas intervenir de chiralité ont également été proposées pour expliquer l'enroulement à l'origine de la formation des nanotubules.³² Ces modèles, basés par exemple sur des interactions électrostatiques ou la courbure spontanée du ruban, présentent encore

³⁰ S. Pakhomov, R. P. Hammer, B. K. Mishra, B. N. Thomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 3040-3042.

³¹ S. B. Lee, R. Koepsel, D. B. Stolz, H. E. Warriner, A. J. Russell. J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 13400-13405.

³² J. V. Selinger, M. S. Spector, J. M. Schnur. J. Phys. Chem. B, 2001, 105, 7157-7169.

de nombreuses inconnues pour pouvoir être généralisés. Le mécanisme de formation des nanotubules reste ainsi encore aujourd'hui un phénomène mal compris.

4. Micelle PDA

Une des thématiques développées par notre laboratoire est la conception et la synthèse de nouveaux systèmes de vectorisation de molécules actives. Parmi les différentes familles de nanovecteurs disponibles dans la littérature, le laboratoire s'est spécialisé dans les systèmes micellaires qui sont des auto-assemblages sphériques d'amphiphiles.

Ainsi, les micelles PDA-NTA ont été développées au laboratoire en 2007. Elles sont constituées d'unités amphiphiles DA-NTA qui incorporent un groupement diacétylénique (DA) dans la chaîne lipophile et une tête polaire nitrilo-triacétique (NTA). Par la suite, des micelles polydiacétyléniques formulées à partir d'amphiphiles présentant une partie hydrophile PEG de taille variable ont été synthétisées dans notre laboratoire afin de comparer leur comportement *in vivo* avec celui des micelles PDA-NTA. Deux PEG de tailles différentes, un PEG₃₅₀ et un PEG₂₀₀₀, ont été incorporés à la structure des amphiphiles (Figure 18).^{33,34}

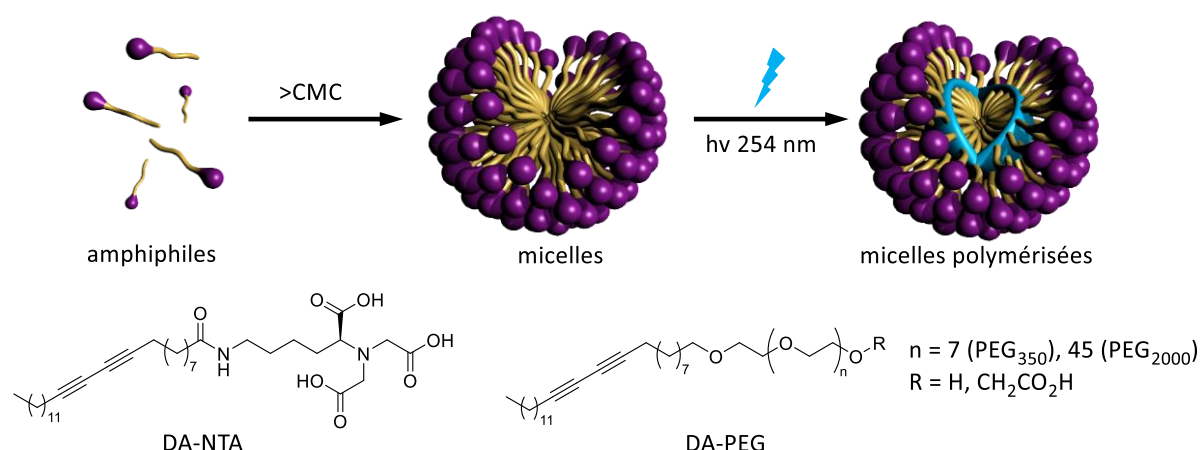


Figure 18. Formulation des micelles PDA-NTA et PDA-PEG.

À l'issue de l'assemblage des micelles en solution aqueuse, les entités diacétyléniques sont polymérisées par irradiation sous lumière UV à 254 nm. Cette étape de photopolymérisation permet de stabiliser la structure des micelles notamment lorsqu'elles sont diluées (par exemple dans la circulation sanguine) à une concentration inférieure à la CMC (*cf* chapitre I, partie IV et chapitre II, partie II).³⁵

Après la photopolymérisation, les micelles prennent une couleur jaune, caractéristique d'une nouvelle région d'absorption située autour de 350–400 nm. La couleur bleue habituelle des liposomes polymérisés ou d'autres nanostructures n'est pas observée dans le cas des micelles. Cela s'explique

³³ J. Ogier, T. Arnauld, G. Carrot, A. Lhumeau, J.-M. Delbos, C. Boursier, O. Loreau, F. Lefoulon, E. Doris, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 3902-3907.

³⁴ N. Mackiewicz, E. Gravel, A. Garofalakis, J. Ogier, J. John, D. M. Dupont, K. Gombert, B. Tavitian, E. Doris, F. Ducongé, *Small* 2011, 7 (19), 2786-2792.

³⁵ A. Perino, A. Klymchenko, A. Morere, E. Contal, A. Rameau, J.-M. Guenet, Y. Mely, A. Wagner, *Macromol. Chem. Phys.* 2011, 212, 111-117.

par une délocalisation moins efficace des électrons π dans les micelles que dans les liposomes. En effet, plus la conjugaison dans le polymère est forte, plus des niveaux d'énergie des orbitales moléculaires HOMO (orbitale moléculaire la plus haute occupée) et LUMO (orbitale moléculaire la plus basse vacante) seront proches. C'est-à-dire que pour passer d'une orbitale à l'autre, moins d'énergie sera nécessaire. Or, d'après la relation de Planck ($E = h/\lambda$), l'énergie associée à une transition est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de cette transition. En conséquence, plus l'énergie de la transition est faible, plus la longueur d'onde d'absorption est grande : c'est l'effet bathochrome.³⁶ Étant donné que la polymérisation se produit à l'intérieur des particules, ces observations peuvent s'expliquer par la petite taille des micelles (< 10 nm) qui limite le nombre d'unimères par objet et impose un arrangement lipidique non parallèle et donc des contraintes géométriques plus fortes que d'autres arrangements lipidiques (vésicules, bicouches) pour la polymérisation. Par conséquent, la conjugaison dans les micelles polymérisées est plus faible que dans les structures en bicouche.

IV. Accroissement des propriétés physiques à l'aide de la polymérisation

Contrairement à la plupart des polymères covalents qui sont synthétisés par des réactions chimiques à haute température, la polymérisation des diacétylènes ne nécessite pas d'initiateurs chimiques, de catalyseurs ou de chauffage, ce qui simplifie sa mise en œuvre. De plus, aucun sous-produit n'est formé au cours de la polymérisation, ce qui garantit la « pureté » du polymère obtenu.

La polymérisation des diacétylènes permet également d'accroître les propriétés physiques de leur auto-assemblage. Cette propriété a été démontrée tout d'abord dans une étude de Sheth et Leckband sur des films Langmuir-Blodgett de PDA.³⁷ Ces films ont été formulés à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque (PCDA). En utilisant des appareils de mesure de force de surface, les auteurs ont étudié l'impact de la polymérisation sur les propriétés interfaciales du film. Ces mesures ont démontré directement que la polymérisation permet de réduire la nature dynamique de la bicouche et d'éviter les modifications conséquentes sur les propriétés interfaciales. De plus, le film polymérisé est stable même après avoir été soumis de façon répétée à des compressions importantes pendant plusieurs heures. Cela indique une augmentation nette de la stabilité physique du film polymérisé.

Par la suite, le groupe de Charych¹² a utilisé l'amphiphile DA 4 et un amphiphile DA 5 conjugué à l'acide sialique pour former des vésicules qui ont été polymérisées en vue d'une utilisation en biodétection. En TEM, ces vésicules sont elliptiques avec une distribution de taille globalement uniforme (Figure 19). La polymérisation permet de préserver l'intégrité des particules. Les vésicules sont plus stables lorsqu'elles sont polymérisées et peuvent se conserver sur plusieurs années sans montrer de signe de fusion ou d'agrégation.

³⁶ T. Michinobu, H. Osako, K. Shigehara. *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 111.

³⁷ S. R. Sheth and D. E. Leckband. *Langmuir* 1997, 13, 5652-5662.

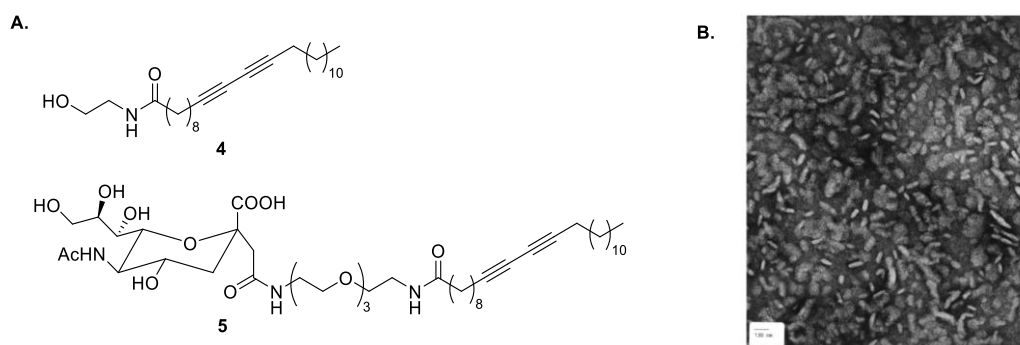


Figure 19. A. Amphiphiles utilisés pour la fabrication des vésicules dans l'étude de Charych ; B. Image TEM des vésicules formées.

Utilisant cette propriété stabilisante de la polymérisation, le laboratoire a mis au point un protocole de fabrication des micelles polymérisées PDA-NTA (Figure 18). Ces micelles sont formulées à partir de l'auto-assemblage des amphiphiles DA-NTA dans l'eau suivi d'une irradiation sous UV. Afin d'étudier l'effet de la photopolymérisation sur la structure et la stabilité de ces micelles polydiacétyléniques, l'équipe de Wagner a utilisé un ensemble de techniques complémentaires : DLS, microscopie électronique à transmission (TEM) et spectroscopie UV-Visible. La concentration micellaire critique (CMC) de la micelle et l'aptitude des micelles PDA à encapsuler des molécules organiques hydrophobes ont également été évaluées.³⁵

D'après cette étude, avant et après la polymérisation, la taille et la morphologie des micelles étudiées à l'aide de DLS et de TEM étaient assez similaires (Figure 20). Les objets sphériques de taille inférieure à 10 nm ont été observés dans les deux cas. La polymérisation n'affecte donc pas l'intégrité des micelles.

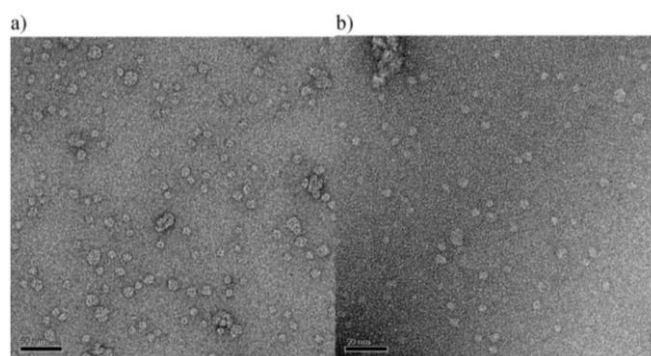


Figure 20. Image TEM de (a) micelles non polymérisées et (b) micelles polymérisées.

La formation du réseau ène-yne au sein des micelles a été aussi confirmée en spectroscopie UV-Visible. En effet, du fait de la formation des systèmes conjugués, l'absorbance de la solution micellaire a augmenté entre 250 et 400 nm au cours du temps (Figure 21).

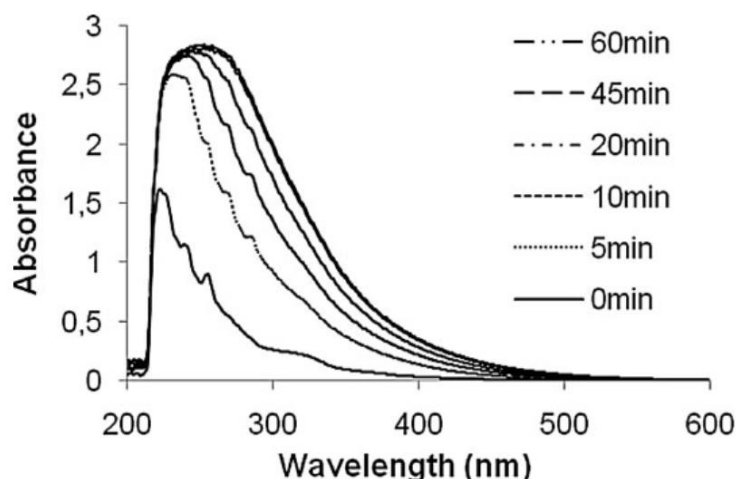


Figure 21. Spectre d'absorption de micelles PDA-NTA à différents temps de photopolymérisation.

Ensuite, pour comparer la stabilité physique des deux types de micelles, l'équipe a mesuré la concentration micellaire critique (CMC) des micelles non polymérisées et polymérisées. Les micelles polymérisées possèdent une CMC 15 fois plus faible que les micelles non polymérisées. C'est-à-dire que les micelles sont nettement plus stables à la dilution une fois polymérisées. De plus, ces micelles sont capables d'encapsuler des composés hydrophobes, ce qui est intéressant pour des applications liées à la délivrance de principes actifs.

V. Conclusion et objectifs de la thèse

À travers cette introduction générale, nous avons mis en évidence l'intérêt d'utiliser le système polydiacétylénique pour construire et renforcer différentes structures auto-assemblées. Avec ce projet de thèse, nous souhaitons développer des nanomatériaux à base de PDA pour des applications biomédicales et en catalyse. Il existe de nombreuses formes auto-assemblées de PDA mais nous nous sommes concentrés sur la production de micelles sphériques et de rubans. En effet, ces objets présentent de nombreuses propriétés intéressantes telles que leur taille, leur capacité d'encapsulation ou encore la possibilité de les fonctionnaliser.

En nous appuyant sur les travaux précédemment réalisés au laboratoire, nous avons souhaité développer des vecteurs nanométriques micellaires obtenus à partir d'auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques qui soient capables de faciliter la transfection d'un ARN interférent (siARN) *in vitro*. Un premier objectif de la thèse a consisté à synthétiser une gamme de molécules amphiphiles comportant une région hydrophobe identique, mais des têtes polaires différentes afin d'étudier l'impact du motif complexant des ARN sur la performance des micelles en transfection. Après une courte introduction sur le principe et l'utilisation des siARN en thérapie, les résultats concernant ces travaux seront décrits dans le chapitre II.

Dans le chapitre III, des micelles à activité catalytique ont été développées pour réaliser des transformations chimiques dans le vivant. Des nanoparticules de cuivre ont ainsi été encapsulées dans des micelles de PDA afin de les rendre biocompatibles. Les hybrides cuivre-micelle ont été utilisés *in vitro* dans la catalyse de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

Enfin, dans le chapitre IV, un amphiphile diacétylénique comportant une tête polaire proline a été synthétisé et assemblé sous forme de micelle ou de ruban torsadé. Ces structures ont été étudiées pour l'organocatalyse de différentes transformations chimiques énantiosélectives, dont la réaction d'aldolisation asymétrique dans l'eau. L'utilisation du système nanoruban pour d'autres réactions comme la réaction de Mannich et de Michael sera également présentée. Finalement, le développement d'un nouvel amphiphile qui est capable de d'auto-assembler en nanobâtonnets et son activité catalytique pour la réaction d'aldolisation dans l'eau sera décrit.

CHAPITRE II : MICELLES POLYDIACÉTYLÉNIQUES POUR LA TRANSFECTION D'ARN INTERFÉRENT

L'interférence médiée par l'ARN est un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel, capable de réguler l'expression de gènes. Ce mécanisme peut être endogène et activé par l'intermédiaire d'ARN interférents intra-cellulaires, mais il peut également être activé par la transfection de fragments d'ARN exogènes synthétiques, les siARN. Cependant, pour déclencher le mécanisme de régulation, il est nécessaire de délivrer ces siARN exogènes dans le compartiment intra-cytoplasmique. À l'heure actuelle, bien qu'il existe de nombreuses méthodes de transfection, cette étape de délivrance intracellulaire demeure une des limitations rencontrées dans l'utilisation des siARN.

I. La délivrance de siARN

1. La découverte des ARN interférents

En 1990, Napoli et Jorgensen ont été les premiers à décrire le phénomène d'interférence par des ARN (ARNi).³⁸ Le but initial de leur expérience était de mettre en évidence l'implication de la chalcone synthase (CHS) dans la biosynthèse des pigments de la fleur de pétunia (*Petunia hybrida*). Afin d'apporter une coloration violette à la fleur, Napoli et Jorgensen ont introduit par transgénèse une copie modifiée du gène codant pour cette enzyme pour la surexprimer. De manière surprenante, au lieu d'apporter une coloration plus intense comme escompté, certaines fleurs présentaient des pétales blancs. Après avoir analysé ces expériences, Napoli et Jorgensen ont associé ce phénomène à une diminution des ARN messagers codant pour la CHS. Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une inhibition des gènes de la CHS avait été induite par l'introduction du transgène.

En 1998, Fire et Mello ont publié un article expliquant le mécanisme d'interférence par ARN.³⁹ Ces travaux ont été récompensés en 2006 par le prix Nobel de physiologie ou médecine. En travaillant sur les nématodes *C. elegans*, ils ont testé l'hypothèse que l'élément déclencheur de l'inactivation du gène n'était pas un ARN simple brin mais double brin. Une étude visant à inhiber un gène codant pour une protéine des myofilaments a été réalisée. Des tests conduits avec des ARN simples brins, même à fortes concentrations, ne présentaient qu'une faible inhibition. En revanche, les ARN doubles brins ont provoqué une inhibition du gène cible deux fois plus efficace et à plus faibles concentrations.

2. Mécanisme d'interférence par ARN

Dans un souci de clarté, nous allons décrire plus spécifiquement le mécanisme faisant intervenir les siARN (small interfering ARN). Les siARN se présentent généralement sous la forme de doubles brins d'ARN de 19 à 23 paires de base avec deux nucléotides non appariés aux extrémités 3'. Ils peuvent être endogènes ou synthétiques. Les siARN endogènes sont formés par la rupture de longs double-brins d'ARN (dsARN) présents dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la protéine « Dicer ». Cette protéine est une endonucléase de type RNase III qui a été découverte par l'équipe de Bernstein en 2001.⁴⁰ Les siARN synthétiques, une fois délivrés dans le compartiment cytoplasmique, sont également pris en charge par l'endonucléase « Dicer ». La protéine « Dicer » liée au siARN, s'associe alors à d'autres

³⁸ C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen. *The Plant Cell*. 2, 279-289 (1990).

³⁹ A. Fire et al. *Nature* 391, 806-811 (1998).

⁴⁰ E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. *Nature*, 409, 363-366 (2001).

protéines cytoplasmiques afin de former le précurseur du complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*).

Ensuite, le duplex siARN est dissocié en un brin guide (ou brin antisens) et en un brin passager (ou brin sens). Ce dernier est dégradé par l'action de nucléases cytoplasmiques. Cette étape sert à activer le complexe enzymatique RISC qui permet l'appariement du brin antisens à l'ARN messager (ARNm) ciblé. Cet appariement va induire le clivage du brin ARNm par une endonucléase,⁴¹ et les fragments résultants de cette coupure se dissocient de RISC et sont dégradés par des exonucléases non spécifiques. Le complexe enzymatique RISC peut alors être guidé par le brin antisens sur un autre ARNm afin de poursuivre son action inhibitrice (Figure 22).

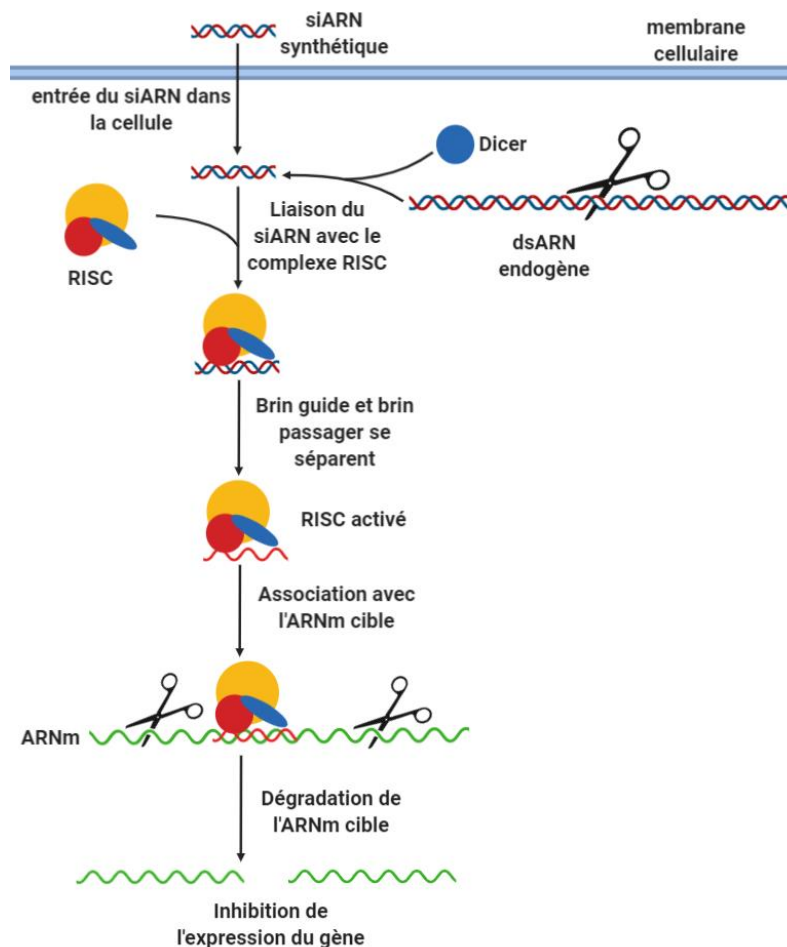


Figure 22. Mécanisme d'action des siARN.

3. Contraintes associées à la transfection des siARN

Depuis sa découverte, l'interférence médiée par les ARN est devenue un atout dans l'arsenal thérapeutique et offre des perspectives pharmaceutiques prometteuses. Cependant, la transfection de séquences d'acides nucléiques dans le compartiment cytoplasmique peut être confrontée à plusieurs limitations.

⁴¹ S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon. Nature 404, 293-296 (2000).

Tout d'abord, les siARN restent très sensibles aux nucléases dans les milieux extracellulaires, notamment dans le sang. Malgré une conformation en duplex plus résistante que les simples brins, la demi-vie rapportée pour les siARN non modifiés dans le sérum varie de quelques minutes à environ une heure.⁴² De plus, à l'issue de leur administration systémique, les siARN sont excrétés très rapidement (quelques minutes) dans les urines en raison de leur faible taille. Une autre limite concerne l'absence de système d'adressage, qui conduit souvent à une distribution aspécifique des siARN. Par conséquent, la concentration locale en siARN devient trop faible pour entraîner un effet au niveau des tissus et cellules où l'induction du mécanisme d'interférence est souhaitée. Enfin, ayant un caractère polyanionique avec des groupements phosphates PO_4^- , les siARN sont bloqués par la surface de la membrane plasmique qui est également chargée négativement. Ainsi, la diffusion des siARN au travers des membranes plasmiques est limitée.

Afin de pallier ces problèmes, il est possible de modifier chimiquement la structure des siARN afin de les rendre plus résistants en essayant de ne pas altérer leur efficacité ou encore d'avoir recours à des vecteurs qui les protègent de la dégradation tout en masquant leurs charges négatives.

4. Les outils disponibles pour la transfection de siARN

a. Modification chimique des siARN

Des modifications chimiques ont été réalisées sur les molécules de siARN pour améliorer leur résistance aux nucléases et/ou éviter une activation du système immunitaire sans affecter l'efficacité de l'interférence. Ces changements dans la structure des siARN peuvent s'effectuer au niveau du groupement phosphate ou du ribose des nucléotides (Figure 23).

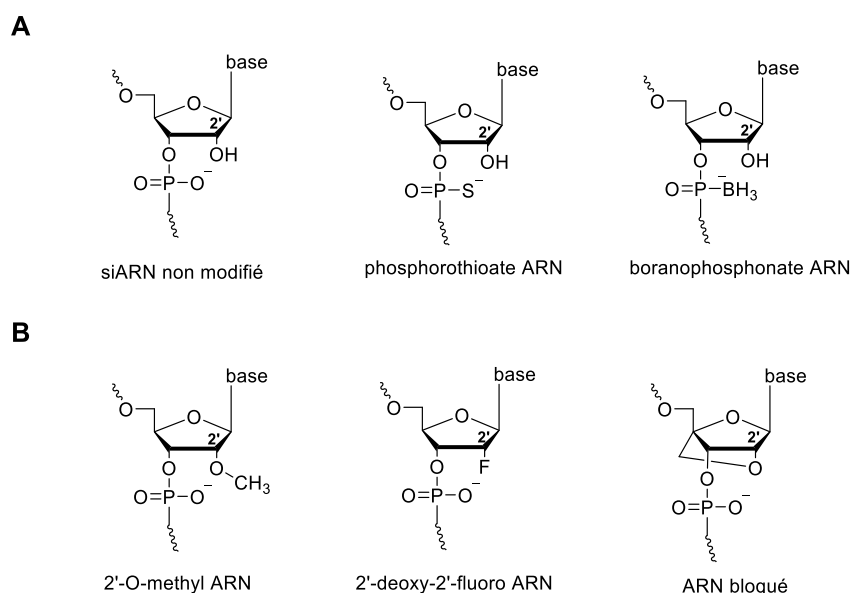


Figure 23. Modifications chimiques les plus couramment introduites dans les siARN : A) Modification du phosphodiester, B) Modification du ribose.

⁴² (a) J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay and B. A. Sullenger. *RNA*, 2004, 10, 766-771; (b) D. M. Dykxhoorn, D. Palliser and J. Lieberman. *Gene Ther*, 13, 541-552 (2006).

Le phosphate incorporé dans le squelette du siARN peut ainsi être modifié en substituant l'atome d'oxygène par du soufre ou du bore (Figure 23A). L'utilisation de ces hétéroatomes améliore la résistance aux nucléases et permet d'augmenter l'internalisation dans les cellules sans affecter l'efficacité de l'extinction.⁴³

Au niveau du sucre (ribose), les modifications principales se concentrent sur le carbone 2', normalement porteur d'un groupement hydroxyle (Figure 2B). Parmi les variations possibles, la méthylation de l'oxygène ou l'insertion de fluor en position 2' comptent parmi les plus intéressantes.^{42b}

Une autre modification chimique des siARN est la synthèse des acides nucléiques bloqués (*locked nucleic acid* ou LNA) (Figure 2B), qui sont caractérisés par une liaison 2'-O-méthyl-4'. Cette modification augmente considérablement le temps de demi-vie dans le sérum.⁴⁴

Les extrémités des siARN peuvent également être greffées de manière covalente avec différents groupes chimiques tels que le cholestérol dans le but d'améliorer leur délivrance, leur biodistribution et leur internalisation cellulaire (Figure 24).⁴⁵

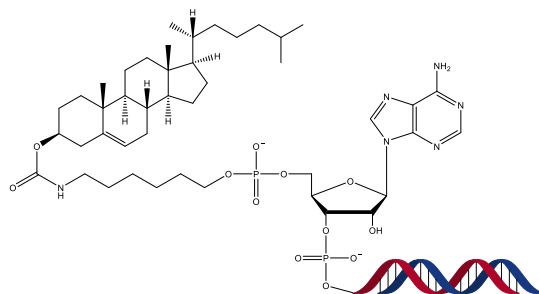


Figure 24. Conjugaison covalente entre un siARN et une molécule de cholestérol.

b. Les vecteurs viraux

L'utilisation de virus a été récemment appliquée à la délivrance de siARN. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus qui codent pour les protéines associées à un comportement pathogène, pour conserver uniquement celles impliquées dans la structure du vecteur et dans le cycle infectieux. Ainsi, le génome est remplacé par des séquences exprimant les ARN interférents.

Dans la littérature, trois classes de vecteurs viraux s'illustrent pour la délivrance de siARN : les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés aux adénovirus (adeno-associated virus ou AAV) (Figure 25).⁴⁶

⁴³ (a) S. Choung, Y. J. Kim, S. Kim, H. O. Park, Y. C. Choi. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 342, 919-927 (2006); (b) A. H. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, K. A. Alexander, K. A. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5991-6000.

⁴⁴ J. Elmén et al. *Nucleic Acids Res.* 33, 439-447 (2005).

⁴⁵ C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H.-P. Vornlocher and C. Unverzagt. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4975-4977 (2004).

⁴⁶ R. Waehler, S. J. Russell and D. T. Curiel. *Nature Rev. Genet.* 8, 573-587 (2007).

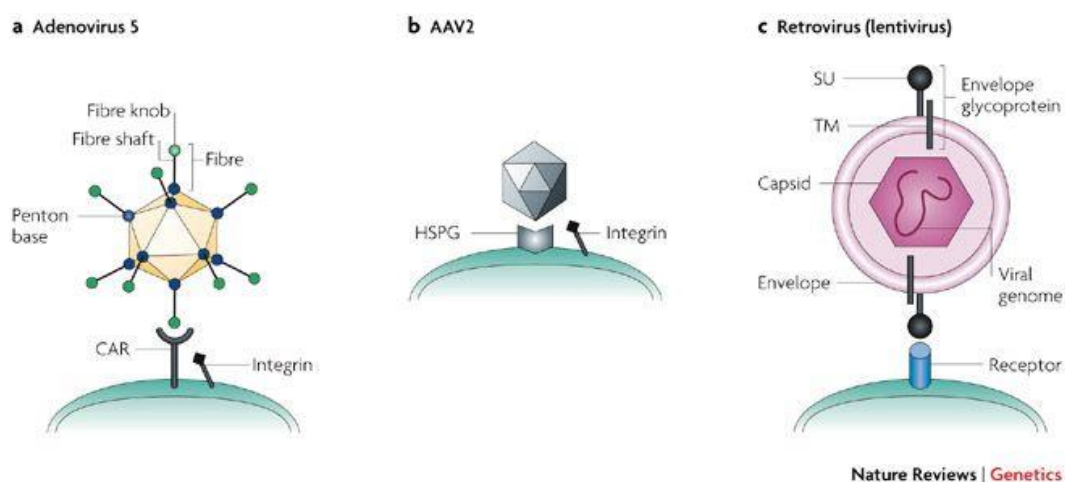


Figure 25. Différentes classes de virus utilisées pour la transfection d'ARN interférent.⁴⁶

Malgré leur grande efficacité, ces vecteurs sont coûteux, peuvent induire des réponses immunitaires et peuvent s'intégrer de façon aléatoire dans le génome hôte provoquant de graves mutations.

c. Les vecteurs synthétiques

Les principaux vecteurs synthétiques utilisés pour la délivrance de siARN sont généralement de nature lipidique ou polymérique. En ce qui concerne les vecteurs polymériques, les polyéthylèneimines (PEI) sont les systèmes les plus couramment décrits dans la littérature (Figure 26).⁴⁷ Dans ces systèmes, les siARN sont pris en charge par des interactions électrostatiques avec le vecteur qui peut présenter toutefois une toxicité parasite.

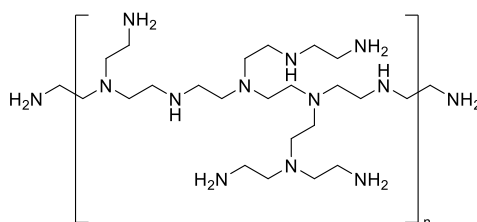


Figure 26. Polymères PEI utilisés pour la délivrance de siARN.

Les vecteurs lipidiques comme les liposomes, les micelles ou les émulsions sont aussi étudiés pour la délivrance de siARN. Les liposomes sont probablement la famille de vecteurs les plus prometteurs.⁴⁸ Ils se présentent sous la forme d'un auto-assemblage sphérique en bicouche de nature lipidique, avec une périphérie capable de se lier aux siARN et un cœur aqueux pouvant transporter des molécules hydrophiles (Figure 27).

⁴⁷ S. Höbel, A. Aigner. Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol. 2013, 5, 484-501.

⁴⁸ (a) T. S. Zimmermann, A. C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John and A. D. Judge. *Nature*, 2006, 441 (7089), 111-114; (b) T.W. Geisbert, L. E. Hensley, E. Kagan, E. Z. Yu, J. B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E. A. Fritz, P. B. Jahrling, K. McClintock, J. R. Phelps, A. C. Lee, A. Judge, L. B. Jeffs, I. MacLachlan. *J. Infect. Dis.* 193 (2006) 1650-1657.

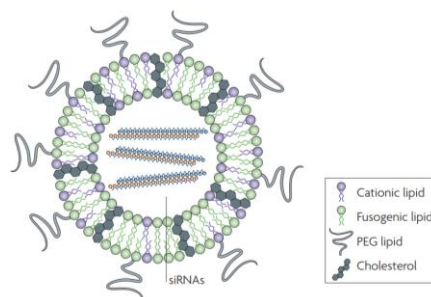


Figure 27. Structure liposomale pour la délivrance de siARN.⁴⁹

Aujourd'hui, l'objectif du développement des vecteurs synthétiques est de trouver les propriétés structurales idéales, afin d'augmenter la résistance au milieu extracellulaire, cibler les cellules impliquées dans les pathologies et libérer de manière plus efficace le siARN dans le cytoplasme.

Afin de répondre à ces problématiques, nous souhaitons développer un vecteur qui soit capable de promouvoir une transfection de siARN *in vitro*. Une telle utilisation nécessite de privilégier un outil favorisant une complexation rapide post-formulation du vecteur. Dans des conditions optimales, cet outil doit permettre une transfection efficace de siARN, en limitant la toxicité associée au vecteur.

En nous appuyant sur ces différentes constatations et sur le savoir-faire de notre laboratoire, nous avons orienté notre approche sur le développement de micelles à la surface cationique (pour favoriser l'interaction avec les siARN) et possédant un cœur polymérisé (pour une stabilité accrue).

II. Micelles PDA précédemment développées dans notre laboratoire

Les micelles sont des assemblages supramoléculaires sphériques d'unimères amphiphiles (composés dont la structure moléculaire présente un motif hydrophile et un motif hydrophobe). Les micelles présentent un certain nombre d'avantages en nanomédecine tels qu'un assemblage aisé et une forte capacité de chargement dans le cœur central hydrophobe. De par leur taille réduite, les micelles peuvent bénéficier d'une diffusion en profondeur dans les tissus cibles. Cependant, les micelles conventionnelles sont assez peu stables (car dynamiques par nature) et ont une concentration micellaire critique (CMC) relativement élevée, ce qui conduit, en conditions diluées comme dans le sang, à une déstabilisation de l'édifice supramoléculaire. Afin de contourner ces limitations, le laboratoire a développé des micelles compactes constituées d'amphiphiles qui incorporent une fonction diacétylénique. Cette dernière permet aux micelles d'être polymérisée après leur formation en solution aqueuse (Figure 28). Ainsi, la stabilité des micelles polydiacétyléniques est renforcée.³⁵

⁴⁹ A. De Fougerolles, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman. Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6 (6), 443-453.

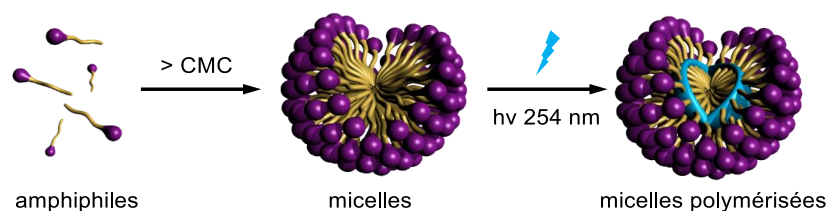


Figure 28. Formulation de micelles polydiacétyléniques.

Des micelles polydiacétyléniques (PDA) possédant des chimies de surface variées ont été testées par notre équipe pour l'imagerie *in vivo* et la vectorisation de médicaments. En effet, le cœur hydrophobe de la micelle permet d'encapsuler des principes actifs alors que la couche périphérique assure l'interface avec le milieu biologique environnant.

La biodistribution des micelles PDA-NTA (surface anionique), PDA-PEG₃₅₀ et PDA-PEG₂₀₀₀ (surface neutre) dans des souris xénotransplantées avec la lignée cancéreuse MDA-MB-231 (cancer du sein) a été étudiée après fonctionnalisation avec une sonde fluorescente.³⁴ L'imagerie planaire proche infrarouge (NIR) montre que les micelles PDA-PEG₂₀₀₀ s'accumulent le plus dans la tumeur après 96 h (Figure 29). Ce résultat a été rationalisé par la pharmacocinétique favorable de la micelle PDA-PEG₂₀₀₀ qui a également été utilisée pour de la thérapie *in vivo* (délivrance ciblée de paclitaxel) avec l'inhibition de la croissance de tumeurs sous-cutanées MDA-MB-231 chez la souris.

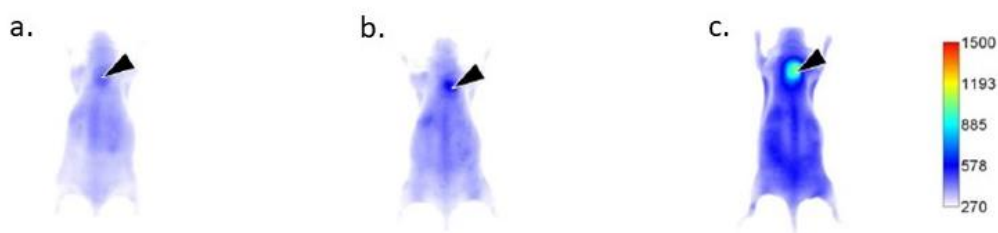


Figure 29. Imagerie planaire (96 h) proche infra-rouge de la biodistribution de : a) micelles PDA-NTA-FP730, b) micelles PDA-PEG₃₅₀-FP730, c) micelles PDA-PEG₂₀₀₀-FP730 dans des souris xénotransplantées avec MDA-MB-231.

Plus récemment, notre groupe a développé différentes familles de micelles destinées par exemple à la délimitation du volume tumoral,⁵⁰ au ciblage actif de cellules cancéreuses,⁵¹ à la libération contrôlée de principes actifs⁵² ou encore des objets qui possèdent une activité cytotoxique endogène.⁵³

Ainsi, en utilisant notre savoir-faire sur les micelles PDA, nous avons conçu des systèmes micellaires qui ont été appliqués à la délivrance de siARN *in vitro*.

⁵⁰ I. Theodorou, A. Parambath, B. Lelandais, D. Clarisse, A. Doerflinger, E. Gravel, F. Ducongé and E. Doris. Chem. Commun., 2015, 51, 14937.

⁵¹ (a) A. Doerflinger, N. N. Quang, E. Gravel, G. Pinna, M. Vandamme, F. Ducongé and E. Doris, Chem. Commun., 2018, 54, 3613 ; (b) A. Doerflinger, N. N. Quang, E. Gravel, F. Ducongé, E. Doris, Int. J. Pharm (2019), 565, 59-63.

⁵² K. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, F. Taran. Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 6366-6370.

⁵³ J. Alliot, I. Theodorou, D. V. Nguyen, C. Forier, F. Ducongé, E. Gravel and E. Doris. Nanoscale, 2019, 11, 9756.

III. Micelles cationiques pour la transfection de siARN

1. Synthèses de nouveaux amphiphiles cationiques diacétyléniques

Dans le cadre de ce projet, tous les amphiphiles à synthétiser posséderont une structure générale apparentée, à savoir une chaîne hydrocarbonée hydrophobe constante incorporant une fonction diacétylénique photo-polymérisable et une tête polaire hydrophile de nature cationique variable. Cette tête sera attachée *via* un lien amide à la chaîne carbonée (Figure 30). La présence de ce lien amide permet en général d'améliorer les propriétés d'assemblage des amphiphiles par le biais de liaisons hydrogène.

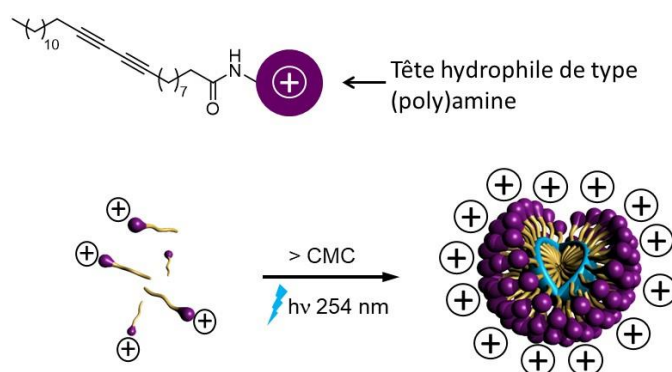


Figure 30. Structure générale des amphiphiles cationiques et leur auto-assemblage en micelles.

Nous avons sélectionné des groupements aminés pour la tête polaire car ils portent une charge nette positive à pH neutre. Ainsi, ils confèrent un caractère cationique au vecteur micellaire, permettant l'accroche des siARN en surface grâce à des interactions électrostatiques. Ces amines jouent également un rôle important dans le trafic intracellulaire, notamment pour la libération des micelles hors des endosomes/lysosomes en jouant le rôle d'une « éponge à protons ». Ce phénomène est primordial pour l'efficacité de l'extinction en permettant le relargage du siARN dans le cytoplasme. L'effet éponge à protons repose principalement sur la capacité des amines à tamponner la vésicule intracellulaire dans laquelle se retrouve le complexe siARN-vecteur. Cet effet tampon va provoquer une augmentation du pH et un afflux d'ions Cl^- dans le compartiment induisant un gonflement osmotique, une perturbation de l'endosome/le lysosome et finalement la libération des siARN dans le cytoplasme. Ainsi, notre première micelle a été assemblée au départ de l'amphiphile cationique le plus simple (**II.1**) incorporant une tête polaire monoamine (Figure 31).

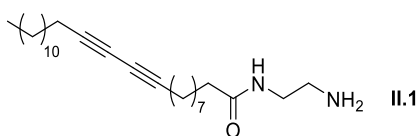


Figure 31. Structure de l'amphiphile **II.1** utilisé pour l'étude préliminaire.

Pour synthétiser l'amphiphile **II.1**, la première étape consiste à activer l'acide 10,12-pentacosadiynoïque commercial sous la forme d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide. Le composé **II.1'**, obtenu avec un rendement excellent ($> 99\%$), est ensuite mis à réagir avec un excès (10 équivalents)

d'éthylène diamine afin d'obtenir, après substitution nucléophile, l'amphiphile souhaité **II.1** (Figure 32). L'utilisation d'un excès de diamine permet ici d'éviter la formation de sous-produits issus du couplage de plusieurs chaînes acides sur un même motif d'éthylène diamine.

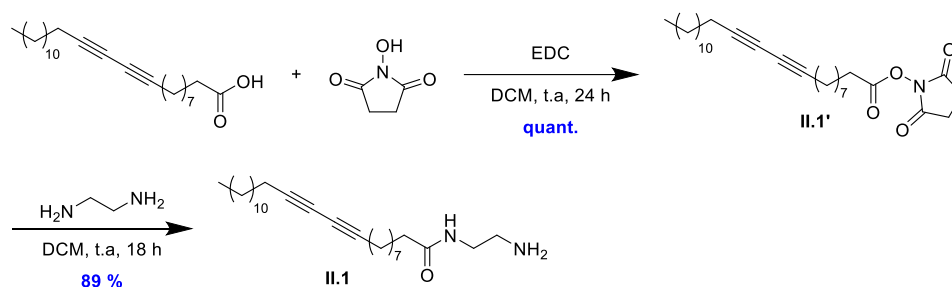


Figure 32. Synthèse de l'amphiphile **II.1**.

2. Formation des micelles cationiques polymérisées

Les micelles ont ensuite été assemblées dans l'eau acide à partir des amphiphiles **II.1**. Pour ce faire, l'amphiphile est d'abord solubilisé dans un solvant organique et filtré afin d'ôter d'éventuels résidus polymérisés qui se seraient formés au cours du stockage. De l'acide chlorhydrique concentré (37 %) est ajouté jusqu'à obtenir une concentration de 10 mM en acide. Le mélange est ensuite évaporé sous vide. Le résidu est repris à 10 mg mL^{-1} dans de l'eau déionisée acide (10 mM HCl). La solution est ensuite transférée dans un cristallisateur et mise sous une lampe UV à basse pression de mercure de 40 W opérant à 254 nm pendant 5 h.

Malgré ce temps de polymérisation assez élevé, des monomères libres peuvent être encore présents et engendrer une toxicité résiduelle sur les cellules.⁵⁴ Nous avons donc décidé de dialyser de façon intensive nos échantillons dans le but d'écarter les monomères non polymérisés. Des dialyses sont réalisées à l'aide de membrane filtrantes (2500 MWCO, *Molecular weight Cut-off*) dans de l'eau contenant 10 mM en HCl. À la suite de ces dialyses, la solution résultante est lyophilisée avant d'être reprise dans l'eau acide (HCl 10 mM) pour avoir une concentration finale en amphiphile de 10 mg mL^{-1} . La solution est finalement filtrée sur membrane Nylon 0,2 μm .

Pour la suite des travaux, sauf mention contraire, les micelles seront formées, polymérisées et dialysées en suivant ce protocole.

3. Caractérisation des micelles **II.1** formées

a. Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)

Principe et méthode

Afin de caractériser nos vecteurs, il est important de déterminer la concentration micellaire critique (CMC). En effet, l'auto-assemblage des amphiphiles en micelle n'est possible que si la concentration en tensioactif est supérieure à la CMC. En dessous de cette valeur, les amphiphiles vont préférer se

⁵⁴ P. Neuberg, A. Perino, E. Morin-Picardat, N. Anton, Z. Darwich, D. Weltin, Y. Mely, A. S. Klymchenko, J.-S. Remy, A. Wagner. Chem. Commun. 2015, 51 (58), 11595-11598.

comporter en unimères. Parmi les différentes approches existantes pour mesurer cette caractéristique physico-chimique, nous avons choisi la méthode de l'encapsulation du pyrène.⁵⁵

En fonction de l'environnement dans lequel se trouve le pyrène, son spectre d'émission varie. Ainsi, les changements environnementaux affectent ses pics d'émission à 373 et à 383 nm. Si le pyrène est encapsulé dans les micelles, le pic à 383 nm subira une augmentation en intensité puisqu'il se trouvera dans un environnement hydrophobe. En revanche, si les micelles ne sont pas formées, le pyrène se retrouve en milieu aqueux provoquant une diminution de l'intensité de ce pic. Pour déterminer la CMC, il faut alors mesurer l'évolution du rapport des intensités de fluorescence à 373 et 383 nm (I_{373}/I_{383}), pour une gamme de concentrations en tensio-actif.

Mesure de la CMC

Une gamme de solutions à différentes concentrations en composé **II.1** est réalisée dans l'eau. À chacune de ces solutions, 1 μ L de pyrène à 1 mM dans le DMSO est ajouté. Ensuite, chaque solution est excitée à 339 nm et le spectre d'émission du pyrène est enregistré. En reportant les différents ratios I_{373}/I_{383} obtenus en fonction du logarithme de la concentration, nous remarquons un point d'intersection entre les deux droites. Cette intersection permet de déterminer la CMC. On en conclut que la concentration micellaire critique de **II.1** est de 0,06 mg mL⁻¹, ce qui signifie qu'à 10 mg mL⁻¹ (concentration de travail habituelle), les amphiphiles **II.1** sont présents à une concentration suffisante pour s'auto-assembler en micelles (Figure 33).

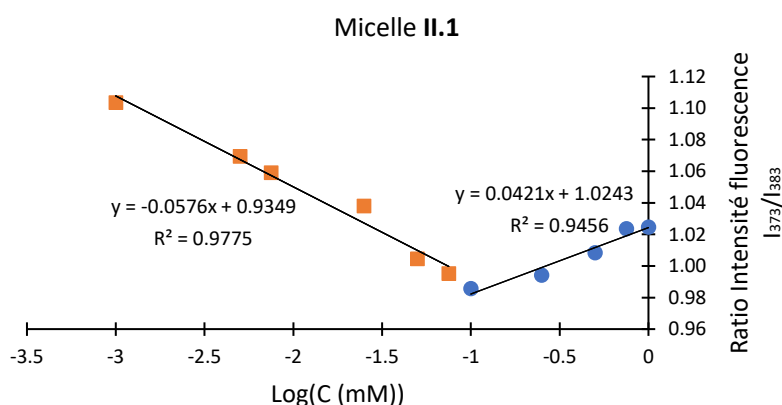


Figure 33. Détermination de la CMC par la méthode d'encapsulation du pyrène des micelles **II.1**.

b. Analyse par DLS et mesure du potentiel zêta

La taille des micelles a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les résultats obtenus indiquent que les objets ont un diamètre de 6,6 nm, ce qui correspond à une taille compatible avec des micelles.

Le potentiel zêta a également été mesuré à une valeur de +29 mV. Ce résultat confirme le caractère cationique global des micelles, qui est nécessaire pour l'étape d'adsorption électrostatique des siARN.

⁵⁵ K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99 (7), 2039-2044.

c. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose

L'adhérence électrostatique des siARN aux micelles cationiques est une condition préalable à la transfection. Cette adhérence a été étudiée en additionnant des quantités croissantes de micelles **II.1** à 20 pmol de siARN. Chaque échantillon a ensuite été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose afin de différencier les siARN migrant librement de ceux liés aux micelles.

Comme présenté sur la Figure 34, un retard complet de migration des siARN intervient dès un rapport N/P égal à 10 (rapport du nombre d'atomes d'azote « liants » du vecteur sur le nombre d'unités phosphate de l'ARN). Ces résultats suggèrent qu'à partir de ce ratio, la totalité des siARN est complexée par les micelles **II.1**.

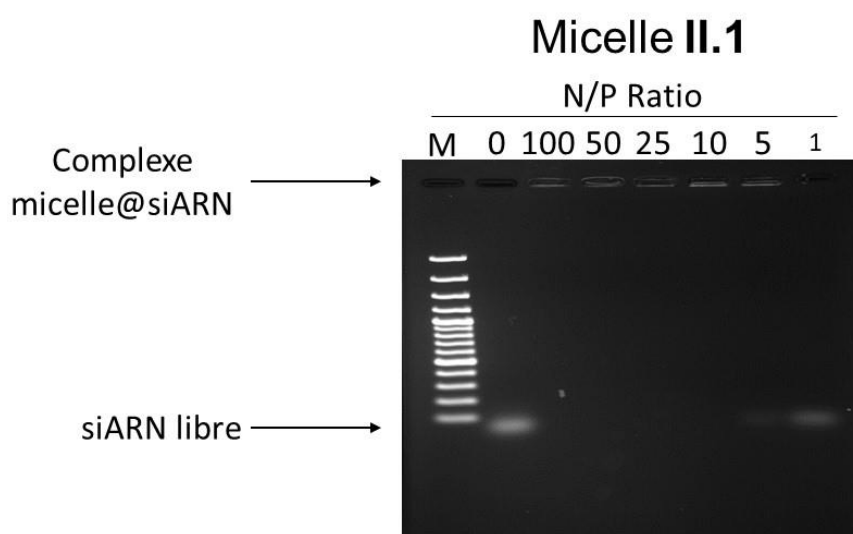


Figure 34. Electrophorèse sur gel d'agarose indiquant une complexation progressive des siARN par les micelles **II.1** avec l'augmentation du rapport N/P.

4. Transfection de siARN

Les expériences de biologie impliquant des tests cellulaires ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Guillaume Pinna du Service de Biologie Intégrative et de Génétique Moléculaire du CEA.

Comme les micelles **II.1** sont capables de se lier électrostatiquement aux siARN, une première série de tests biologiques a été effectuée afin de déterminer la capacité des micelles à délivrer un siARN. Les expérimentations ont été réalisées sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome cervical humain (HeLa). Tout d'abord, les complexes sont formés par interaction électrostatique en mettant en présence une concentration croissante de micelles polymérisées avec une concentration fixe du siARN (20 nM) dans un milieu de culture (OptiMEM). Chaque condition de complexation est définie selon un rapport de charge N/P, calculé de la manière suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{amphiphile}) \times n_N}{n(\text{siARN}) \times 42}$$

n_N est le nombre d'atomes d'azote protonables présents dans l'amphiphile. 42 étant le nombre de phosphates présents dans le siARN que nous avons employé (siARN double brin, 21 nucléotides par brin).

Nous avons utilisé deux siARN différents : le premier est un pool de siARN commercialisé par Qiagen (siAllstar « maximal cell Death ») contenant un mélange de siARN ciblant spécifiquement les transcrits de 3 gènes essentiels à la progression dans le cycle cellulaire et à la survie des cellules (EG5, PLK1 et POLR2A) (condition « Allstars »). Le second est un siARN contrôle négatif, dont la séquence ne cible aucun transcrit cellulaire (condition « UNR »). Les siARN ont été complexés avec les micelles à divers rapports N/P dans des plaques de 384 puits. Après 20 min de complexation à température ambiante, les cellules HeLa sont additionnées aux complexes micelle@siARN et incubées pendant trois jours à 37 °C et 5 % CO₂. Ensuite, les cellules sont fixées, les noyaux marqués avec une sonde fluorescente détectant les acides nucléiques, et la prolifération/survie cellulaire est déterminée par une approche couplant l'imagerie à moyen débit avec la quantification du nombre de noyaux.

Le même test est également effectué en l'absence de siARN afin de contrôler la toxicité potentielle des micelles (condition MOCK) et en utilisant un agent de transfection commercial, la Lipofectamine RNAiMax™, qui a été testé dans les conditions recommandées par le fabricant pour s'assurer de l'efficacité fonctionnelle des siARN.

Pour la suite des travaux, sauf mention contraire, toutes les expériences de transfection ont été réalisées en suivant ce protocole.

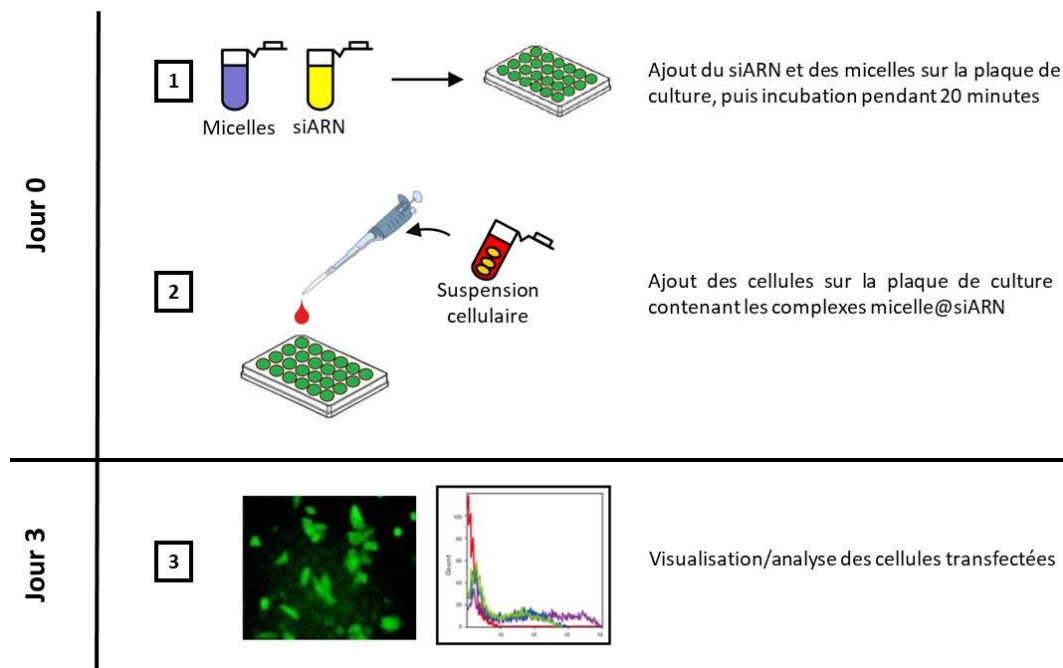


Figure 35. Déroulé du test de transfection.

La première observation est qu'il existe un effet fort du pool de siARN cytotoxiques lorsqu'ils sont complexés avec des micelles II.1 à partir du rapport N/P de 10. À N/P = 50, les micelles II.1 permettent une inhibition de la croissance cellulaire de plus de 80 %. Il est à noter l'apparition d'effets cytotoxiques (ou statiques) non spécifiques modérés au rapport N/P de 50 puisque les expériences contrôles MOCK et UNR montrent une légère diminution de la viabilité cellulaire (Figure 36).

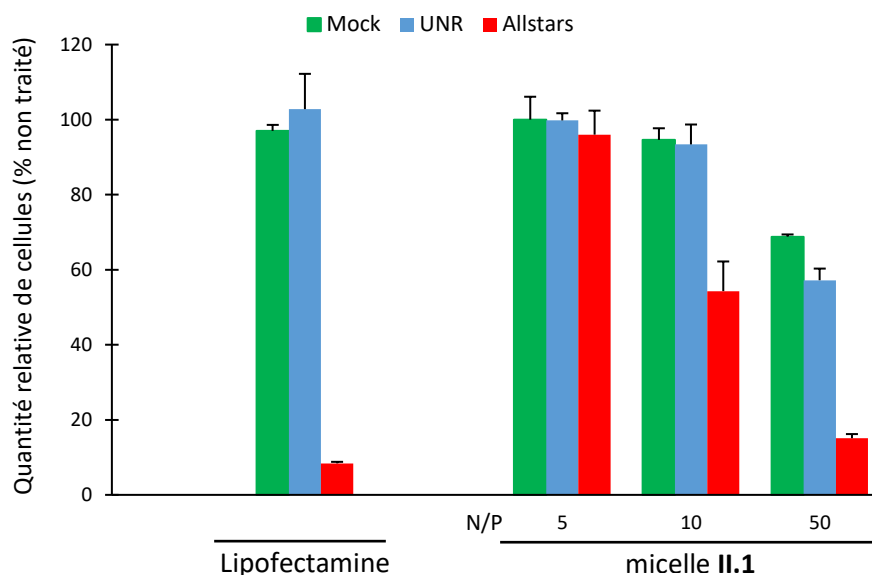


Figure 36. Transfection de cellules HeLa en utilisant la Lipofectamine RNAiMax™ et les micelles II.1 à différents rapports N/P (5, 10 et 50). MOCK : sans siARN, UNR : avec un siARN contrôle, Allstars : avec le pool de siARN cytotoxiques Allstars. La concentration en siARN a été fixée à 20 nM dans toutes les expériences.

Ces expériences préliminaires nous ont permis d'évaluer l'activité de la micelle assemblée à partir de l'amphiphile II.1 qui présente des propriétés de transfection prometteuses qui sont malheureusement associées à une légère cytotoxicité intrinsèque du vecteur. Nous avons ainsi cherché à améliorer les performances de la micelle en réalisant une étude systématique de structure/activité au départ de l'amphiphile II.1 qui nous servira de composé de référence.

IV. Étude structure-activité du composé actif II.1

1. Conception rationnelle de nouveaux amphiphiles cationiques

Les micelles formulées à partir du composé II.1 se sont avérées être efficaces pour la délivrance de siARN *in vitro* avec toutefois une légère cytotoxicité propre de la micelle. Nous avons donc choisi d'optimiser le système micellaire en partant du composé II.1 qui servira de brique élémentaire à la conception et la synthèse de nouveaux amphiphiles. La structure de II.1 peut être divisée en trois domaines principaux : une chaîne hydrocarbonnée, un linker et une tête polaire (Figure 37).

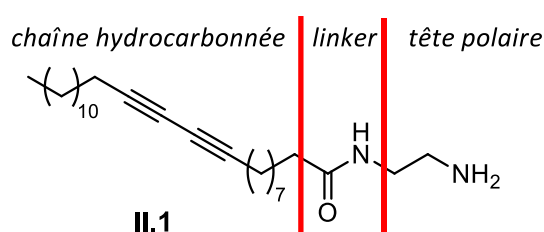


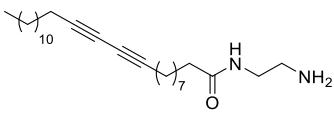
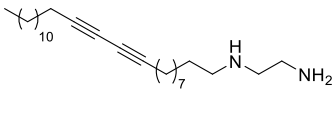
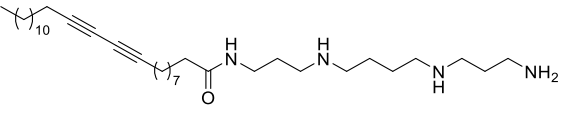
Figure 37. Subdivision du composé II.1 en trois domaines.

L'acide 10,12-pentacosadiynoïque est commercial et permet d'avoir accès facilement au motif diacétylénique polymérisable. Nous avons donc gardé ce motif hydrocarboné constant et n'avons fait varier que la partie linker et la partie tête polaire.

Notre approche pour la modification du linker présent dans le composé **II.1** a consisté à remplacer la fonction amide présente de **II.1** par une fonction amine pour obtenir l'analogue **II.5** (Tableau 1). Cette modification permettra d'évaluer l'effet de la réduction du carbonyle sur la transfection et d'augmenter le nombre d'atomes d'azote ionisables qui passe ici d'un à deux (diamine). Ce changement pourrait induire également un effet « éponge à protons » plus efficace et ainsi réduire la quantité de micelles nécessaires pour transfecter une même quantité de siARN. Cette réduction irait dans le sens d'une diminution de la toxicité potentielle du vecteur.

Dans le but d'étudier l'impact du nombre d'atomes d'azote ionisables sur la transfection, la tête éthylène diamine du composé **II.1** a également été remplacée par la spermine qui comporte trois atomes d'azote « libres ». Ainsi, l'amphiphile **II.8** (Tableau 1) a été synthétisé selon la séquence illustrée dans la Figure 39. Les composés **II.1**, **II.5** et **II.8** présentent respectivement une, deux et trois amines protonables dans leur tête polaire.

Tableau 1. Modification du linker et du nombre d'atomes d'azote ionisables du composé **II.1**.

Composé	Modification	Structure
II.1	Référence	
II.5	Linker (deux amines ionisables)	
II.8	Tête hydrophile (trois amines ionisables)	

2. Synthèse des amphiphiles **II.5** et **II.8** et formation des micelles

Pour synthétiser le composé **II.5** (sans lien amide), nous avons tenté de réduire directement la fonction amide de **II.1** par LiAlH_4 . Malheureusement, après un chauffage au reflux dans le THF, nous observons la formation de nombreux produits qu'il est impossible de séparer par chromatographie. Nous avons donc envisagé de réaliser la synthèse de **II.5** selon un autre chemin réactionnel (Figure 38). L'amphiphile **II.5** a pu être obtenu en quatre étapes à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque. La première étape consiste à réduire la fonction acide carboxylique en alcool avec de l'hydruure de lithium et d'aluminium dans THF. L'alcool **II.2** est obtenu avec un rendement de 98 %, il est ensuite activé par réaction avec du chlorure de tosyloxy, et le dérivé tosylé résultant est mis à réagir avec de la *N*-Boc-éthylènediamine mono-protégée en présence de Na_2CO_3 . Le composé intermédiaire **II.4** obtenu est finalement déprotégé en conditions acides (chlorure d'acétyle/MeOH) pour ôter le groupement Boc et conduire à la diamine **II.5** souhaité qui n'a plus de lien amide dans sa structure.

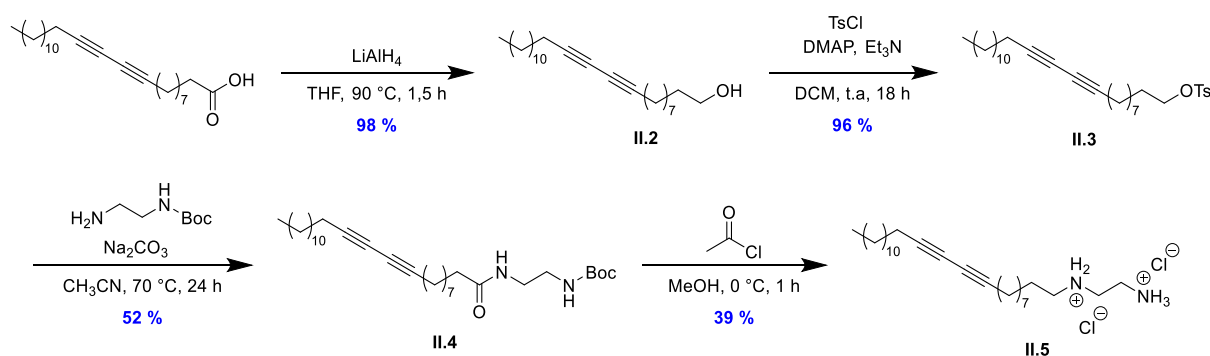


Figure 38. Synthèse du composé II.5.

La synthèse du composé « spermine » II.8 a été quant à elle réalisée au départ de la spermine protégée par des groupements Boc (composé II.6) qui ont été introduits dans une étape initiale. La présence de ces groupements protecteurs est nécessaire pour éviter une réaction de sur-couplage parasite de la spermine avec l'ester activé II.1'. Ce dernier est donc mis à réagir avec la spermine protégée II.6 pour conduire à un intermédiaire II.7 qui est dans une ultime étape déprotégé en milieu acide. L'amphiphile spermine II.8 est obtenu sous la forme d'un poly-chlorohydrate.

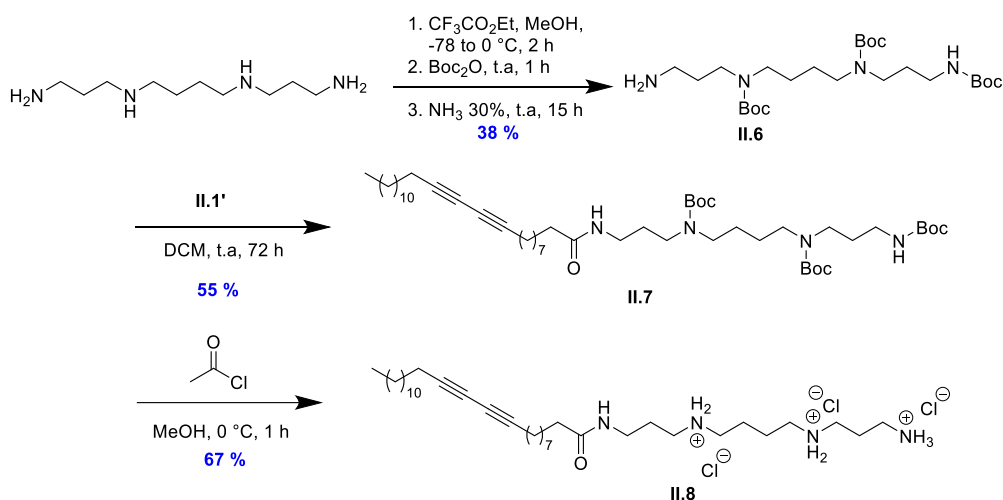


Figure 39. Synthèse de l'amphiphile II.8.

Une fois les amphiphiles à disposition, nous les avons assemblés en micelles avant de les polymériser et de les purifier par dialyse selon le protocole décrit dans la partie III.2. La taille des micelles a été analysée par DLS qui indique une valeur de diamètre hydrodynamique de 7 nm pour les deux micelles II.5 et II.8.

3. Transfection de siARN avec les micelles II.5 et II.8

Les micelles II.5 et II.8 produites ci-dessus sont ensuite soumises au même test de transfection de siARN que celui décrit dans la partie III.4. Les résultats seront comparés à ceux obtenus pour les micelles II.1 et à ceux de la Lipofectamine. Les résultats sont répertoriés au niveau de la Figure 40.

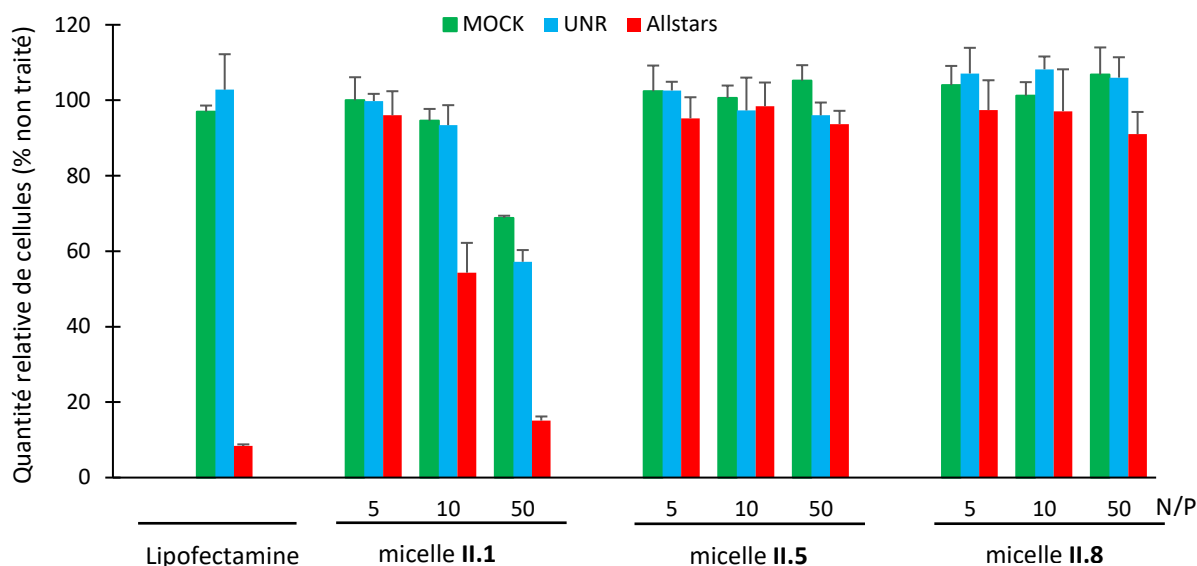


Figure 40. Transfection de cellules HeLa en utilisant la Lipofectamine RNAiMax™, la micelle **II.1**, la micelle **II.5** et la micelle **II.8** à différents rapports N/P (5, 10 et 50). MOCK : sans siARN ; UNR : avec siARN de contrôle ; Allstars : avec siARN cytotoxique Allstars.

La première observation est que la légère cytotoxicité classiquement observée pour la micelle **II.1** à des rapports N/P élevés (par ex. 50) est ici absente pour les micelles **II.5** et **II.8**. Cependant, et à notre grande surprise, les micelles formulées à partir des amphiphiles **II.5** et **II.8** ne montrent aucune activité de transfection *in vitro* et ce quel que soit le rapport N/P étudié. L'origine de ce phénomène est encore inconnue mais plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- Le lien amide présent dans la micelle **II.1** semble être nécessaire à l'activité de transfection car il participe probablement à la structuration régulière de la surface de micelle par le biais de liaisons hydrogène. Cette organisation de la surface des micelles **II.1**, que l'on ne retrouve plus pour les micelles **II.5**, pourrait favoriser l'interaction avec les siARN.
- Les différents atomes d'azote constitutifs du motif spermine (micelle **II.8**) présentent des valeurs de pK_a qui sont variables ($7,9 < pK_a < 10,1$).⁵⁶ Ainsi, la fonction amine terminale primaire a une valeur de pK_a de 10,1 qui est plus basique que celle des amines « conventionnelles ». Cette augmentation du pK_a est classiquement défavorable à l'efficacité des systèmes de délivrance de siARN.⁵⁷ En effet, un pK_a trop acide ou trop basique conduit souvent à une perte d'activité.

Face à ce constat de l'inefficacité des micelles sans lien amide **II.5** et de celles comportant une spermine **II.8**, nous avons décidé de recentrer notre approche sur la structure de l'amphiphile actif **II.1** et d'ajuster ses propriétés. Nous allons dans la suite de ce travail nous focaliser sur la nature chimique du groupement mono-amine terminal, en jouant sur sa substitution par des groupements alkyles.

⁵⁶ R. A. Casero, Jr, P. M. Woster. J. Med. Chem. 2009, 52 (15), 4551-4573.

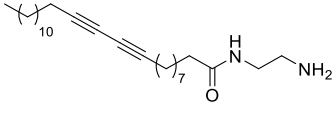
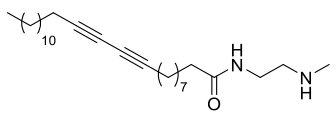
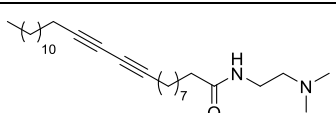
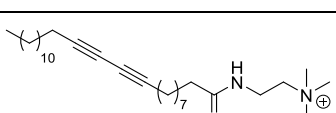
⁵⁷ (a) C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer, D. G. Anderson. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013, 110, 12881-12886; (b) M. Jayaraman, S. M. Ansell, B. L. Mui, Y. K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J. K. Narayanannair and K. G. Rajeev. Angew. Chem., Int. Ed., 2012, 51, 8529-8533.

V. Modifications de la tête amine de l'amphiphile II.1

1. Conception et synthèse de nouveaux amphiphiles

Compte tenu du peu d'efficacité mesuré pour les micelles diamine et spermine, nous avons décidé de repartir de l'amphiphile **II.1** et de l'utiliser comme brique élémentaire. Cet amphiphile sera modifié de telle sorte à ne modifier que le degré de substitution de l'atome d'azote constitutif de la tête polaire qui joue un rôle clé dans la complexation des siARN. Différents amphiphiles présentant un degré d'alkylation variable sur le groupe amine terminal ont ainsi été synthétisés. Il s'agit de l'amine secondaire **II.10**, l'amine tertiaire **II.11** et l'ammonium quaternaire **II.13** (Tableau 2). Ces modifications pourraient affecter le pK_a général de l'amphiphile et faire varier la sensibilité au pH de nos vecteurs. Le facteur stérique est également à prendre en compte dans cette étude structure-activité.

Tableau 2. Structure des composés issus de la modification du groupement amino du composé **II.1**.

Composé	Modification	Structure
II.1	Référence	
II.10	Tête hydrophile (amine secondaire)	
II.11	Tête hydrophile (amine tertiaire)	
II.13	Tête hydrophile (ammonium quaternaire)	

L'amphiphile **II.10**, incorporant une amine secondaire terminale (-NHMe), a été obtenu avec un rendement de 85 % (sur 2 étapes) par couplage de l'ester activé **II.1'** avec la *N*-Boc-*N*-méthyléthylènediamine, suivi d'une déprotection acide du Boc permettant l'obtention de l'amine secondaire (Figure 41).

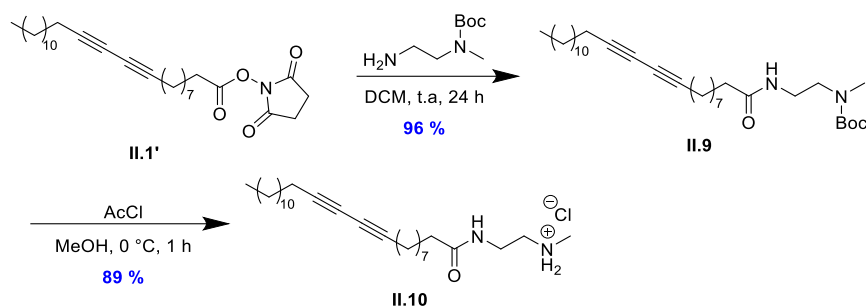


Figure 41. Synthèse de l'amphiphile II.10.

La synthèse de l'amphiphile II.11 implique le couplage de l'ester activé II.1' avec la *N,N*-diméthyléthane-1,2-diamine pour conduire au composé amphiphile souhaité portant une amine tertiaire (-NMe₂) avec un rendement de 95% (Figure 42).

L'amphiphile II.13 incorporant un groupement ammonium quaternaire à quant à lui été synthétisé à partir du composé II.11 par alkylation de ce dernier dans l'iodure de méthyle pur à température ambiante. Le contre-ion iodure est ensuite échangé (I → Cl) sur de la résine Amberlyst-26. L'amphiphile II.13 (-⁺NMe₃) a été isolé avec un rendement de 88 %, sur deux étapes (Figure 42).

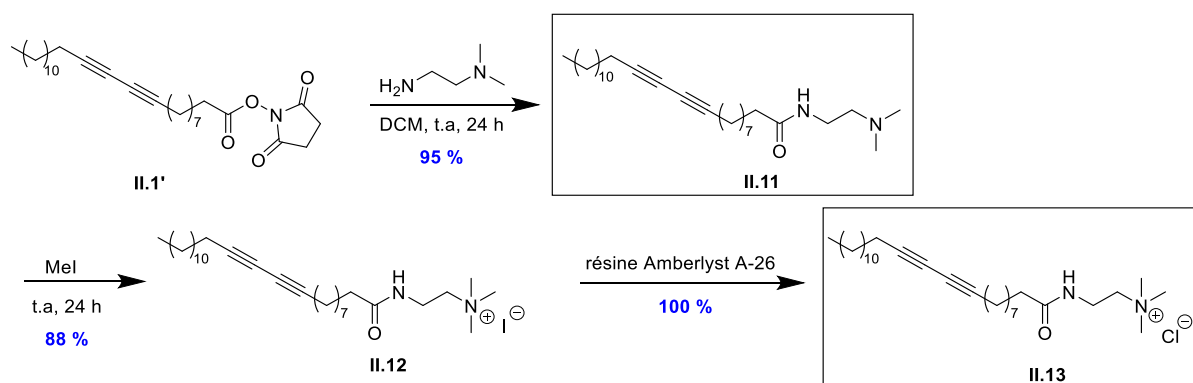


Figure 42. Synthèse des composés II.11 et II.13.

Nous avons ensuite assemblé les micelles qui correspondent à ces trois nouveaux amphiphiles en vue d'évaluer leurs performances en transfection.

2. Formations et caractérisation des micelles

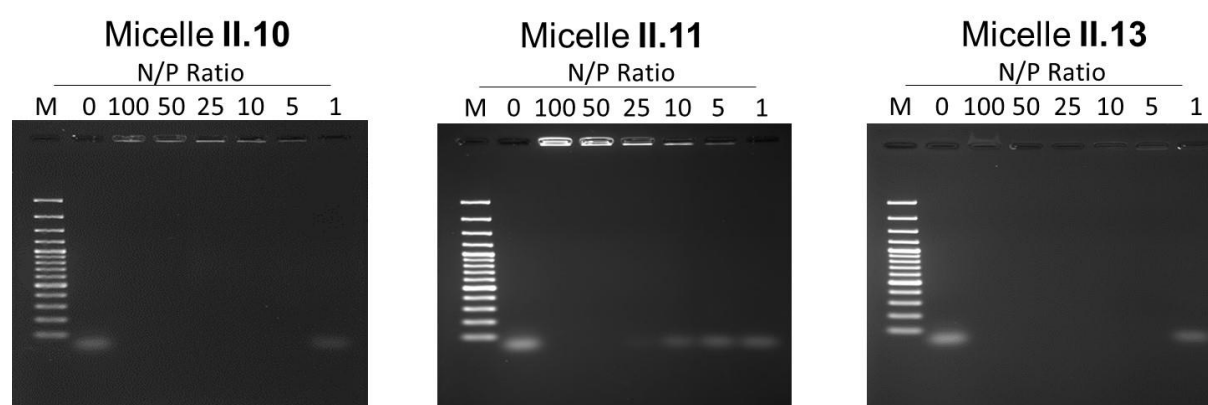
Les micelles ont été assemblées à partir des amphiphiles II.10, II.11 et II.13 en suivant le protocole décrit dans la partie III.2. La taille des micelles est analysée par DLS, le potentiel zêta est mesuré et la CMC est déterminée par la méthode d'encapsulation de pyrène (détaillée dans la partie III.3.a). Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Tableau récapitulatif des distributions de taille en nombre, de potentiel zêta et de la CMC des micelles **II.10**, **II.11** et **II.13**.

Composé	Mesure de la taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	CMC (mg mL ⁻¹)	Objet formé
II.10	6,5	+16	0,03	micelle
II.11	9	+13	0,03	micelle
II.13	7	+33	0,01	micelle

Les résultats obtenus indiquent que tous les composés ont un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm (6,5-9 nm) ce qui est en accord avec la taille caractéristique des micelles. Le caractère cationique des micelles **II.10**, **II.11** et **II.13** a été également confirmé par des mesures de potentiel zêta qui vont de +13 à +33 mV selon la micelle considérée.

L'adhérence électrostatique du siARN aux micelles cationiques est une condition préalable à la transfection. De même que pour la micelle **II.1**, cette interaction a été étudiée en mélangeant des quantités croissantes de micelles à 20 pmol de siARN. Chaque échantillon est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose, afin de séparer les siARN liés aux micelles de ceux qui sont libres. Comme le montre la Figure 43, un retard à la migration complet intervient à un rapport N/P d'environ 5 pour les micelles **II.10**, légèrement au-dessus de 25 pour les micelles **II.11** et environ 5 pour les micelles **II.13**.

**Figure 43.** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des micelles **II.10**, **II.11** et **II.13**, en interaction avec du siARN.

Les micelles présentent donc des caractéristiques électrostatiques à priori favorables pour une utilisation comme vecteurs de siARN.

3. Transfection de siARN avec micelles **II.10**, **II.11** et **II.13**

Les trois micelles ont ensuite été étudiées pour transfection du pool de siARN cytotoxique. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des micelles **II.1** et à la Lipofectamine qui servent de composés de référence. Les résultats sont répertoriés au niveau de la Figure 44.

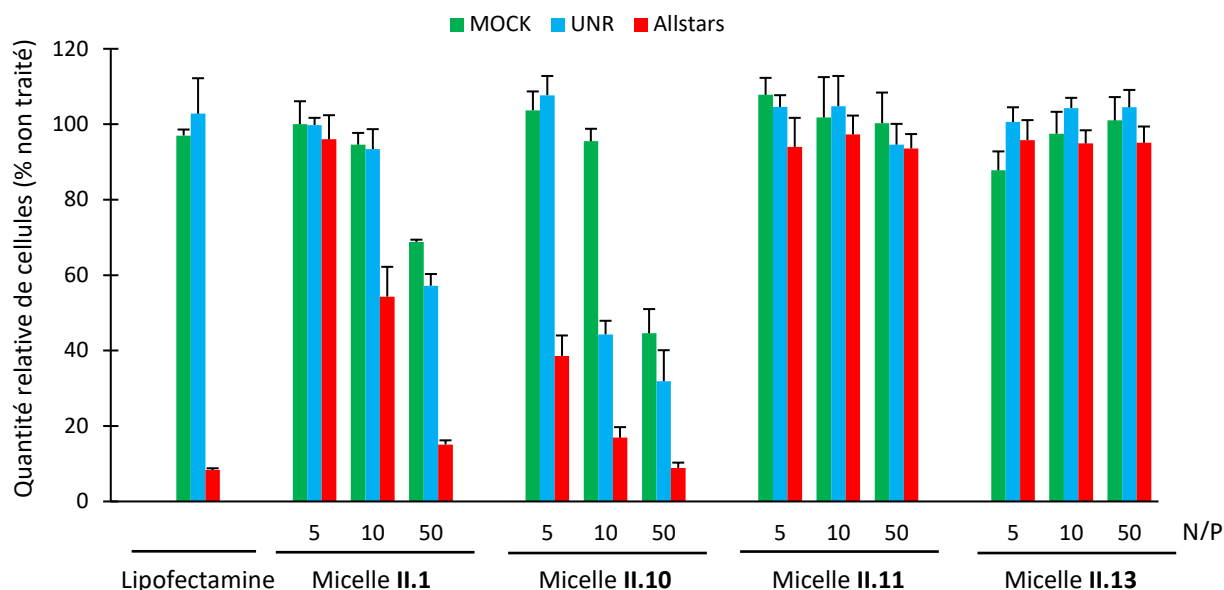


Figure 44. Transfection de cellules HeLa en utilisant la Lipofectamine RNAiMax™, la micelle **II.1**, la micelle **II.10**, la micelle **II.11** et la micelle **II.13** à différents rapports N/P (5, 10 et 50). MOCK : sans siARN ; UNR : avec siARN de contrôle ; Allstars : avec siARN cytotoxique Allstars.

La première observation est que les micelles constituées d'amines tertiaires (**II.11**) et ammoniums quaternaires (**II.13**) n'induisent pas de transfection et ce, quel que soit le rapport N/P étudié. En effet, nous n'observons pas de cytotoxicité rapportée par le pool de siARN Allstars. Il est à noter que les micelles ne sont également pas intrinsèquement cytotoxiques puisque la viabilité cellulaire est maintenue en présence des micelles seules et dans les expériences avec le siARN contrôle (UNR). L'absence d'efficacité de ces objets dans la transfection des cellules HeLa peut avoir plusieurs origines :

- En ce qui concerne la micelle **II.13**, la présence des têtes ammonium quaternaire autorise la complexation des siARN mais ne permet probablement pas leur libération intra-cytoplasmique par l'effet « éponge à proton » qui repose sur le pouvoir tampon des amines libres.⁵⁸ Cet effet induit classiquement une augmentation du pH lysosomal/endosomal, un afflux d'ions chlorure puis un gonflement osmotique qui perturbe le lysosome/l'endosome et provoque la libération de siARN dans le cytoplasme. Ce phénomène ne peut se produire dans le cas des ammoniums quaternaires **II.13** car les amines portées par la micelle ne sont plus basiques.
- Au contraire, le groupe amine tertiaire des micelles **II.11** est encore susceptible de se comporter comme une éponge de protons. L'origine de la non-efficacité de ces micelles doit être trouvée ailleurs. Nous émettons l'hypothèse que, dans le cas des micelles **II.13**, la transfection est moins active en raison de la faible complexation des siARN puisqu'un rapport N/P élevé (approximativement 25) est nécessaire pour totalement complexer les siARN (Figure 43).

De façon plus satisfaisante, nous observons un fort effet des micelles **II.10** (amine secondaire) en association avec le pool de siARN cytotoxique à un ratio N/P de 5. En effet, ces micelles sont plus efficaces pour la transfection que les micelles **II.1** de référence et ce, quel que soit le ratio N/P étudié.

⁵⁸ (a) O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 7297;
(b) G. Creusat, A. S. Rinaldi, E. Weiss, R. Elbaghdadi, J. S. Remy, R. Mulherkar and G. Zuber. Bioconjugate Chem. 2010, 21, 994.

La différence d'efficacité de transfection entre les micelles de **II.1** et **II.10** pourrait résider dans la basicité légèrement plus élevée de l'amine secondaire de **II.10** où le substituant méthyle ajoute une stabilisation à la charge cationique par polarisation. Il est probable que le pouvoir tampon des micelles **II.10** augmente, conduisant à une libération plus efficace de siARN dans le cytoplasme, entraînant ainsi une inhibition du gène correspondant plus importante.

Il est à noter qu'une certaine toxicité non spécifique modérée est associée aux micelles **II.10** seules et aux micelles **II.10** en associées au siARN contrôle. Cette cytotoxicité est flagrante à des rapports N/P élevés (par exemple 10 et 50) mais n'est pas préjudiciable en soi, puisqu'une forte inhibition d'expression du gène est déjà détectée pour un ratio N/P plus faible (N/P = 5). Néanmoins, et afin de réduire la cytotoxicité non spécifique des micelles **II.10**, leur efficacité de transfection a été optimisée par l'ajustement de la concentration en siARN.

VI. Optimisation de la transfection et caractérisation des complexes micelle **II.10@siARN**

1. Optimisation de la transfection des micelles **II.10**

Les micelles **II.10** présentant une toxicité non spécifique modérée aux ratios N/P élevés, nous avons envisagé de faire varier la concentration en siARN (de 1 à 10 nM) tout en maintenant le rapport N/P fixe. Ce rapport fixe implique que l'utilisation d'une plus faible concentration de siARN se répercutera directement sur la quantité engagée du vecteur micellaire qui sera moindre. Nous espérons qu'une concentration plus faible en micelle soit capable d'une part de transporter suffisamment de siARN pour induire un effet sur la lignée cellulaire HeLa et d'autre part de ne pas induire de toxicité associée au vecteur. Les résultats obtenus seront comparés à ceux impliquant la concentration classique de 20 nM en siARN.

Nous avons fixé le rapport N/P (micelle **II.10**/siARN) à 10 car c'est à cette valeur que nous avons, dans nos expériences précédentes, un bon compromis entre efficacité et toxicité. Dans ces conditions, une concentration de 1 nM en siARN entraîne une inhibition modérée mais significative (viabilité cellulaire < 70 %). L'augmentation de la concentration du pool de siARN à 5 nM accroît l'efficacité de la transfection. Les meilleurs résultats ont été obtenus à 10 nM en siARN (viabilité cellulaire < 20 %) sans aucune cytotoxicité apparente. Ainsi, les micelles **II.10** au ratio N/P = 10 peuvent être utilisées en toute « sécurité » pour la transfection efficace des siARN jusqu'à une concentration de 5 nM (Figure 45). Les résultats obtenus avec les micelles **II.10** sont comparables avec ceux de la Lipofectamine RNAimax™, le système de transfection de référence. Il est à noter que la structure chimique exacte de Lipofectamine RNAimax™ est inconnue, ce qui empêche de calculer le rapport N/P du complexe Lipofectamine@siARN. Ce fait met donc en perspective l'efficacité relative de l'agent de transfection commercial.

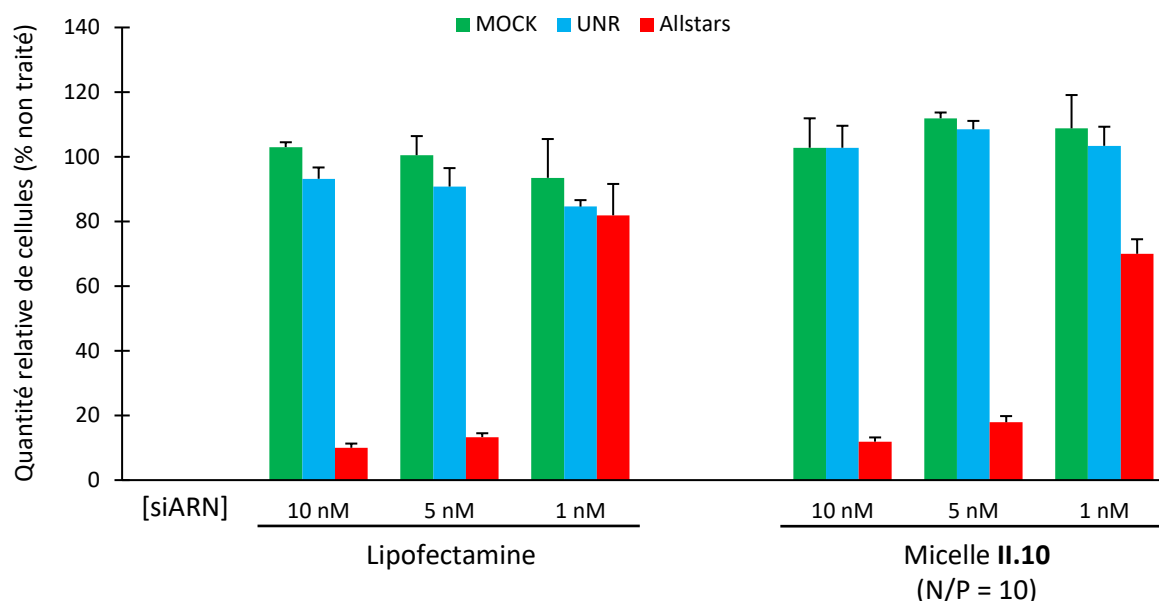


Figure 45. Transfection de cellules HeLa avec la Lipofectamine RNAiMax™ et des micelles **II.10** à N/P = 10. La concentration finale en siARN est de 1, 5 ou 10 nM. MOCK : sans siARN ; UNR : avec siARN de contrôle ; Allstars : avec siARN cytotoxique Allstars.

Les micelles **II.10** étant actives pour la transfection de siARN, nous avons cherché à caractériser plus finement le complexe par des mesures physicochimiques (taille et charge de surface) et à visualiser le processus de transfection cellulaire par des techniques de microscopie de fluorescence.

2. Caractérisation des complexes micelle **II.10**@siARN

a. Analyse par DLS et mesure du potentiel zêta

Les complexes (micelles **II.10**@siARN) ont été formés dans du tampon HBG 10 mM à une concentration micellaire de 1 mg mL⁻¹ et au ratio N/P de 10. Après 20 minutes d'incubation à la température ambiante, la distribution de la taille des complexes a été déterminée par DLS. Le complexe micelles **II.10**@siARN a un diamètre hydrodynamique de 80 nm (Figure 46a).

Des mesures de potentiel zêta ont été réalisées avec les complexes (micelle **II.10**@siARN) au ratio N/P de 10. Pour ce faire, une solution de micelles à 1 mg mL⁻¹ dans du tampon HBG a été préparée. Ensuite, le siARN a été ajouté pour obtenir un ratio N/P de 10. Après 20 minutes de complexation, le potentiel zêta du complexe a été mesuré. Une valeur de +8 mV, inférieure à la valeur mesurée pour des micelles seules (+16 mV) a été enregistrée (Figure 46b). Cette observation va dans le sens de la formation du complexe, qui conduit normalement à une neutralisation partielle des charges positives des micelles. Les complexes actifs *in vitro* restent légèrement cationiques.

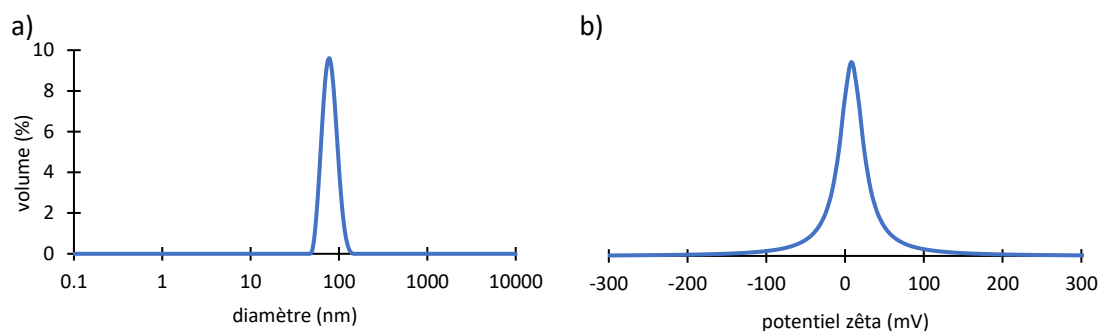


Figure 46. Profil de (a) DLS et (b) potentiel zêta des complexes micelle **II.10@siARN**.

b. Visualisation de l'internalisation des complexes micelle@siARN

L'internalisation des complexes dans les cellules a été étudiée par microscopie de fluorescence. Des complexes micelle@siARN fluorescents ont été préformés par complexation de différentes micelles avec un siARN couplé à une molécule d'Alexa-488. La fluorescence associée à ce fluorophore, qui émet dans le vert, va permettre de visualiser le devenir des complexes micelle@siARN lorsqu'ils sont incubés avec les cellules HeLa. Les quatre micelles étudiées ci-dessus, *i.e.* amine primaire (**II.1**), secondaire (**II.10**), tertiaire (**II.11**), et quaternaire (**II.13**) ont ainsi été mises en interaction avec le siARN-Alexa 488. Les résultats sont comparés à ceux d'un contrôle positif impliquant la lipofectamine@siARN-Alexa 488.

Les complexes micelle@siARN ont été formés comme précédemment par incubation pendant 20 min des siARN-Alexa 488 avec les micelles avant addition sur la lignée cellulaire HeLa. 12 h après la transfection, les cellules sont fixées, le noyau est coloré en bleu (Hoechst) et les échantillons observés par microscopie sous illumination laser à 405 nm et 488 nm pour visualiser le noyau et le siARN, respectivement.

La microscopie confocale montre que le complexe micelle@siARN-Alexa 488 est internalisé de façon efficace dans trois cas : i) le contrôle positif Lipofectamine (Figure 47b), ii) la micelle amine primaire **II.1** (Figure 47c), et la micelle amine secondaire **II.10** (Figure 47d). En effet, nous observons pour ces cas de figure une fluorescence marquée dans le cytoplasme des cellules au voisinage du noyau.

En revanche, nous n'observons pas de signal de fluorescence pour les cellules seules (Figure 47a) et celles transfectées avec les micelles amine tertiaire **II.11** (Figure 47e) et ammonium quaternaire **II.13** (Figure 47f) (en interaction avec le siARN-Alexa 488).

Ces résultats indiquent que, au-delà de la capacité de la micelle à se lier au siARN qu'elle transporte et à jouer le rôle d'éponge à proton pour libérer sa cargaison d'ARN interférent dans le cytoplasme, l'internalisation du vecteur dans la lignée cellulaire HeLa est également prépondérante dans l'efficacité globale du système de transfection. Ainsi, les micelles amine primaire **II.1** et secondaire **II.10** associent elles probablement les caractéristiques favorables à une efficacité de transfection puisqu'elles lient les siARN par interactions électrostatiques, franchissent la membrane cellulaire, et sont probablement à même de tamponner (par protonation des amines) le compartiment au sein duquel elles se retrouvent après internalisation pour libérer la cargaison de siARN.

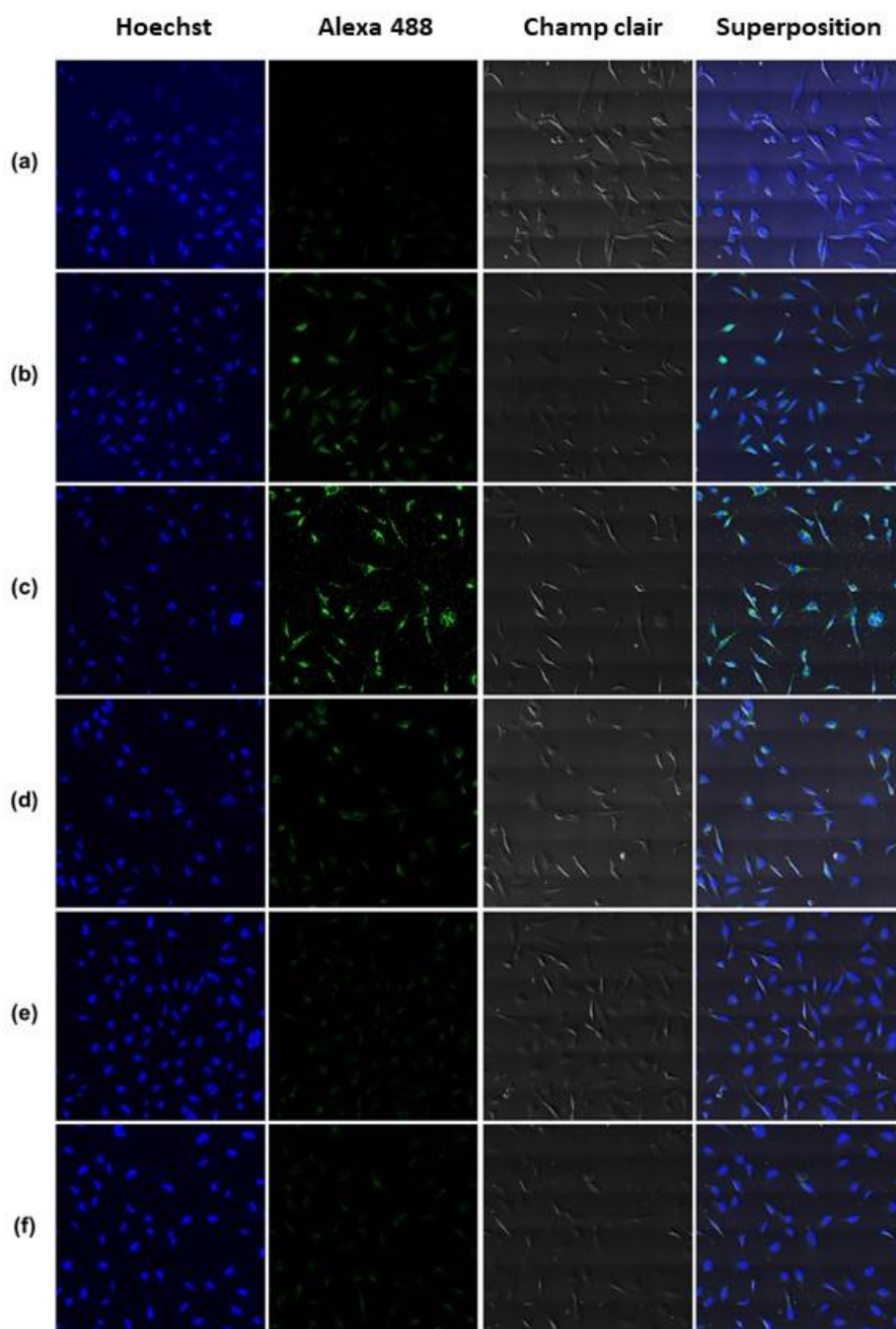


Figure 47. Images par microscopie de fluorescence confocale de : (a) cellules HeLa non traitées. Cellules HeLa transfectées avec le siARN-Alexa-488 (couleur verte) complexé avec (b) la Lipofectamine RNAiMax™, (c) les micelles **II.1**, (d) les micelles **II.10**, (e) les micelles **II.11** et (f) les micelles **II.13**. La concentration finale en siARN est fixée à 10 nM et le rapport N/P est de 10. La coloration du noyau a été réalisée avec du Hoechst 33 342 (couleur bleue).

VII. Conclusion

Les micelles initialement formulées à partir des amphiphiles amine primaire **II.1** ont montré leur efficacité pour la délivrance de siARN avec toutefois une toxicité parasite de la micelle à des ratios N/P élevés. Nous avons ainsi cherché à améliorer les performances du vecteur micellaire en réalisant une

étude systématique de structure/activité au départ de l'amphiphile **II.1** qui nous a servi de brique élémentaire. Les premières modifications sont intervenues sur le linker et sur le nombre d'atomes d'azote ionisables présent dans la tête polaire de l'amphiphile **II.1**, mais ces modifications n'ont pas conduit à une amélioration des performances du système puisque nous n'observons plus, avec ces systèmes, de transfection des siARN *in vitro*.

Nous avons par la suite fait varier le degré d'alkylation du groupement amine de l'amphiphile **II.1** de telle sorte à accéder aux amphiphiles amine secondaire **II.10**, amine tertiaire **II.11** et ammonium quaternaire **II.13**. Alors que les micelles amine tertiaires et ammoniums quaternaires n'ont montré aucune activité *in vitro*, la micelle amine secondaire s'est démarquée par son efficacité plus importante en transfection que la micelle de référence **II.1**. En effet, après optimisation des concentrations respectives en siARN et en micelle, le système amine secondaire **II.10** permet l'extinction de l'expression des gènes cibles avec une efficacité supérieure à 80 %. Il est à noter que dans ces conditions opératoires (N/P = 10 et [siARN]= 5 nM) la légère toxicité parasite associée au vecteur micellaire n'est plus observée ce qui permet d'envisager à terme une utilisation du système nanométrique (ou un dérivé) pour des applications en transfection *in vivo*.

CHAPITRE III : MICELLES POUR LA CATALYSE *IN VITRO*

Dans le contexte général de la catalyse, les micelles peuvent, grâce à leur cœur hydrophobe, prendre en charge des catalyseurs et des réactifs par le biais de l'effet hydrophobe. L'encapsulation permet une augmentation locale de la concentration moléculaire, exaltant ainsi la réactivité des composés au cœur de la micelle. Au-delà de l'amélioration des cinétiques réactionnelles, les micelles offrent également la possibilité de transférer des réactions « traditionnelles », mises au point en solvants organiques, vers des milieux aqueux. Ces avantages associés à l'utilisation de micelles nous ont incité à développer un système catalytique micellaire pour la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen dans l'eau. L'approche que nous nous proposons de mettre en œuvre doit également permettre de réaliser cette transformation chimique en interaction avec le vivant.

I. La catalyse en milieu micellaire

Dans une réactions chimique conventionnelle, les solvants représentent environ 80 % de la masse totale manipulée⁵⁹ et, dans 70 % des cas, ils sont incinérés pour récupérer de la chaleur.⁶⁰ Par conséquent, leur substitution par des alternatives plus respectueuses de l'environnement peut directement avoir un effet positif sur les effluents et les problèmes de sécurité.⁶¹

Parmi les différentes possibilités, l'eau est certainement le solvant qui a le moins d'impact sur l'environnement. L'eau utilisée comme solvant est extrêmement économique, non toxique et non inflammable. Elle ne contribue pas aux émissions de gaz à effet de serre, elle ne nécessite pas de synthèse pour sa préparation, l'énergie nécessaire à son isolation sous forme pure est faible et son impact environnemental est négligeable (facteur E = 0).⁵⁹ L'eau présente également d'autres avantages tels qu'une acidité ajustable, une grande capacité thermique et une température d'ébullition élevée (qui permettent de contrôler facilement les réactions exothermiques) ainsi qu'un caractère ambivalent donneur et accepteur de liaisons hydrogène. En un mot, l'eau est le solvant vert *par excellence*.

Malgré ces propriétés, l'eau fait partie des solvants les moins utilisés du fait de sa polarité élevée. De plus, son réseau de liaisons hydrogène exclu les composés lipophiles et donne lieu à l'effet hydrophobe, entraînant une ségrégation des espèces apolaires plutôt que d'assurer leur solvation au niveau moléculaire (Figure 48). Il en résulte une solubilité insuffisante pour les molécules de faible polarité.

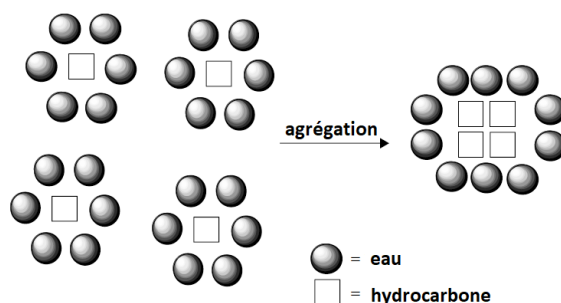


Figure 48. Effet hydrophobe de l'eau agrège les molécules apolaires.

⁵⁹ R. A. Sheldon. *Green Chem.*, 2007, 9, 1273.

⁶⁰ C. Capello, U. Fischer and K. Hungerbühler. *Green Chem.*, 2007, 9, 927.

⁶¹ D. S. MacMillan, J. Murray, H. F. Sneddon, C. Jamieson and A. J. B. Watson. *Green Chem.*, 2012, 14, 3016.

Cependant, les travaux de Breslow dans les années 1980 sur l'accroissement substantiel de la vitesse des réactions de Diels-Alder conduites dans l'eau par rapport à d'autres solvants organiques ont changé les préjugés sur l'eau.⁶² Dans ses études, Breslow a observé que la cycloaddition de la buténone et du cyclopentadiène était 740 fois plus rapide dans l'eau que dans l'isooctane. De plus, la sélectivité obtenue avec l'eau (*endo/exo* = 21,4) est plus élevée par rapport à la même réaction dans le cyclopentadiène (*endo/exo* = 3,85). Ces résultats sont d'autant plus remarquables que l'utilisation de solvants polaires protiques tels que le méthanol ou l'éthanol conduit à des résultats proches de ceux obtenus avec des solvants hydrocarbonés. Ces observations ont été rationalisées par l'effet hydrophobe.⁶³ En effet, pour maintenir son réseau de liaisons hydrogène, l'eau force des molécules hydrophobes à s'agréger, puis elle enveloppe ces agrégats, exerçant ainsi une « pression interne » qui permet d'accélérer la réaction de Diels-Alder.

Des études plus récentes ont confirmé que des transformations chimiques pouvaient être réalisées dans l'eau.⁶⁴ Les nombreux avantages liés à l'utilisation de l'eau ont finalement poussé les chercheurs à explorer dans le détail son utilisation comme solvant avec le développement de nouveaux systèmes catalytiques pouvant fonctionner en milieu aqueux.

En s'inspirant de la nature, la première option pour faire la chimie « dans l'eau » est d'utiliser les biocatalyseurs à base d'enzymes naturelles ou non naturelles.⁶⁵

Une deuxième option consiste à introduire dans le milieu réactionnel des systèmes de type micellaires incorporant des catalyseurs et capables de prendre en charge de façon transitoire les réactifs non-solubles de manière à les concentrer localement tout en les dispersant en milieu aqueux. En effet, comme certaines enzymes, les micelles présentent un cœur hydrophobe isolé de l'eau dans lequel peuvent se loger des molécules, et une surface hydrophile assurant leur solubilité. De ce point de vue, les micelles agissent comme des nano-réacteurs qui augmentent la concentration locale des réactifs et améliorent leur réactivité au voisinage du catalyseur encapsulé.

L'utilisation des micelles en phase aqueuse permet de simplifier le traitement de la réaction ainsi que le recyclage du catalyseur. Dans un cas favorable, le produit de la réaction est insoluble et peut être filtré du mélange réactionnel, mais le plus souvent, il est extrait à l'aide d'un solvant organique non miscible à l'eau.

Les micelles offrent également l'avantage de pouvoir activer des réactions en conditions « douces ». Un exemple intéressant a été publié par le groupe de Lipshutz.⁶⁶ Il s'agit d'une réaction pallado-catalysée d'activation C–H permettant le couplage croisé d'urées arylées avec des halogénures d'aryle. Ces réactions de couplage sont généralement réalisées dans des conditions drastiques, notamment à une température supérieure à 100 °C, nécessaires pour s'affranchir de la faible réactivité des liaisons C–H aromatiques. Ces mêmes réactions effectuées dans l'eau en présence de tensioactifs neutres ont pu être réalisées dans des conditions expérimentales beaucoup plus douces. La réaction de couplage de dérivés de l'urée avec des iodures d'aryle dans l'eau a ainsi été réalisée à température ambiante en

⁶² D. C. Rideout and R. Breslow. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 7816.

⁶³ R. Breslow. *Acc. Chem. Res.*, 1991, 24, 159.

⁶⁴ S. Narayan, J. Muldoon, M. G. Finn, V. V. Fokin, H. C. Kolb, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3339.

⁶⁵ (a) R. Wohlgemuth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 713-724; (b) M. T. Reetz. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 12480-12496.

⁶⁶ T. Nishikata, A. R. Abela and B. H. Lipshutz. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 781.

utilisant des micelles neutres assemblées à partir d'amphiphiles polyéthylèneglycol dodécyl éther (Figure 49). La réaction peut être appliquée à une large gamme de substrats, donnant les dérivés biaryles correspondants avec des rendements compris entre 70 et 97 %. Dans ces conditions douces, seuls des produits monoarylés ont été obtenus.

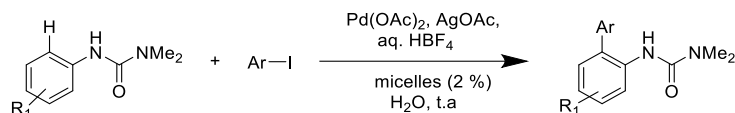


Figure 49. Arylation en *ortho* de dérivés d'aryle-urée catalysée par Pd(II) dans l'eau et en présence de micelles.

Des réactions catalysées en milieu micellaire peuvent aussi bénéficier de différentes chimio-, régio- ou stéréosélectivités par rapport aux mêmes réactions conduites en solvant organique. Parfois, une meilleure sélectivité est observée. Un exemple a été rapporté par Ismail et ses collègues qui ont étudié la réaction de nitration de composés aromatiques par de l'acide nitrique. En présence de micelles anioniques SDS, la réaction entre l'acide nitrique et le phénol à température ambiante est totale en 30 minutes et conduit exclusivement au *p*-nitrophénol (Figure 50).⁶⁷ En effet, les micelles anioniques SDS encapsulent le substrat et favorisent son contact étroit avec le nitronium formé *in situ*. Cette réaction régiosélective a pu être étendue à des substrats riches en électrons tels que l'aniline, mais aussi à des substrats aromatiques pauvres en électrons. Les produits sont obtenus avec un bon rendement et une régiosélectivité élevée. De plus, les problèmes typiquement rencontrés dans les réactions de nitration en milieu organique tels la poly-nitration, ne sont pas observés en catalyse micellaire.

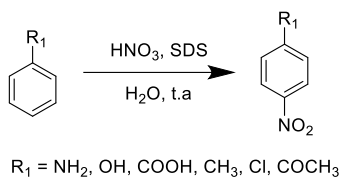


Figure 50. Nitration régiosélective de composés aromatiques avec de l'acide nitrique dans un milieu micellaire aqueux SDS.

Au vu des avantages que peut apporter la catalyse micellaire, le laboratoire a développé récemment de nouvelles micelles pour la catalyse de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen dans l'eau.⁶⁸ Dans mon projet de thèse, ce catalyseur sera exploré et validé pour la promotion de la réaction de Huisgen dans des milieux biologiques complexes tels que ceux que l'on trouve dans le compartiment intracellulaire.

II. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne a été étudiée, dans sa version thermique, par Huisgen dans les années 1960.⁶⁹ Cette cycloaddition conduit à la formation de triazoles en mélange de deux régioisomères 1,4 et 1,5 (Figure 51). Cette réaction est incompatible avec de

⁶⁷ J. Dey, M. Saha, A. Kumar Pal and K. Ismail. RSC Adv., 2013, 3, 18609.

⁶⁸ D. Clarisse, P. Prakash, V. Geertsens, F. Miserque, E. Gravel, E. Doris. Green Chem. 2017, 19, 3112-3115.

⁶⁹ R. Huisgen. Angew. Chem., Int. Ed., 1963, 2, 565.

nombreux substrats ainsi qu'avec les systèmes biologiques à cause des conditions d'activation thermiques requises.

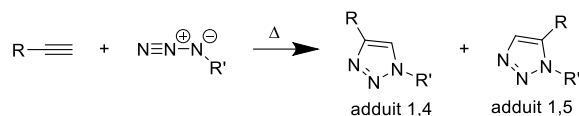


Figure 51. Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen.

Au début des années 2000, les groupes de Meldal et Sharpless ont simultanément rapporté l'observation que le cuivre(I) pouvait considérablement accélérer la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne vrai à température ambiante. De plus, la réaction est régiosélective, conduisant uniquement au régioisomère 1,4 et compatible avec des conditions aqueuses.⁷⁰ Cette version cupro-catalysée, répondant au concept de « click-chemistry », est désormais connue sous le nom de « Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition » (CuAAC).

La CuAAC nécessite classiquement une activation par des sels de cuivre(I) générés *in situ* par réduction de cuivre(II) par de l'ascorbate de sodium. En 2013, Fokin montre que le mécanisme réactionnel passe par une espèce dinucléaire de cuivre.⁷¹ Cet intermédiaire clé a par la suite été isolé par le groupe de G. Bertrand.⁷² Le mécanisme proposé par Fokin est présenté dans la Figure 52.

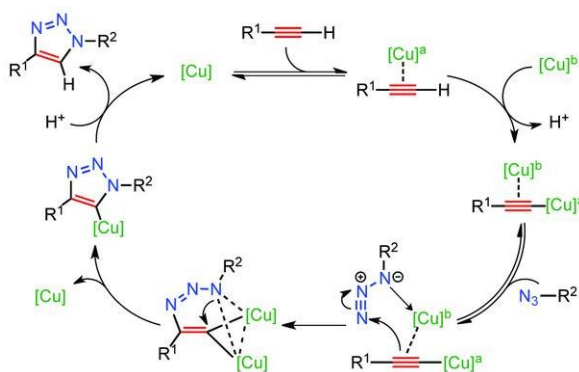


Figure 52. Mécanisme proposé par Fokin pour la CuAAC.⁷¹

Grâce à la petite taille des fonctions azoture et alcyne terminal, elles peuvent être incorporées facilement dans une large variété de molécules et de biomolécules. Ainsi la CuAAC a trouvé de nombreuses applications en bioconjugaison. Dans la littérature, on peut trouver la modification de protéines *in vitro* et *in vivo* par incorporation d'acides aminés non naturels portant des fonctions azotures ou alcynes.⁷³ La CuAAC a également permis l'imagerie *in vivo* de différentes biomolécules

⁷⁰ (a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 2596; (b) C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal. *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 3057.

⁷¹ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin. *Science* 2013, 340, 457-460.

⁷² L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand. *Science Advances* 2015, 1, e1500304.

⁷³ (a) A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 11782-11783; (b) A. J. Link, D. A. Tirrell. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 11164-11165.

comme des phospholipides dans des tissus de souris⁷⁴ ou les glycanes dans des embryons de poissons-zèbres.⁷⁵

Le principal inconvénient de cette réaction lorsque l'on travaille en interaction avec le vivant, est lié à la toxicité du cuivre, notamment du cuivre(I).⁷⁶ Les cellules tolèrent en effet difficilement des concentrations de sels de cuivre(I) supérieures à 100 μM . Les développements des systèmes catalytiques se sont donc focalisés sur l'abaissement de la toxicité et accélération de la réaction par la formation de complexes robustes.⁷⁷ Deux stratégies ont été décrites dans la littérature.

La première méthode consiste à utiliser des ligands plus spécifiques du cuivre(I),⁷⁸ comme les ligands polytriazoles (Figure 53). Le TBTA a été développé en premier.⁷⁹ Par la suite, des analogues portant des groupements hydrosolubles ont été introduits. Ces ligands ont montré une toxicité réduite et d'excellentes performances pour la promotion de la CuAAC.

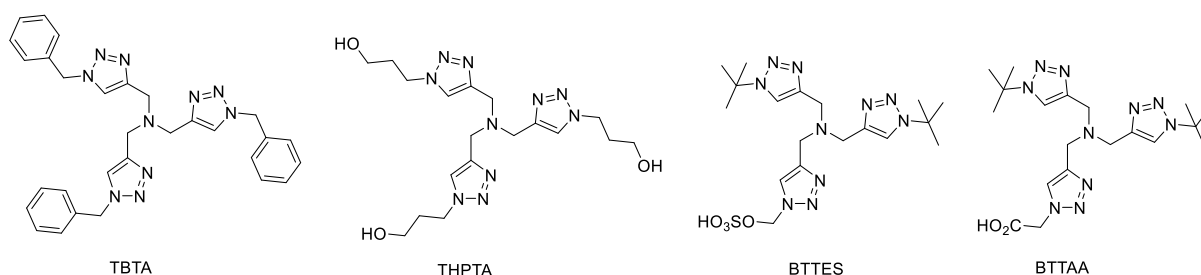


Figure 53. Exemples de ligands tris-triazoles développés pour la CuAAC.

La seconde stratégie consiste à introduire les unités chélatantes du cuivre sur le partenaire azoture (Figure 54).⁸⁰ De plus grands efforts de synthèse sont nécessaires, mais une augmentation nette de la vitesse de réaction est souvent observée, ce qui rend la réaction plus biocompatible. En effet, dans l'étude de Zhang,^{80c} la constante de vitesse mesurée pour la réaction click catalysée par l'azoture chélatant **8** ($121 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) est à comparer de celles de TBTA ($0,39 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), THPTA ($0,99 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et BTES ($1,39 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

⁷⁴ C. Y. Jao, M. Roth, R. Welti, A. Salic. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 15332-15337.

⁷⁵ D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 16893-16899.

⁷⁶ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974-6998.

⁷⁷ (a) H. Struthers, T. L. Mindt, R. Schibli. *Dalton T.* 2009, 39, 675-696; (b) E. Haldón, M. C. Nicasio, P. J. Pérez. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 9528-9550.

⁷⁸ V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 12705-12712.

⁷⁹ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin. *Org. Lett.* 2004, 6, 2853-2855.

⁸⁰ (a) C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 5852-5856; (b) V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 52, 5982-5986; (c) Y. Su, L. Li, H. Wang, X. Wang, Z. Zhang. *Chem. Commun.* 2016, 52, 2185-2188.

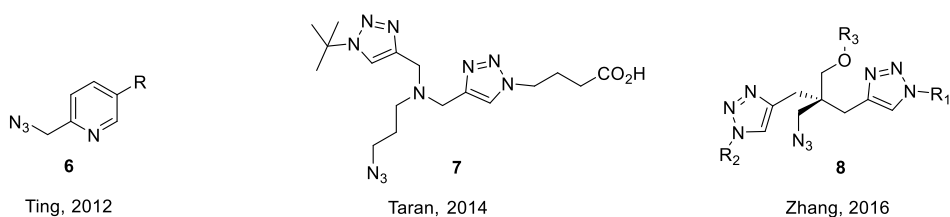


Figure 54. Azotures chélatants développés pour accélérer la CuAAC.

Dans des conditions optimisées, l'utilisation de ces ligands de Cu (I) permet d'effectuer la réaction à la surface des cellules.^{75,80a,81} Cependant réaliser la CuAAC à l'intérieur de cellules vivantes peut s'avérer plus complexe. Dans la littérature, peu d'exemples ont été décrits pour ces systèmes.^{80b,82} Un des travaux les plus remarquables est issu de notre service où l'équipe de F. Taran a développé la synthèse de nouveaux azotures chélatants pour améliorer la biocompatibilité de la CuAAC.^{80b} En utilisant l'azoture **7** (Figure 54), des réactions très rapides ont eu lieu en utilisant seulement 1 équivalent de cuivre dans des milieux complexe. La biocompatibilité de ce protocole a été démontrée par une réaction click qui a permis la localisation d'un composé bioactif dans des cellules (Figure 55).

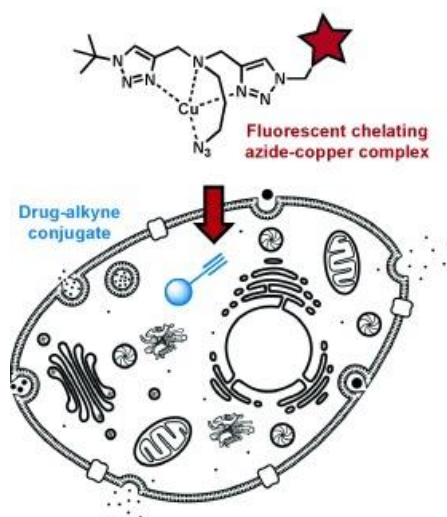


Figure 55. Réaction de CuAAC dans les cellules par le groupe de F. Taran en utilisant un azoture chélatant.

Des alternatives sans cuivre, impliquant des cyclooctynes, ont aussi été développées par Bertozzi et ses collègues.⁸³ Cependant, les dipolarophiles sont difficiles à synthétiser et manquent souvent de chimiosélectivité.

À l'heure actuelle, aucun de systèmes décrits ci-dessus n'est véritablement "parfait", surtout pour une utilisation efficace dans un milieu complexe comme le milieu intracellulaire. Dans l'optique d'améliorer les systèmes existants, le laboratoire a souhaité développer un catalyseur « biocompatible » *via* l'encapsulation de nanoparticules de cuivre(I) à l'intérieur des micelles PEGylées polydiacétyléniques. Aucun ligand n'est ici nécessaire, ce qui évite des étapes fastidieuses de synthèse organique. De plus,

⁸¹ (a) C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu and P. Wu. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50, 8051-8056; (b) H. Jiang, B. P. English, R. B. Hazan, P. Wu and B. Ovrin. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, 54, 1765-1769.

⁸² M. Yang, A. S. Jalloh, W. Wei, J. Zhao, P. Wu and P. R. Chen. *Nat. Commun.*, 2014, 5, 4981-7679.

⁸³ (a) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104, 16793; (b) J. C. Jewetta and C. R. Bertozzi. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1272.

la structuration nanoparticulaire du cuivre minimise la fuite du métal et l'encapsulation dans la micelle permet de biocompatibiliser le catalyseur.

III. Préparation du catalyseur

En 2017, un catalyseur micellaire encapsulant du cuivre a été élaboré au laboratoire.⁶⁸ Ce dernier est constitué de nanoparticules de cuivre (Cu_2O) entourées par des ligands lipophiles et d'une micelle polydiacétylénique pegylée qui vient encapsuler la nanoparticule métallique. Ce système catalytique ($\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$) avait été évalué pour la catalyse de la réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne, dans l'eau, à température ambiante et sous air (Figure 56). Dans ces conditions, le catalyseur opère avec une faible charge catalytique (0,35 mol% en Cu) et les triazoles sont, dans la plupart du temps, obtenus avec un rendement quantitatif après 24 h. De plus, le catalyseur peut être récupéré et recyclé pour un nouveau cycle catalytique. Outre l'encapsulation du cuivre, la micelle joue également ici un rôle de nano-réacteur dans lequel se concentrent les réactifs au voisinage du site actif catalytique ce qui permet la dispersion en milieu aqueux des différents composants de la réaction.

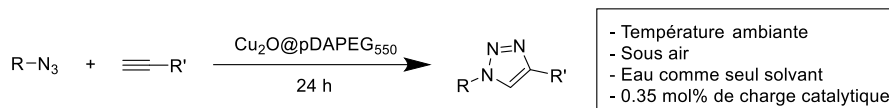


Figure 56. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le système colloïdal $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$.

Compte tenu de la biocompatibilité des micelles PEGylées polydiacétyléniques en milieu biologique et la stabilité renforcée des micelles grâce au réseau polydiacétylénique, ce catalyseur sera évalué dans le cadre de ce travail de thèse, pour la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen *in vitro*. Nous avons en premier lieu préparé un nouveau lot de $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ (Figure 57).

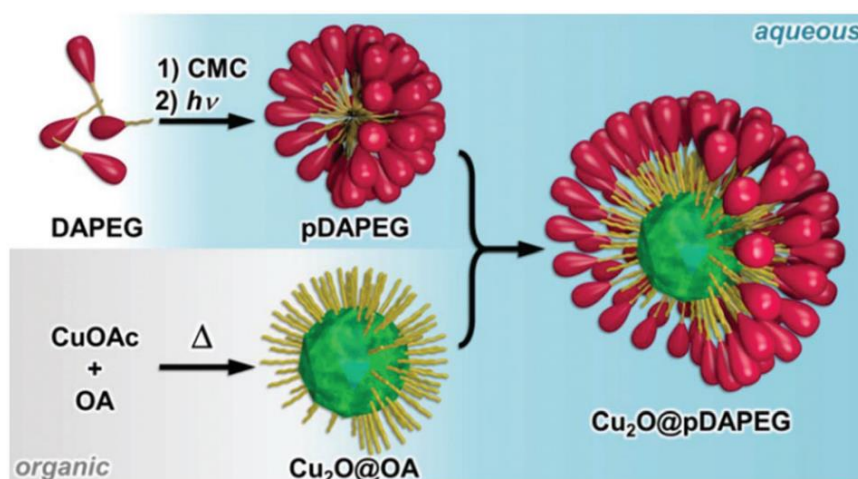


Figure 57. Assemblage du catalyseur $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$.

1. Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde cuivreux (Cu_2O NP)

Des nanoparticules d'oxyde cuivreux (Cu_2O) stabilisées par l'acide oléique ont été synthétisées conformément au mode opératoire décrit par O'Brien et coll.⁸⁴ Brièvement, l'acétate de cuivre(I), l'acide oléique (OA) et la trioctylamine sont chauffés à 180 °C, puis à 270 °C. Les nanoparticules produites sont ensuite précipitées dans l'éthanol et redispersées dans l'hexane ce qui conduit à un changement de couleur de brun rougeâtre à vert foncé.

Les nanoparticules de Cu_2O produites ont été analysées par microscopie électronique à transmission (MET) qui montre des objets de forme sphéroïdale (Figure 58) avec un diamètre moyen de $8,6 \pm 1,8$ nm. La nature chimique du cuivre encapsulé a été analysée par spectroscopie photoélectronique X (XPS) qui nous indique que Cu_2O est l'espèce majoritaire (deux tiers), avec cependant un tiers de CuO .

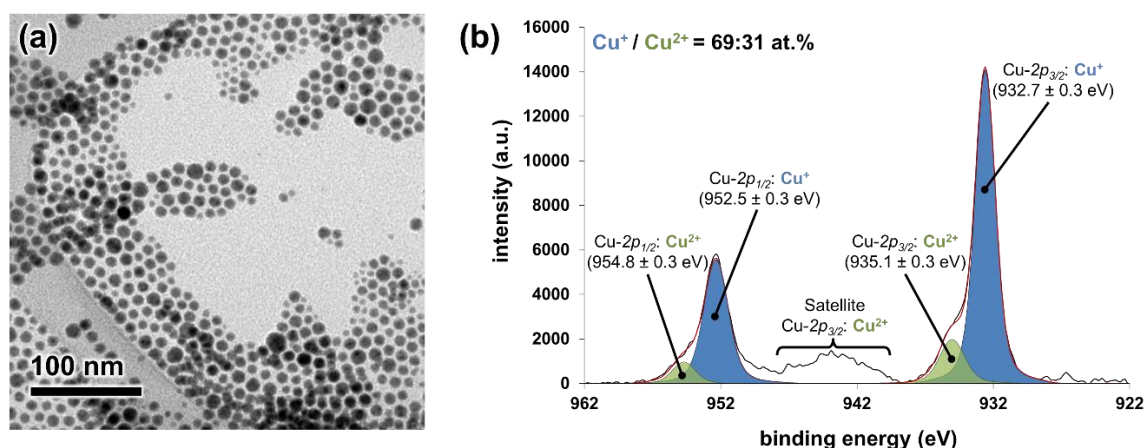


Figure 58. (a) Image MET des nanoparticules de Cu_2O synthétisées et (b) spectre XPS des nanoparticules de cuivre.

2. Formation et caractérisation des micelles

a. Synthèse de l'amphiphile DAPEG₅₅₀

La synthèse de l'amphiphile DAPEG₅₅₀, précurseur de la micelle, commence par la réduction de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque en alcool par LiAlH_4 . L'alcool **II.2** obtenu est ensuite tosylé en présence de triéthylamine et de DMAP. Enfin, une substitution nucléophile de ce tosylate par l'alcoolate dérivé du PEG₅₅₀-OMe commercial permet d'obtenir le composé amphiphile souhaité **III.1** (Figure 59).

⁸⁴ M. Yin, C.-K. Wu, Y. Lou, C. Burda, J. T. Koberstein, Y. Zhu and S. O'Brien. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 9506.

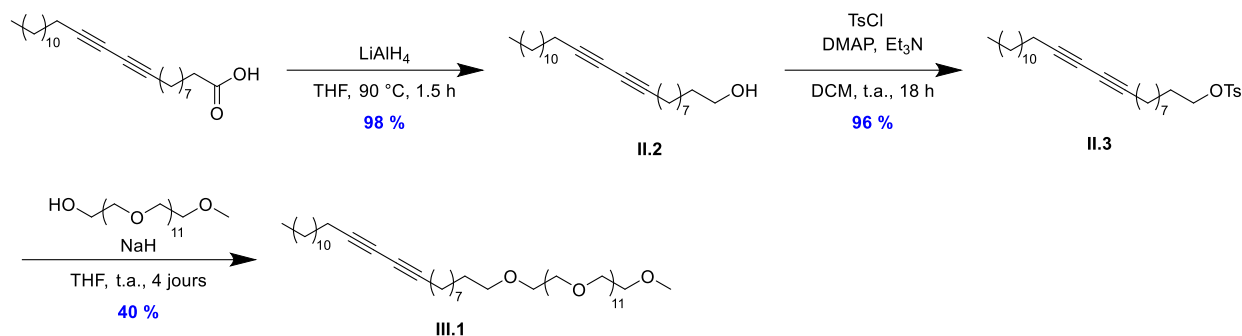


Figure 59. Synthèse de l'amphiphile DAPEG₅₅₀ III.1.

b. Formation et caractérisation des micelles polymérisées (pDAPEG₅₅₀)

Pour réaliser l'assemblage des micelles à partir de III.1, une solution à 10 mg mL⁻¹ d'amphiphile dans de l'eau est traitée aux ultrasons pendant 10 min. Les micelles formées sont ensuite polymérisées sous UV à 254 nm pendant 4 h conduisant à la formation d'un réseau conjugué ène-yne au cœur de chaque micelle. Enfin, les micelles sont dialysées 24 h dans l'eau déminéralisée pour ôter les monomères non polymérisés. Les micelles présentent un diamètre hydrodynamique moyen d'environ 9 nm, tel que déterminé par les mesures de DLS.

3. Assemblage du catalyseur micellaire

Les nanoparticules de Cu_2O dans l'hexane sont ensuite additionnées à des micelles de pDAPEG₅₅₀ dans de l'eau et le mélange biphasique est traité au bras à ultrasons. Cette étape conduit à : i) une évaporation lente de l'hexane, ii) l'encapsulation des nanoparticules de cuivre recouvertes de ligands lipophiles dans le cœur des micelles polymérisées, et iii) au transfert des nanoparticules de Cu_2O de la phase organique vers la phase aqueuse. Après sonication, un colloïde vert foncé limpide ($\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$) est obtenu. Les assemblages catalytiques encapsulés peuvent également être visualisés par MET (Figure 60).

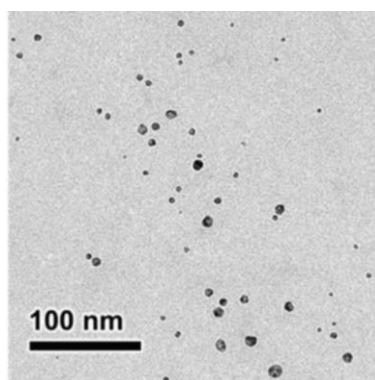


Figure 60. Image MET des particules de Cu_2O encapsulées dans des micelles pDAPEG₅₅₀.

La concentration en cuivre de la suspension aqueuse a été mesurée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif après dissolution acide des échantillons (ICP-MS, $[\text{Cu}] = 6,4 \text{ mM}$).

Les nanoparticules de Cu₂O encapsulées dans des micelles Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ ont ensuite été évaluées en ce qui concerne leurs propriétés catalytiques, plus spécifiquement leur capacité à promouvoir la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen en milieu aqueux, à température ambiante.

IV. Évaluation de l'activité catalytique du catalyseur *in vitro*

Nous avons ainsi envisagé d'utiliser notre catalyseur pour réaliser la réaction de CuAAC dans les cellules. L'accomplissement d'une telle tâche serait gratifiant dans la mesure où les sels de cuivre sont connus pour leur cytotoxicité. L'utilisation de micelles pour l'encapsulation de cuivre sous forme nanoparticulaire confère une biocompatibilité accrue de par la présence de la couche périphérique de PEG qui isole le cuivre du milieu biologique. L'approche proposée pourrait offrir la possibilité de générer *in situ* des composés bioactifs par couplage de deux partenaires inertes. Ces approches de type « promédicaments » autorisent la synthèse *in situ* de molécules actives directement au contact de leurs cibles ce qui renforce leur action et minimise les effets secondaires potentiels.

Par exemple, Qu et collaborateurs⁸⁵ ont développé un catalyseur hétérogène à base de MOF (Metal Organic Framework) capable de promouvoir l'assemblage d'un composé à activité anti-tumorale (Figure 61). La molécule assemblée *in situ* présente même un effet anti-tumoral plus élevé *in vivo* (souris) que le médicament pré-synthétisé.



Figure 61. La synthèse d'un médicament *via* la CuAAC dans les cellules réalisée par le groupe de Qu.

Hormis ce travail, il existe assez peu d'exemples sur ce type d'application.⁸⁶ Ainsi, le développement de nouveaux systèmes catalytiques pour la CuAAC dans les cellules reste toujours souhaitable.

1. Stratégie

⁸⁵ F. Wang, Y. Zhang, Z. Liu, Z. Du, L. Zhang, J. Ren, X. Qu. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 6987.

⁸⁶ (a) J. Clavadetscher, S. Hoffmann, A. Lilienkampf, L. Mackay, R. M. Yusop, S. A. Rider, J. J. Mullins, M. Bradley. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 15662-15666; (b) J. Clavadetscher, E. Indrigo, S. V. Chankeshwara, A. Lilienkampf, M. Bradley. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 6864-6868; (c) Y. Bai, X. Feng, H. Xing, Y. Xu, B. K. Kim, N. Baig, T. Zhou, A. A. Gewirth, Y. Lu, E. Oldfield, S. C. Zimmerman. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 11077-11080.

L'activité catalytique de $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ *in vitro* a été étudiée en utilisant la 3-azido-7-hydroxycoumarine **III.2** et le phénylacétylène comme substrats modèles. Le choix de l'azido coumarine **III.2** a été dicté par le fait que ce composé est, dans son état non-clické, peu fluorescent de par la présence du groupement azoture riche en électrons, alors qu'il devient fortement fluorescent quand le groupement azido est engagé dans un lien triazole (composé **III.3**, Figure 62).⁸⁷ La sonde pro-fluorescente va ainsi nous permettre d'observer l'avancement de la réaction par la simple mesure de la fluorescence associée au produit **III.3**.

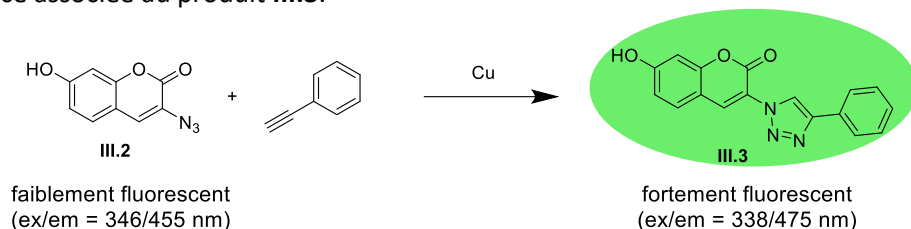


Figure 62. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre l'azoture **III.2** et le phénylacétylène pour produire le composé fluorescent **III.3**.

2. Préparation des réactifs

a. Synthèse organique des composés **III.2** et **III.3**

Le composé **III.2** a été synthétisé selon le protocole décrit dans la publication de Wang (Figure 63).⁸⁷ Le 2,4-dihydroxy benzaldéhyde et la *N*-acétylglycine sont chauffés au reflux dans l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre. L'intermédiaire obtenu est ensuite chauffé au reflux dans un mélange HCl/éthanol (2:1) pendant 1 h. Puis, un traitement avec NaNO_2 et NaN_3 permet d'obtenir le composé **III.2** avec un rendement global de 54 %.

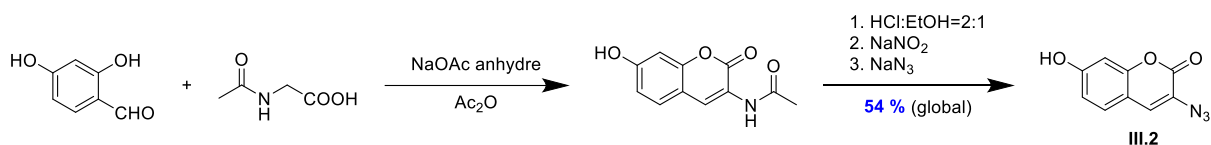


Figure 63. Synthèse du composé **III.2**.

Le produit triazole **III.3** authentique a été synthétisé selon une procédure classique de réaction click catalysée par CuSO_4 /ascorbate de sodium à partir du composé **III.2** et du phénylacétylène (Figure 64).

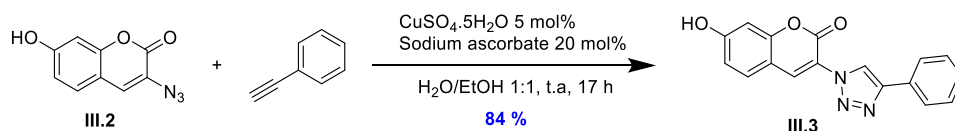


Figure 64. Synthèse du composé **III.3**.

En vue d'une utilisation ultérieure *in vitro* et afin de caractériser les différents partenaires de la réaction de click et le produit formé, les composés **III.3**, **III.2** et le phénylacétylène ont été encapsulés dans les micelles $p\text{DAPEG}_{550}$, utilisées pour le catalyseur $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ (Figure 65).

⁸⁷ K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang. Org. Lett. 2004, 6, 4603-4606.

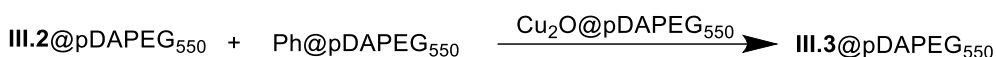


Figure 65. Catalyse micellaire *in vitro*.

Dans des études antérieures, la capacité de nos micelles à entrer dans les cellules par endocytose a été démontrée,⁸⁸ et il est raisonnable d'envisager que les composés encapsulés dans le cœur hydrophobe des micelles seront également internalisés. Cette stratégie garantit que le devenir intracellulaire des différents composés (catalyseur, alcyne, azoture) sera sensiblement le même, permettant leur rencontre et favorisant la réaction de cycloaddition dans la cellule.

b. Protocole d'encapsulation des composés d'intérêt dans les micelles

L'encapsulation du composé **III.2**, du phénylacétylène et du composé **III.3** commence par la solubilisation de ces composés dans 100 μL d'acétone. Les solutions de composé **III.2** (2 mg dans 100 μL), de phénylacétylène (10 mg dans 100 μL) et de produit triazole **III.3** (1 mg dans 100 μL) sont ensuite ajoutées à 1 mL de la solution aqueuse de micelles pDAPEG₅₅₀ (10 mg mL⁻¹) et le mélange est traité au bras à ultrasons pendant 30 minutes (3 $\times$ 10 min). Cette étape conduit à l'encapsulation de ces composés dans le cœur des micelles polymérisées. Après sonication, l'acétone s'est totalement évaporée et une étape de filtration est réalisée pour éliminer la fraction non encapsulée des produits.

c. Détermination du taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation des composés **III.2**, **III.3** et phénylacétylène dans les micelles ont été déterminés par spectroscopie d'absorption en utilisant des courbes d'étalonnage réalisées au départ des composés authentiques à différentes concentrations dans le méthanol (Figure 66).

⁸⁸ E. Gravel, B. Thézé, I. Jacques, P. Anilkumar, K. Gombert, F. Ducongé and E. Doris. *Nanoscale*, 2013, 5, 1955.

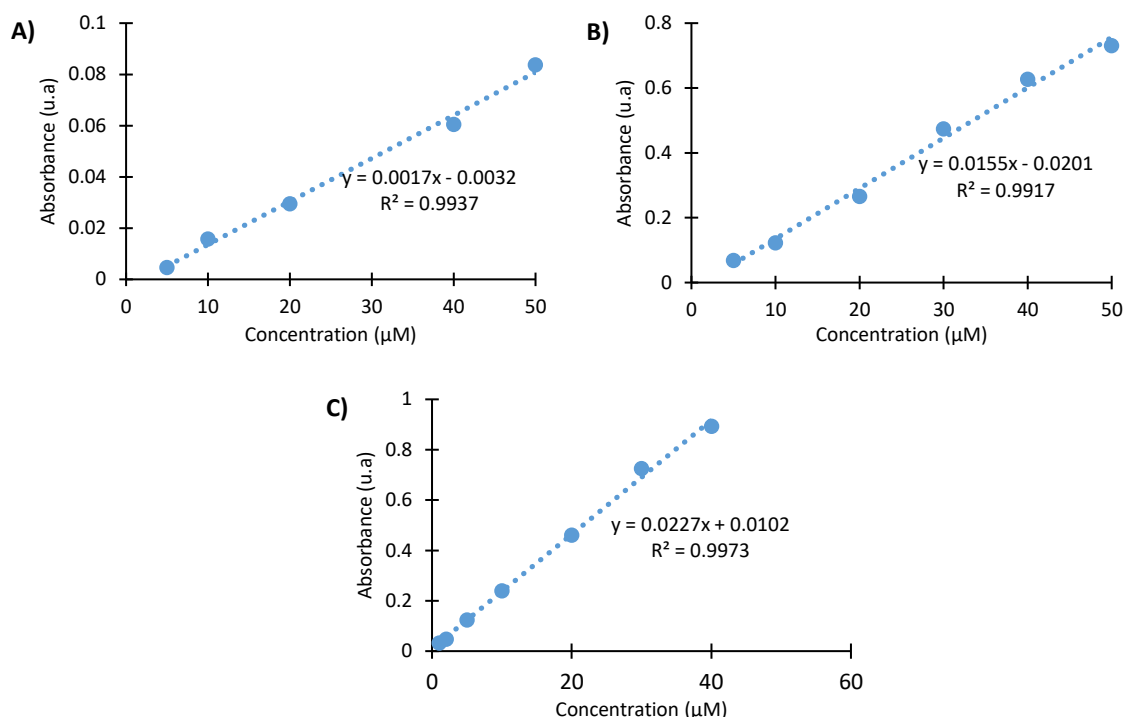


Figure 66. Courbes d'étalonnage de : A) phénylacétylène, B) composé **III.2** et C) composé **III.3** dans méthanol.

À partir de ces courbes, il est possible de déterminer la concentration en molécules encapsulées dans les micelles. Pour cela, les micelles contenant les composés **III.2**, **III.3** et le phénylacétylène sont reprises dans un volume connu de méthanol. En présence d'une grande quantité de solvant organique, les micelles sont déstabilisées et leur contenu devient soluble dans le milieu dispersant. Les composés d'intérêt vont donc se retrouver en solution dans le méthanol. L'intensité d'absorption de ces solutions dans le méthanol a été mesurée et comparée à la courbe d'étalonnage pour calculer le taux d'encapsulation. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Concentration des composés encapsulés.

Nom d'échantillon	Composé encapsulé	Concentration en micelle (mg mL ⁻¹)	Concentration en composé encapsulé (mM)
Ph@pDAPEG ₅₅₀	Phénylacétylène	10	1,34
III.2 @pDAPEG ₅₅₀	III.2	10	3,72
III.3 @pDAPEG ₅₅₀	III.3	10	0,132
Cu ₂ O@pDAPEG ₅₅₀	Cu ₂ O	10	6,4 (en Cu) ^a

^a La concentration de Cu (I) dans le catalyseur a été dosée par ICP-MS.

3. Contrôle de l'intensité de fluorescence des échantillons

La fluorescence des micelles vides ainsi que des micelles contenant des composés encapsulés a été enregistrée à la même concentration en micelle à savoir 100 μg mL⁻¹, ce qui correspond à 13,4 μM de phénylacétylène encapsulé, 37,2 μM du composé **III.2** encapsulé et 1,32 μM du composé **III.3** encapsulé (Figure 67). Tous les échantillons sont excités à 380 nm, qui est la longueur d'onde d'excitation utilisée dans les expériences biologiques.

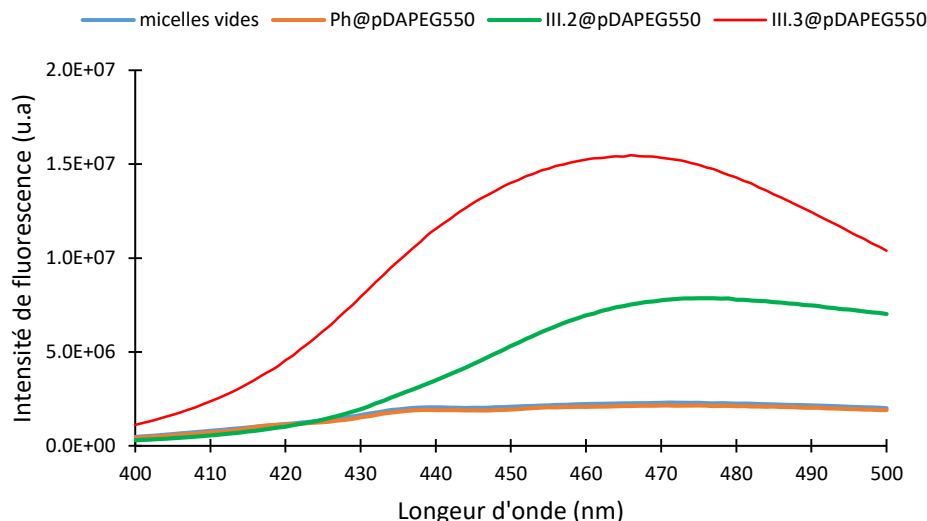


Figure 67. Spectres de fluorescence de la micelle vide et des micelles contenant des composés encapsulés ([micelles] = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Les micelles vides ainsi que le phénylacétylène encapsulé ne présentent aucune fluorescence détectable. Le composé **III.3**@pDAPEG₅₅₀ est environ 2 fois plus fluorescent que le composé **III.2**@pDAPEG₅₅₀ à la même concentration en micelles. Cependant, il faut garder à l'esprit que le composé **III.3** est 28 fois moins concentré que le composé **III.2** pour une même concentration en micelles. Il est donc intrinsèquement beaucoup plus fluorescent que son homologue non clické.

Ces résultats montrent qu'un suivi des changements d'intensité de fluorescence devrait permettre de confirmer l'activité du catalyseur dans les cellules.

4. Évaluation préliminaire de la réaction de cycloaddition

D'abord, nous avons voulu vérifier si le produit triazole **III.3** pouvait être formé en utilisant notre catalyseur à haute dilution. Pour ce faire, 100 μM du composé **III.2** sont mis à réagir avec 100 μM phénylacétylène dans l'eau à 37 °C. La concentration du catalyseur est limitée à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en micelles, ce qui correspond à 64 μM de Cu(I). La formation du produit **III.3** est suivie par UPLC (Figure 68) et par spectroscopie de fluorescence (Figure 69).

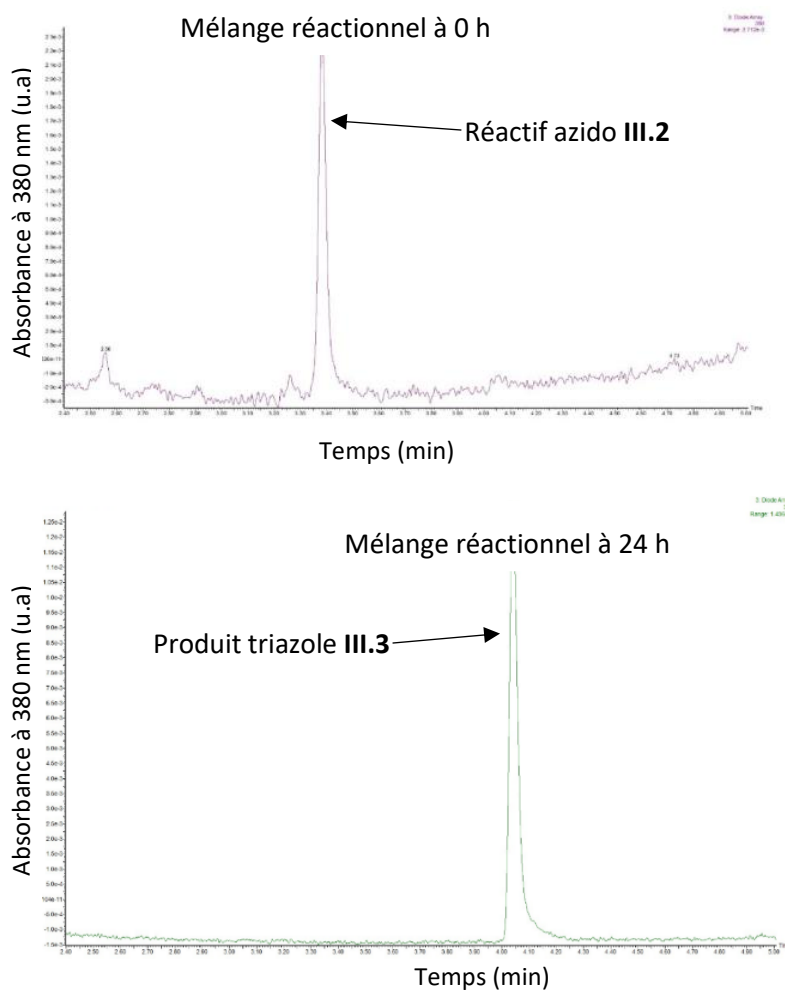


Figure 68. Profil UPLC de la réaction CuAAC à haute dilution catalysée par Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ à 0 h et 24 h. Temps de rétention : t_R (composé **III.2**) = 3,38 min, t_R (composé **III.3**) = 4,04 min.

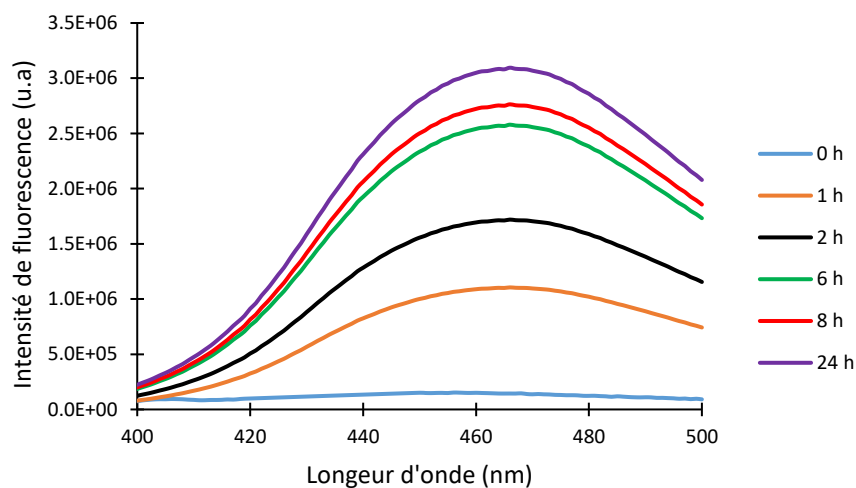


Figure 69. Spectre de fluorescence de la réaction de cycloaddition à haute dilution catalysée par Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ en fonction du temps.

L'UPLC montre que seul le produit **III.3** est formé et qu'à 24 h la conversion est totale. Un suivi de l'intensité de fluorescence au cours du temps montre une augmentation progressive qui confirme la formation du produit **III.3**. Notre catalyseur est donc efficace même à haute dilution.

Nous avons ensuite évalué l'activité du catalyseur $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ sur des réactifs encapsulés. La 3-azido-7-hydroxycoumarine encapsulée ($\text{III.2}@p\text{DAPEG}_{550}$) a été mise à réagir avec le phénylacétylène encapsulé ($\text{Ph}@p\text{DAPEG}_{550}$) en présence du catalyseur dans l'eau à 37 °C. La concentration totale utilisée en micelles est arbitrairement limitée à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ qui est la même concentration que celle qui sera utilisée dans les tests biologiques. Le rapport entre $\text{Ph}@p\text{DAPEG}_{550}$ et $\text{III.2}@p\text{DAPEG}_{550}$ est environ 1:1. Les paramètres de la réaction sont résumés dans le Tableau 5. Le suivi de la réaction a été réalisé par mesure de l'intensité de fluorescence du produit de click III.3 à différent temps (Figure 70). Nous observons au cours du temps une augmentation de l'intensité de fluorescence avec une exaltation d'un facteur 10 après 24 h.

Tableau 5. Les volumes des échantillons utilisés pour la réaction de cycloaddition en utilisant les réactifs encapsulés dans les micelles.

	$\text{Ph}@p\text{DAPEG}_{550}$	$\text{III.2}@p\text{DAPEG}_{550}$	$\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$	Eau
Volume utilisé (μL)	2,8	1	1,2	495
Concentration finale en composé encapsulé (μM)	7,5	7,4	15,4	-

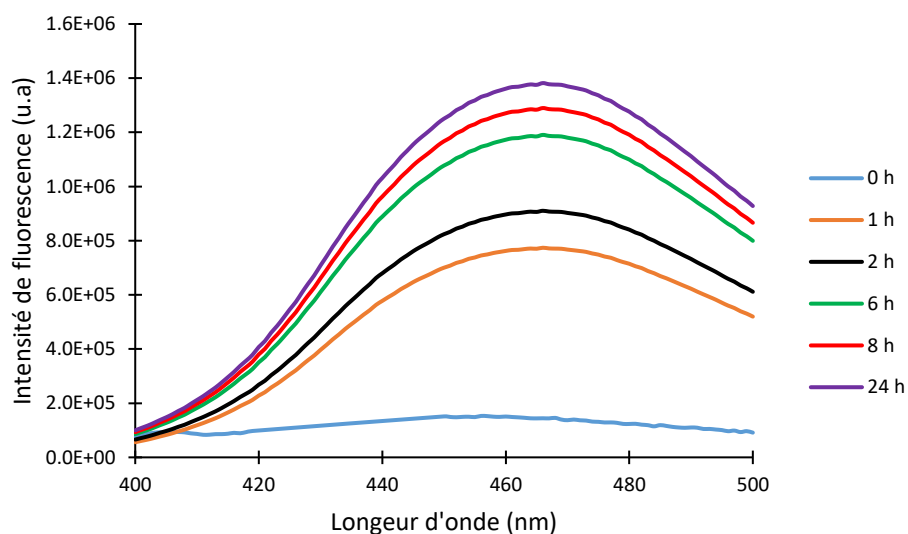


Figure 70. Spectre de fluorescence de la réaction de cycloaddition en utilisant les réactifs encapsulés en fonction du temps.

Ces résultats positifs obtenus en « pilulier » nous ont encouragés à évaluer l'activité catalytique de notre catalyseur en interaction avec des cellules pour réaliser une réaction de cycloaddition *in vitro*.

5. Évaluation de l'activité catalytique dans les cellules

Les expériences de biologie impliquant des tests cellulaires ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Guillaume Pinna du Service de Biologie Intégrative et de Génétique Moléculaire du CEA.

L'activité catalytique *in vitro* de $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ a été évaluée dans les cellules HeLa. Pour ce faire, les cellules ont été incubées tout d'abord avec le catalyseur ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$ en micelles, $19,2 \mu\text{M Cu}$)

pendant 3 h. Le milieu est alors lavé et les réactifs encapsulés dans les micelles (**III.2** et phénylacétylène) sont additionnés : $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ph@pDAPEG₅₅₀ ($6,7 \mu\text{M}$ phénylacétylène) et $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ **III.2**@pDAPEG₅₅₀ ($7,4 \mu\text{M}$ coumarine). Le rapport molaire entre le phénylacétylène et la coumarine est environ 1:1,1. Les mesures de fluorescence ont été réalisées, dans une première série d'expériences, 3 h après l'ajout des réactifs.

Ces expériences seront comparées à des expériences contrôles impliquant des cellules non traitées, des cellules traitées avec les micelles vides, et celles traitées avec les réactifs encapsulés individuellement (**III.2**, phénylacétylène, Cu). La concentration totale en micelles utilisées pour toutes les manipulations a été limitée à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, c'est-à-dire que les cellules seront incubées avec soit : Ph@pDAPEG₅₅₀ à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ qui correspondent à $13,4 \mu\text{M}$ de phénylacétylène ; $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de **III.2**@pDAPEG₅₅₀ ($37,2 \mu\text{M}$ d'azido coumarine) et $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ ($64 \mu\text{M}$ de cuivre). A ces concentrations, les micelles ne présentent aucune toxicité pour les cellules. Les résultats obtenus à 3 h sont présentés en Figure 71.

Comme attendu, nous n'observons pas de fluorescence détectable pour i) les cellules seules (non traitées), ii) les cellules incubées avec la micelle vide, et iii) celles incubées avec le cuivre. Par contre, nous détectons un signal associé à la micelle incorporant la 3-azido-7-hydroxycoumarine. Ce résultat était attendu dans la mesure où ce composé présente une fluorescence endogène qui est classiquement exaltée post-conjugaison avec le motif azido. De façon plus surprenante, nous observons également un signal modéré de fluorescence pour le phénylacétylène encapsulé. L'origine de ce signal reste floue dans la mesure où nous n'avions pas détecté, au cours des expériences préliminaires (voir Figure 67), d'émission propre pour ce composé. Une explication probable à ce phénomène réside dans la possibilité d'intercalation du phénylacétylène dans les sillons de l'ADN de la cellule. En effet, pour certains intercalants un phénomène similaire a été observé. Par exemple, le bromure d'éthidium présente une fluorescence exacerbée d'un facteur 20 lors de sa liaison à l'ADN.⁸⁹

Lorsque les partenaires azido-coumarine et phénylacétylène sont incubés avec des cellules HeLa prétraitées avec Cu₂O@pDAPEG₅₅₀, nous observons une amplification marquée du signal de fluorescence. Ce résultat suggère que la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée a effectivement eue lieu dans le compartiment intracellulaire puisque le produit de la réaction émet classiquement la plus forte fluorescence.

⁸⁹ S. P. Moore and B. M. Sutherland. Anal. Biochem., 144, 15-19 (1985).

Cellules Hela (3 h post-transfection, 10 X grossissement)

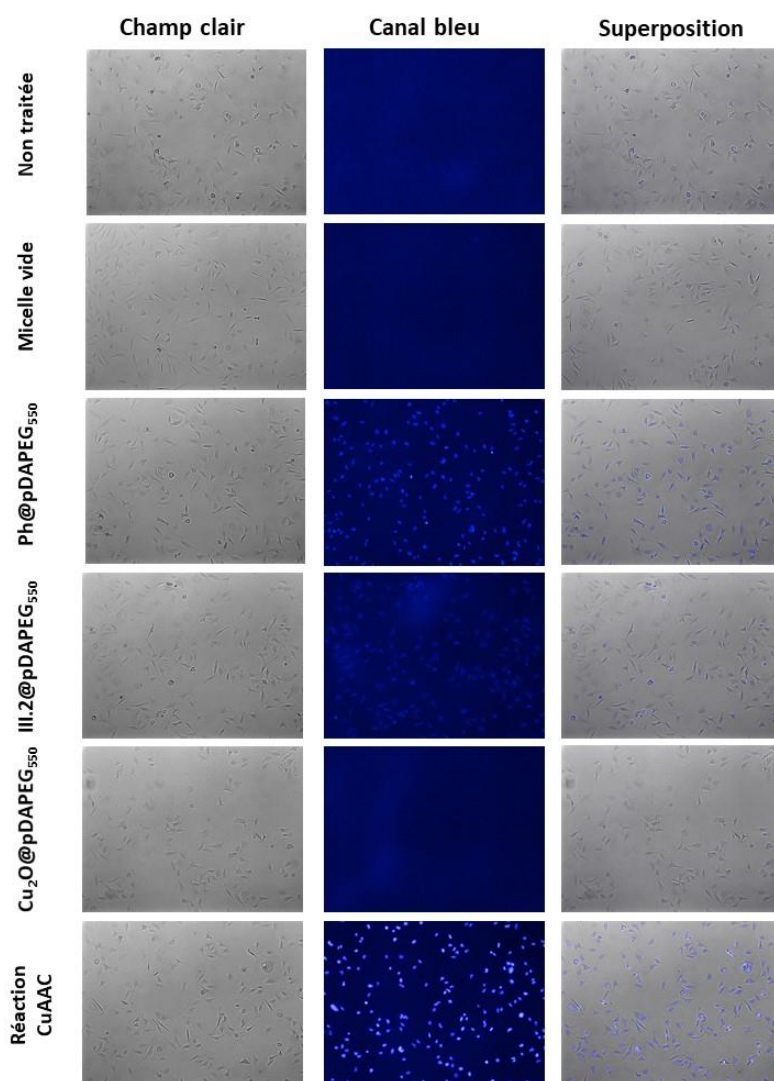


Figure 71. Imagerie par microscopie des cellules HeLa 3 h post incubation. Cellules i) non traitées, ii) traitées avec les micelles vides, iii) traitées avec Ph@pDAPEG₅₅₀, iv) traitées avec **III.2**@pDAPEG₅₅₀, v) traitées avec Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ et, vi) traitées avec le mélange Cu₂O@pDAPEG₅₅₀/Ph@pDAPEG₅₅₀/**III.2**@pDAPEG₅₅₀. De gauche à droite, première colonne : image champ clair, deuxième colonne : canal bleu (émission du produit **III.3**), troisième colonne : superposition des deux images.

Afin de confirmer ces résultats, l'expérience a été poursuivie pendant 24 h, c'est-à-dire que les cellules HeLa sont incubées dans un premier temps avec Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ durant 3 h avant l'ajout des réactifs encapsulés **III.2**@pDAPEG₅₅₀ et Ph@pDAPEG₅₅₀. La lecture de fluorescence se fait 24 h après l'addition des réactifs (Figure 72).

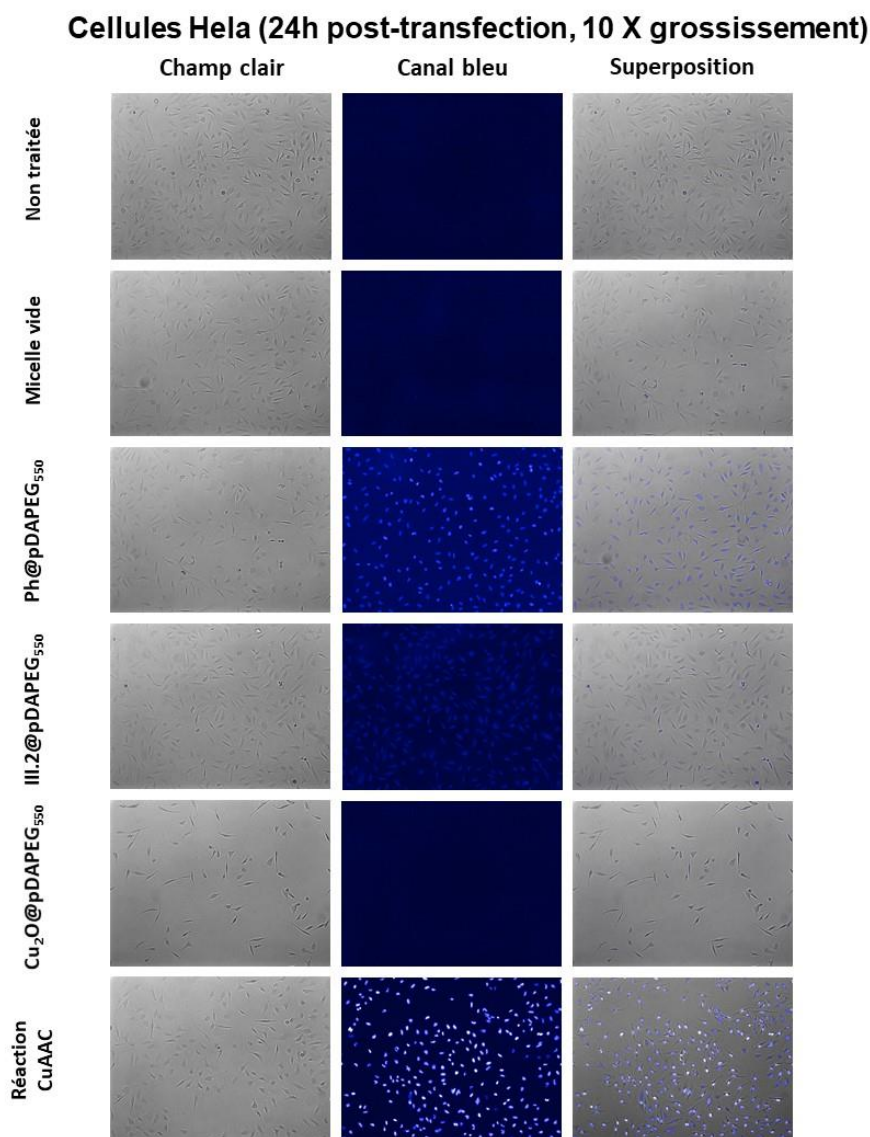


Figure 72. Imagerie par microscopie des cellules HeLa 24 h post incubation. Cellules i) non traitées, ii) traitées avec les micelles vides, iii) traitées avec Ph@pDAPEG₅₅₀, iv) traitées avec **III.2**@pDAPEG₅₅₀, v) traitées avec Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ et, vi) traitées avec le mélange Cu₂O@pDAPEG₅₅₀/Ph@pDAPEG₅₅₀/**III.2**@pDAPEG₅₅₀. De gauche à droite, première colonne : image champ clair, deuxième colonne : canal bleu (émission du produit **III.3**), troisième colonne : superposition des deux images.

Nous observons pour cette série d'expériences des résultats comparables à ceux obtenus à 3 h d'incubation à la différence près que les intensités de fluorescence mesurées sont plus fortes pour l'expérience qui implique le phénylacétylène encapsulé seul et celle qui implique la réaction des trois réactifs devant conduire au produit « clické » **III.3**.

En effet, une quantification de la fluorescence à 3 h et 24 h (Figure 73) indique que les micelles vides et celles encapsulant les composés **III.2** et le cuivre présentent une fluorescence qui est proche du bruit de fond, par contre, le phénylacétylène encapsulé conduit à une fluorescence trois fois plus importante à 24 h (par rapport à 3 h). Quant à la réaction click proprement dite, nous observons également une amplification conséquente du signal de fluorescence d'un facteur qui est également de 3. Si l'on considère les concentrations initialement introduites en phénylacétylène dans chacune des deux expériences, à savoir 13,4 μM pour le contrôle phénylacétylène seul, et 6,7 μM pour la réaction

de click proprement dite, la contribution du phénylacétylène à la fluorescence mesurée dans la réaction click ne peut à elle seule expliquer l'augmentation de l'intensité du signal mesuré dans la dernière colonne. Si l'on tient compte des concentrations relatives en réactifs, nous pouvons estimer qu'il y a une exaltation du signal de fluorescence d'un facteur 6 environ. Cette observation conforte la formation *in situ* du composé **III.3** dans les cellules.

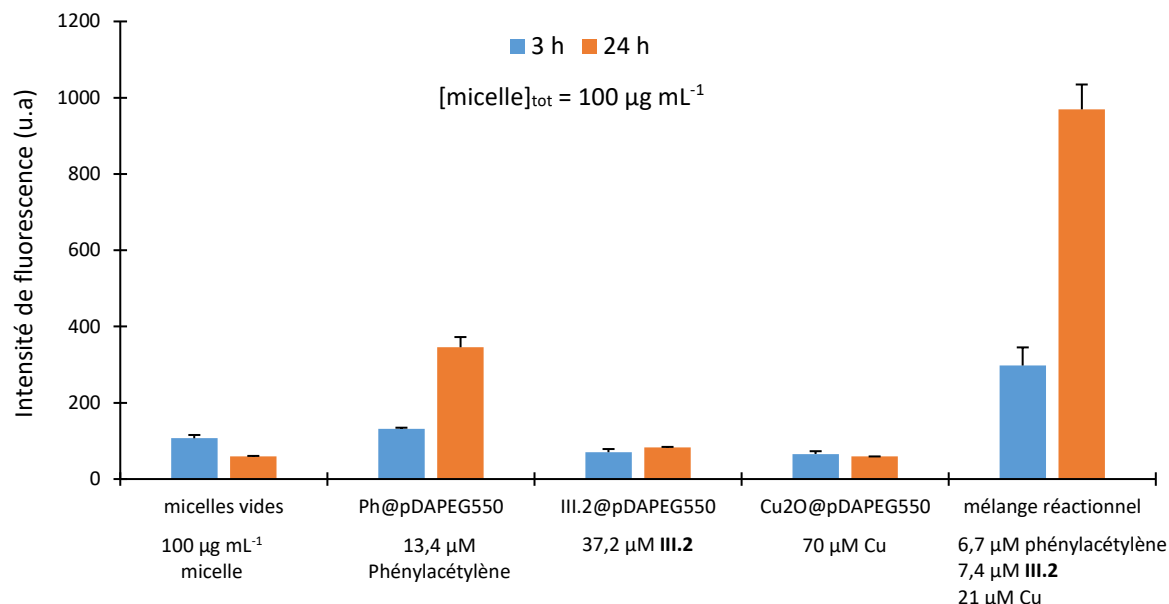


Figure 73. Quantification de la fluorescence après 3 h et 24 h d'incubation des cellules HeLa non traitées et des cellules traitées avec les micelles vides, Ph@pDAPEG₅₅₀, III.2@pDAPEG₅₅₀, Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ et mélange Cu₂O@pDAPEG₅₅₀/Ph@pDAPEG₅₅₀/III.2@pDAPEG₅₅₀ (réaction CuAAC).

Ces résultats préliminaires sont dans l'ensemble prometteurs mais demandent à être étudiés plus dans le détail. Ainsi, la fluorescence parasite observée avec le phénylacétylène pourrait être contournée en utilisant un partenaire dipolarophile non aromatique. Une optimisation peut également être envisagée en jouant sur la séquence d'addition des réactifs ou encore sur la nature chimique des micelles qui prennent en charge ces réactifs. De même, la présence dans le compartiment intra-cytoplasmique du produit clické formé devra être confirmée par microscopie confocale.

V. Conclusion

Un nouveau catalyseur micellaire a été mis au point par encapsulation de nanoparticules de cuivre dans des micelles de polydiacétylène. Le catalyseur colloïdal a été valorisé dans la réaction de cycloaddition de Huisgen pour laquelle les micelles jouent également le rôle de nano-réacteurs pour la prise en charge des réactifs, leur concentration, et leur dispersion aqueuse. Ce catalyseur a été évalué favorablement sur une lignée cellulaire HeLa grâce à l'effet biocompatibilisant des micelles qui autorise des transformations chimiques dans le compartiment cellulaire. Cependant, un problème de fluorescence résiduelle persiste et nécessite des séquences d'optimisation pour affiner le système développé. Le catalyseur Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ offre donc des perspectives prometteuses pour réaliser de la chimie en interaction avec le vivant et pour la génération *in situ* des molécules actives.

**CHAPITRE IV : ASSEMBLAGES
SUPRAMOLÉCULAIRES POUR LA CATALYSE
ÉNANTIOSÉLECTIVE DE RÉACTIONS
D'ALDOLISATION DANS L'EAU**

I. Réactions d'aldolisation asymétriques directes en milieu aqueux

Découverte au début des années 1970, la réaction de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert (Figure 74), réaction d'aldolisation intramoléculaire catalysée par la proline, représente non seulement la première réaction d'aldolisation asymétrique mise au point par les chimistes, mais également la première transformation organocatalytique hautement énantiosélective.⁹⁰

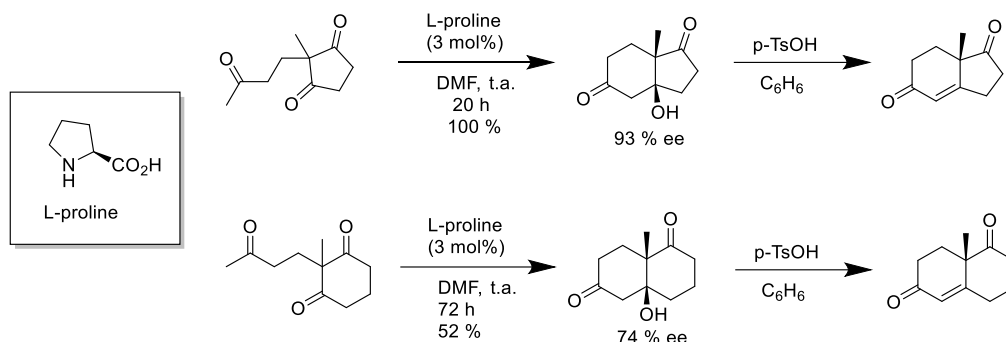


Figure 74. Réactions de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert.

Après cette découverte initiale, il n'y a pas eu de d'avancées fortes jusqu'à la publication des travaux de List, Lerner et Barbas sur la réaction d'aldolisation intramoléculaire et énantiosélective catalysée par la proline (Figure 75).⁹¹ Les auteurs ont décrit la réaction entre l'acétone (en excès) et des aldéhydes aromatiques et ramifiés en position α . Cette réaction se déroule en présence d'une quantité sous-stœchiométrique de L-proline (typiquement 20–30 % en moles) dans du DMSO pour donner les aldols correspondants avec de bons rendements et de bonnes énantiosélectivités.

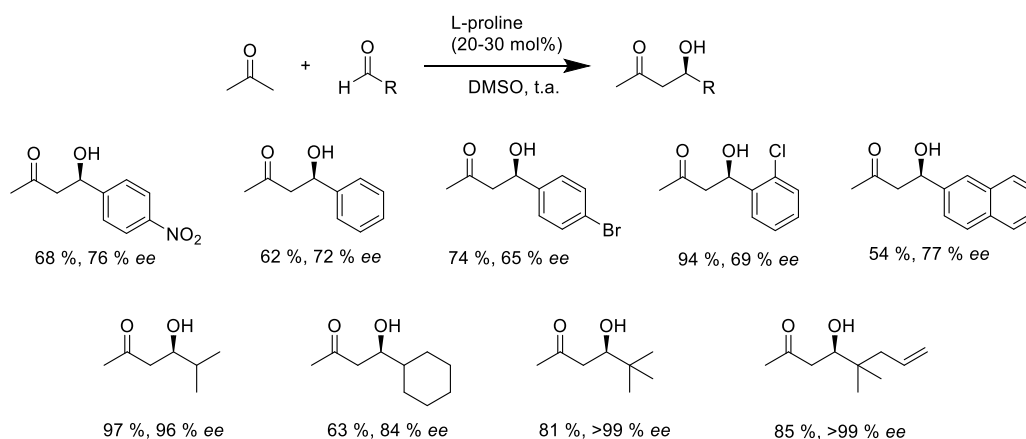


Figure 75. Les premières réactions d'aldolisation directes intermoléculaires asymétriques catalysées par la proline.

⁹⁰ (a) Z. G. Hajos and D. R. Parrish. *J. Org. Chem.*, 1974, 39, 1615-1621; (b) U. Eder, G. Sauer and R. Weichert. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1971, 10, 496-497.

⁹¹ B. List, R. A. Lerner and C. F. Barbas. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 2395-2396.

Plusieurs autres dérivés d'acides aminés, y compris des acides aminés primaires, secondaires, cycliques et acycliques, ont été criblés en tant que catalyseurs. La proline, cependant, s'est avérée être le catalyseur le plus efficace pour cette transformation.

Depuis ces travaux pionniers, des recherches approfondies ont été menées par plusieurs groupes pour élucider le mécanisme de la réaction d'aldolisation catalysée par la proline. Un mécanisme passant par la formation d'une énamine intermédiaire **III** a été initialement proposé par List (Figure 76).⁹¹ Selon ce mécanisme, la fonction acide carboxylique de la proline agit comme un co-catalyseur acide de Brønsted qui va protoner le groupement carbonyle de l'aldéhyde au moment de la mise en place de l'état de transition **IV**. Ici, la proline agit non seulement comme un catalyseur à base d'énamine, mais contribue également comme co-catalyseur acide et peut donc être considérée comme un catalyseur à double fonction. Cette hypothèse d'état de transition a été appuyée expérimentalement par des études cinétiques, stéréochimiques et par marquage isotopique à l'oxygène 18. Des calculs théoriques réalisés par les groupes de List et Houk ont également conforté le chemin réactionnel proposé.⁹² Plus récemment, Marquez et Metzger ont pu isoler et caractériser les intermédiaires **I**, **III**, **V** et **VI** par spectrométrie de masse,⁹³ ce qui va dans le sens du mécanisme « énamine » suggéré par List.

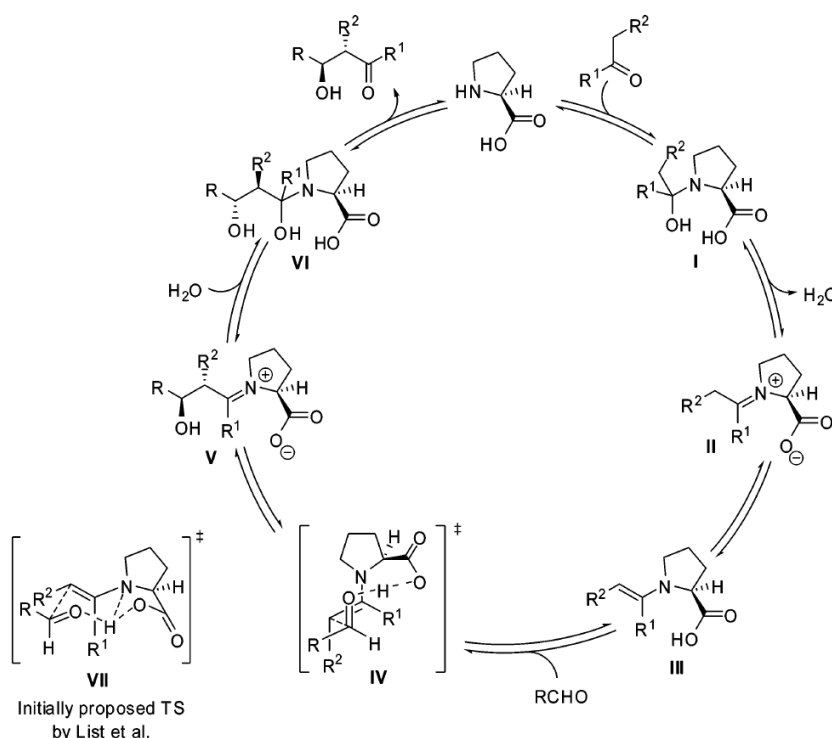


Figure 76. Mécanisme proposé pour la réaction d'aldolisation intermoléculaire catalysée par la proline.

L'effet de l'eau sur le devenir de cette réaction a été également étudié. Selon Barbas, si une petite quantité d'eau (moins de 4 % en volume) n'affecte pas l'excès énantiomérique du produit d'aldolisation, l'ajout de 20 % en volume d'eau entraîne une diminution substantielle de l'énantiosélectivité.⁹⁴ D'autres études mettent en avant des organocatalyseurs qui sont tolérants à

⁹² (a) S. Bahmanyar, K. N. Houk, H. J. Martin and B. List. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 2475-2479; (b) F. R. Clemente and K. N. Houk. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 5766-5768; (c) L. Hoang, S. Bahmanyar, K. N. Houk and B. List. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 16-17; (d) B. List, L. Hoang and H. J. Martin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 5839-5842.

⁹³ C. Marquez, J. O. Metzger. *Chem. Commun.* 2006, 1539.

⁹⁴ K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui and C. F. Barbas, III. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 5260-5267.

l'eau, mais ces derniers présentent des rendements de conversion et les stéréosélectivités faibles en absence d'un co-solvant organique.⁹⁵

Ces études initiales ont conduit plusieurs groupes à développer des dérivés de proline de formules générales A, B et C et à les utiliser pour catalyser la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau (Figure 77). Il s'agit des catalyseurs de type tensioactif, c'est-à-dire des catalyseurs contenant d'une part des groupements hydrophobes et d'autre part de petites unités polaires catalytiquement actives. Ainsi, ces catalyseurs permettent de former un système biphasique (émulsion) contenant de l'eau et une phase organique dans laquelle se concentrent les réactifs au voisinage du catalyseur. En fonction de la quantité d'eau utilisée, une émulsion huile dans eau (O/W, *oil in water*) ou eau dans huile (W/O, *water in oil*) peut se former.

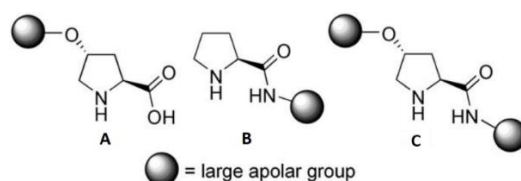


Figure 77. Formule générale pour les dérivés de prolines pouvant catalyser la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau.

Les premiers exemples de tels systèmes ont été développés en 2006 par Hayashi et ses collègues qui ont conçu l'hydroxyproline silylée **9** pour les réactions d'aldolisation directes entre des cétones et des aldéhydes en présence d'eau (Figure 78).⁹⁶

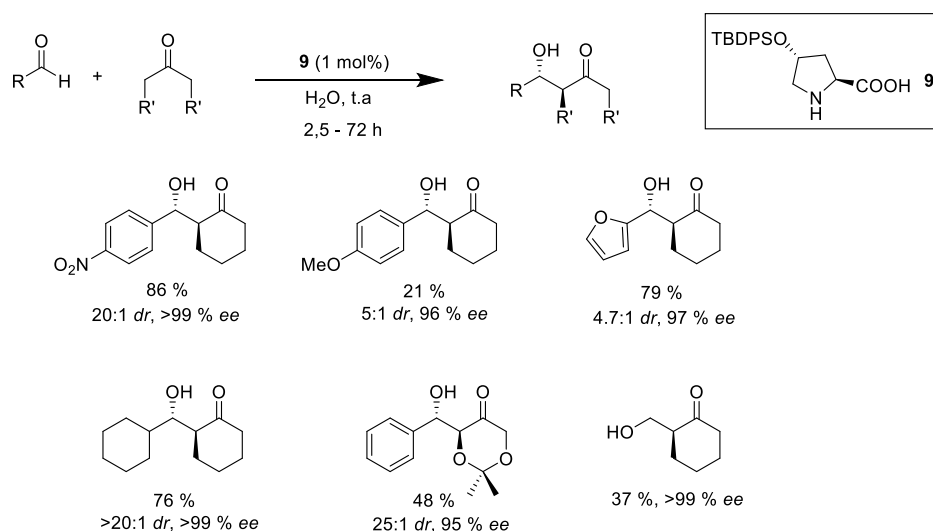


Figure 78. Réaction d'aldolisation directe asymétrique en présence de l'eau développée par Hayashi et coll.

D'excellentes énantiosélectivités des produits ont été obtenues conjointement avec des diastéréosélectivités élevées en utilisant 10 mol% de catalyseur. L'abaissement de la charge catalytique

⁹⁵ (a) A. Cordova, W. Notz and C. F. Barbas, III. *Chem. Commun.*, 2002, 3024-3025; (b) Y.-Y. Peng, Q.-P. Ding, Z. Li, P. G. Wang and J.-P. Cheng, *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, 3871-3875; (c) A. Hartikka and P. I. Arvidsson. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1831-1834; (d) S. S. Chimni, D. Mahajan and V. V. S. Babu. *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 5617-5619; (e) Y.-S. Wu, Y. Chen, D.-S. Deng and J. Cai. *Synlett*, 2005, 1627-1629.

⁹⁶ (a) S. Aratake, T. Itoh, T. Okano, N. Nagae, T. Sumiya, M. Shoji and Y. Hayashi. *Chem.-Eur. J.*, 2007, 13, 10246-10256; (b) Y. Hayashi, S. Aratake, T. Okano, J. Takahashi, T. Sumiya and M. Shoji. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 5527-5529; (c) Y. Hayashi, T. Sumiya, J. Takahashi, H. Gotoh, T. Urushima and M. Shoji. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 958-961.

à 1 % molaire est possible sans aucune influence sur l'énantiosélectivité, même si des temps de réaction sont allongés. Une quantité minimale d'eau est requise pour former une émulsion W/O dans laquelle le catalyseur se positionne.

Barbas et ses collaborateurs ont également mis au point un organocatalyseur à base de tensioactif **10**.⁹⁷ En association avec du TFA (10 mol%), le catalyseur permet l'activation de la réaction d'aldolisation de diverses cétones ou de l'isobutyraldéhyde avec des aldéhydes aromatiques, dans l'eau et à température ambiante. Les produits d'aldolisation sont généralement obtenus avec un rendement élevé, une bonne diastéréosélectivité et une excellente énantiosélectivité (jusqu'à 99 % ee) (Figure 79). La réaction conduite dans l'eau a donné des résultats supérieurs à ceux obtenus lorsque le solvant usuel (DMSO) est utilisé avec le même système organocatalytique.

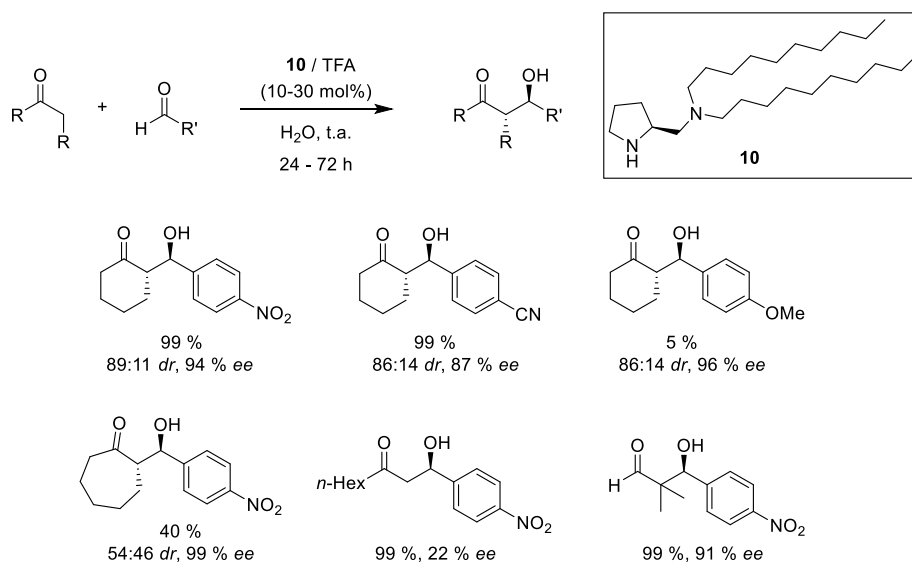


Figure 79. Réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau développée par Barbas et coll.

Bien que ces systèmes soient très efficaces dans l'eau, le recyclage du catalyseur n'est pas possible. Des catalyseurs à base de L-proline associés à un support solide ont été développés pour remédier à ce problème.⁹⁸ A ce jour, les systèmes proposés demandent des étapes de synthèse laborieuses pour fonctionnaliser la surface du support et la réaction d'aldolisation nécessite généralement l'addition de co-solvants organiques pour opérer de façon satisfaisante.

Une alternative prometteuse mais peu développée est l'utilisation de nanostructures supramoléculaires chirales pour la catalyse asymétrique dans l'eau. En effet, diverses architectures supramoléculaires telles que les nanotubes, nanocages, nanofibres, micelles et vésicules ont récemment été utilisées comme catalyseurs.⁹⁹ Cependant, seules quelques rares applications pour la

⁹⁷ N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, III. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 734.

⁹⁸ (a) K. Akagawa, S. Sakamoto, K. Kudo. Tetrahedron Lett. 2005, 46, 8185; (b) X. J. Li, M. Q. Chen, B. L. Yang, S. L. Zhang, X. B. Jia and Z. G. Hu. RSC Adv., 2014, 4, 43278-43285.

⁹⁹ (a) A. J. Boersma, R. P. Megens, B. L. Feringa, G. Roelfes. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 2083-2092 (b) T. Yamamoto, Y. Akai, M. Sugimoto, Angew. Chem., Int. Ed. 2014, 53, 12785-12788; (c) M. Raynal, F. Portier, P. W. N. M. van Leeuwen, L. Bouteiller. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 17687-17690; (d) Q. Jin, L. Zhang, H. Cao, T. Wang, X. Zhu, J. Jiang, M. Liu. Langmuir 2011, 27, 13847-13853; (e) J. Jiang, Y. Meng, L. Zhang, M. Liu, J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 15629-15635.

réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau ont été rapportées. Nous allons décrire ci-après les réalisations les plus remarquables.

En 2009, Escuder et ses collaborateurs ont utilisé un hydrogel supramoléculaire assemblé à partir du composé **11** pour la catalyse de réactions d'aldolisation directes asymétriques. Les auteurs ont obtenu une énantiosélectivité pouvant aller jusqu'à 90 % (Figure 80).¹⁰⁰ L'inconvénient ici est de réaliser la réaction à froid (5 °C) et les réactifs doivent être solubilisés au préalable dans le toluène. De plus, une charge catalytique élevée est nécessaire (20 % en moles).

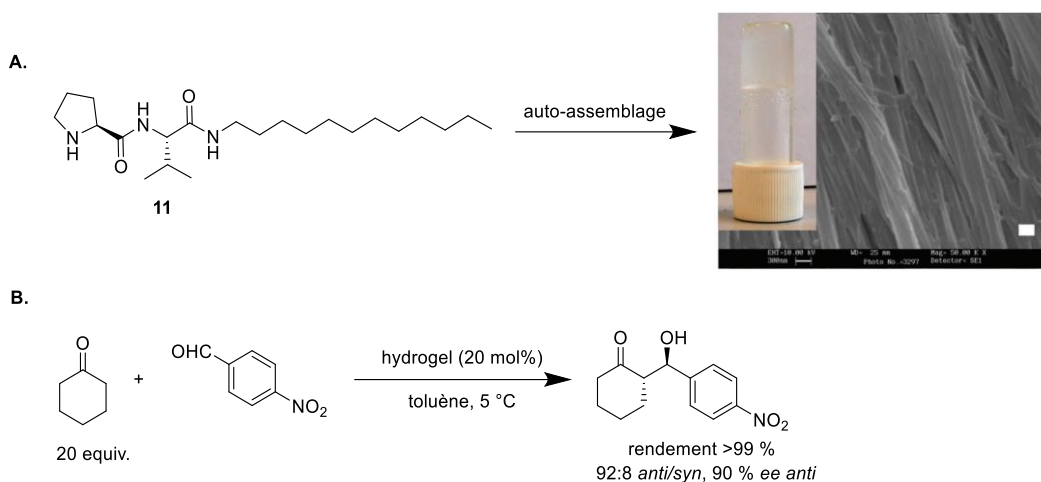


Figure 80. **A.** Image de microscopie électronique de l'hydrogel formé à partir du composé **11** ; **B.** Réaction d'aldolisation directe asymétrique catalysée par les hydrogels développés par Miravet et coll.

En 2015, Parquette a synthétisé un dipeptide à base de proline-lysine **12**, qui a été auto-assemblé en nanotube (Figure 81A). Les auteurs de ce travail ont obtenu une excellente énantiosélectivité, atteignant dans certains cas 97,5 %, avec une charge en catalyseur de 10 mol%.¹⁰¹ Cependant, la cinétique de la réaction laisse à désirer (4 à 5 jours).

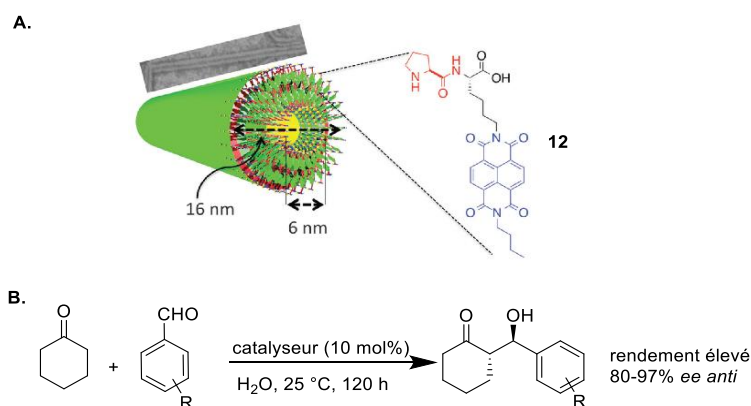


Figure 81. **A.** Auto-assemblage du dipeptide **12** en nanotubes ; **B.** Réaction d'aldolisation directe asymétrique catalysée par ces nanotubes.

¹⁰⁰ F. Rodríguez-Llansola, J. F. Miravet and B. Escuder. Chem. Commun., 2009, 7303-7305.

¹⁰¹ K. S. Lee, J. R. Parquette. Chem. Commun. 2015, 51, 15653-15656.

Plus récemment, le groupe de Liu a synthétisé un dipeptide **13** contenant de la L-proline, qui peut s'auto-assembler en une nanofibre chirale (Figure 82A). Lorsque cette dernière est utilisée comme catalyseur pour la réaction d'aldolisation asymétrique, des rendements élevés (jusqu'à 97 %), d'excellentes diastéréosélectivités (jusqu'à 99 %) et énantiosélectivités (> 99 %) sont obtenues. Pour ce procédé catalytique, seuls 2 % en moles du catalyseur ont été utilisés. La réaction opère dans des temps courts (1,5 à 8 heures) et le catalyseur peut être réutilisé plusieurs fois sans perte d'activité.¹⁰² Cependant, la réaction n'est pas réalisée dans l'eau pure, mais en présence seulement de 5 équivalents de H₂O. En effet, l'augmentation de la proportion d'eau entraîne une diminution de la diastéréosélectivité et de l'énantiosélectivité.

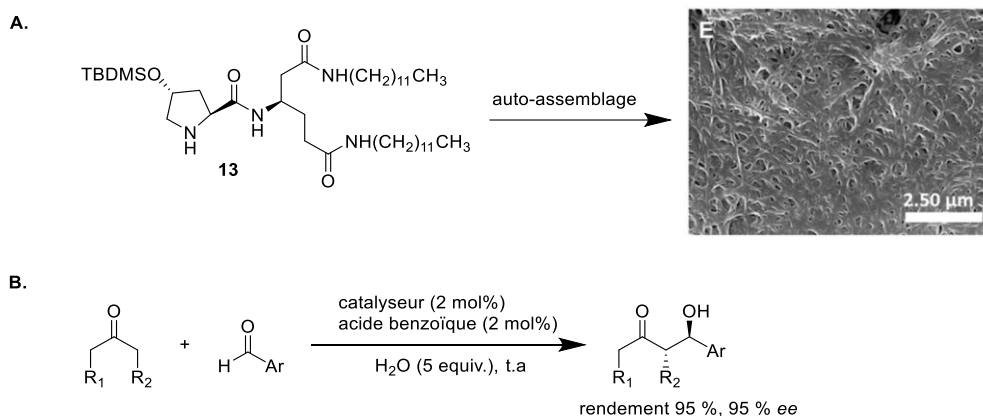


Figure 82. **A.** Structure du dipeptide **13** et image SEM des nanofibres chirales formées à partir de **13** ; **B.** Réaction d'aldolisation directe asymétrique catalysée par ces nanotubes.

À l'heure actuelle, aucun système supramoléculaire décrit n'est véritablement « parfait ». Ainsi, le développement de nouveaux catalyseurs plus performants reste toujours souhaitable. Compte tenu de l'état de l'art et de notre intérêt pour la chimie supramoléculaire des amphiphiles à base de diacétylène, nous avons conçu un nouvel organocatalyseur supramoléculaire à base de polydiacétylène et de proline, qui permet de réaliser de façon efficace la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau.

II. Utilisation des nanotubes PDA comme catalyseur

Notre laboratoire avait déjà développé en 2014 une nouvelle structure hybride obtenue par ancrage de nanoparticules d'or sur des nanotubes organiques polymérisés.¹⁰³ Ces nanotubes ont été formés à partir de l'assemblage d'unités amphiphiles comportant une chaîne grasse diacétylénique et une tête polaire de type nitrilotriacétate (DA-NTA). Les amphiphiles DA-NTA utilisés présentent un comportement supramoléculaire variable selon le pH du milieu. Lorsque le pH de la solution d'amphiphiles est basique (> 10), ces amphiphiles s'assemblent sous la forme de micelles d'environ 6 nm de diamètre. Cependant, à pH neutre, ces mêmes amphiphiles s'assemblent en bicouches formant des structures en forme de ruban. Ces bicouches se réarrangent lentement en rubans torsadés (Figure 83a, 83b) puis en hélices (Figure 83c, 83d), et enfin une torsion supplémentaire conduit à des structures

¹⁰² S. Bhowmick, L. Zhang, G. Ouyang and M. Liu. ACS Omega 2018, 3, 8329-8336.

¹⁰³ D. V. Jawale, E. Gravel, E. Villemin, N. Shah, V. Geertsen, I. N. N. Namboothiri, E. Doris. Chem. Commun. 2014, 50, 15251-15254.

nanotubulaires bien définies (Figure 83e, 83f). Les nanotubes organiques ont ensuite été photopolymérisés à 254 nm pour renforcer la cohésion de l'ensemble.

Dans une deuxième étape, les nanotubes, dont la surface est chargée négativement, ont été habillés avec un polymère cationique (Poly(diallyldiméthylammonium chloride), PDADMAC), par interaction électrostatique. Des nanoparticules d'or préformées ont finalement été ancrées à la plateforme tubulaire par interaction avec le système PDADMAC pour conduire au catalyseur hybride (AuONT) (Figure 83g, 83h). Une analyse par microscopie électronique à transmission (TEM) a révélé un recouvrement dense et homogène de la surface du nanotube organique par des nanoparticules d'or.

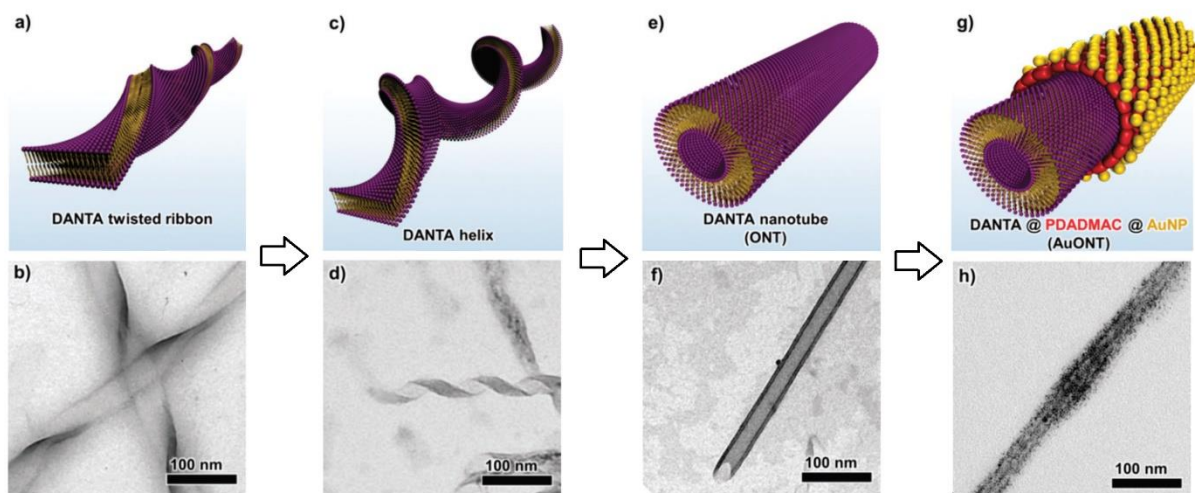


Figure 83. Illustration (haut) des différentes formes adoptées par l'amphiphile DANTA à pH neutre et images correspondantes par microscopie électronique à transmission (bas) : rubans torsadés (a/b), hélices (c/d), nanotubes organiques (e/f) et hybrides AuONT (g/h).

Ce catalyseur a été utilisé dans la réaction de couplage oxydant d'amines primaires en présence de gallacétophénone (THAP, Figure 84). Le système fonctionne avec des quantités minimales d'or, sous air, à température ambiante, et peut être facilement recyclé.

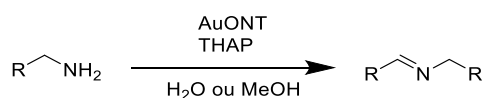


Figure 84. Formation d'imines à partir d'amines primaires catalysée par le système THAP/AuONT.

En nous inspirant des propriétés d'auto-assemblage des amphiphiles diacétyléniques, nous avons souhaité développer de nouveaux organocatalyseurs supramoléculaires qui seront appliqués cette fois à la réaction d'aldolisation asymétrique dans l'eau.

III. Développement de nouveaux catalyseurs supramoléculaires

1. Conception et synthèse de l'amphiphile

Pour la conception de l'amphiphile de départ, nous avons choisi de combiner dans une seule et même unité amphiphile, appelée ci-après DAPro (**IV.1**), une chaîne hydrophobe « structurante » portant un motif diacétylénique avec une tête polaire « catalytique » dérivée de la proline. Le DAPro (**IV.1**) a été facilement synthétisé à partir d'acide pentacos-10,12-diynoïque qui a été activé par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) avant d'être mis à réagir avec l'éthylène diamine (Figure 85). Le composé intermédiaire **II.1** résultant a ensuite été couplé à la *N*-Boc-L-proline, suivi d'une déprotection du groupe amine dans des conditions acides. L'amphiphile DAPro cible **IV.1** a été obtenu avec un rendement global de 66 %.

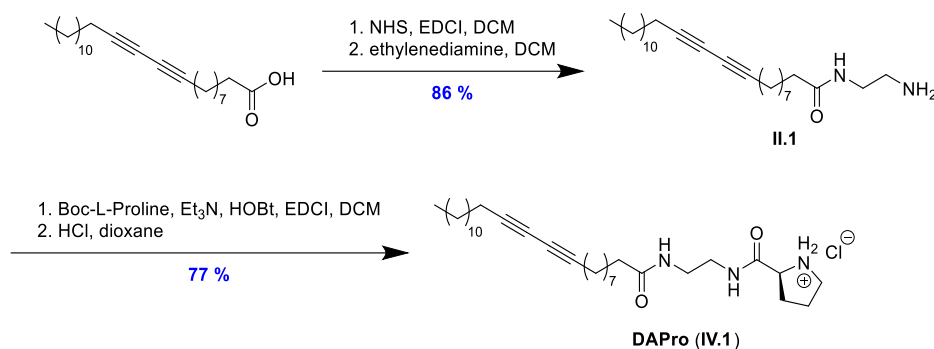


Figure 85. Synthèse de l'amphiphile DAPro (**IV.1**).

2. Préparation des catalyseurs

Avec l'amphiphile DAPro à notre disposition, nous avons examiné ses propriétés d'auto-assemblage supramoléculaire. Nous avons observé que selon le pH, le comportement supramoléculaire de ces amphiphiles était variable. En effet, à pH neutre, les amphiphiles DAPro s'auto-assemblent en bicouche conduisant à la formation de rubans, mais lorsque le pH est acide, ils se structurent sous la forme de micelles. La structure en bicouche se forme par intercalation des chaînes alkyle entre elles (Figure 86), l'assemblage étant doublement maintenu par i) des liaisons hydrogène entre les fonctions amides et ii) par des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles.

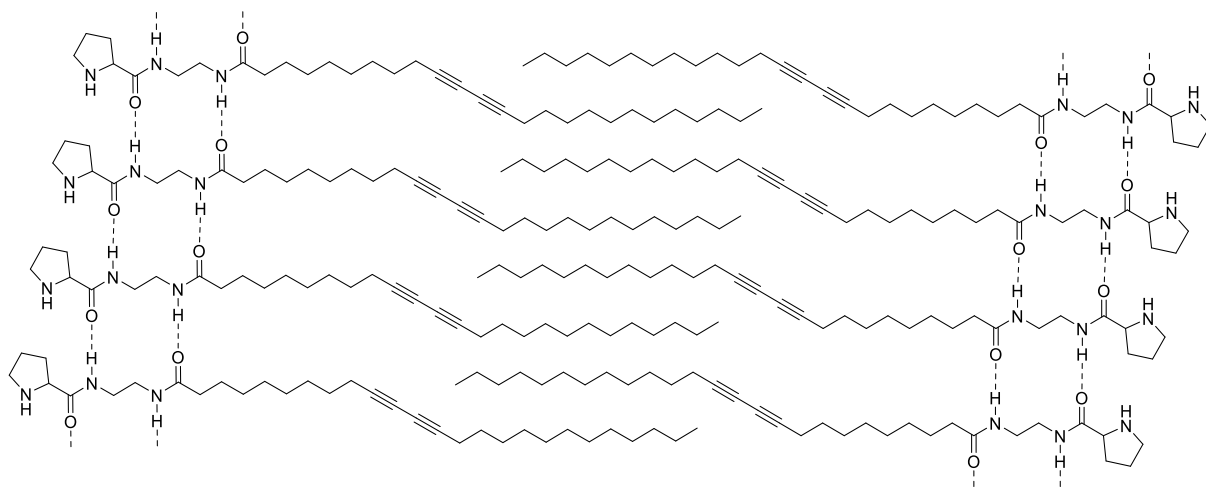


Figure 86. L'auto-arrangement possible des amphiphiles DAPro en bicouche.

La différence de comportement observée en fonction du pH est due à l'état de protonation de la tête polaire proline. Lorsque le pH est acide, l'amine de la proline est protonée, ce qui augmente la surface de la tête polaire. Ainsi, le paramètre d'empilement critique (*critical packing parameter*, P) diminue car ce dernier est inversement proportionnel à la surface de la tête polaire. Lorsque P est inférieur à 0,33, les micelles se forment.

En nous basant sur ces propriétés, nous avons envisagé de formuler les amphiphiles DAPro en plusieurs nanostructures différentes.

a. Préparation des micelles pDAPro

Dans les conditions acides, les amphiphiles DAPro peuvent s'auto-assembler sous la forme de micelles. Ces dernières ont été obtenues par dispersion des amphiphiles DAPro (10 mg) dans une solution aqueuse à 10 mM de HCl (1 mL). Le mélange est ensuite transféré dans un cristallisateur et irradié sous UV à 254 nm pendant 5 h. Après polymérisation, le colloïde est filtré sur membrane Nylon 0,2 μm et la taille des micelles est analysée par DLS. Des objets sphériques monodisperses d'environ 7 nm de diamètre, taille caractéristique des micelles, ont été obtenus.

b. Préparation des nano-rubans pDAPro

À pH neutre, les amphiphiles DAPro ont tendance à s'auto-assembler en structure de type bicouche. Ces structures ont été obtenues par une sonication initiale des amphiphiles dans l'eau (10 mg mL⁻¹) pendant 30 min pour conduire à une solution limpide. Cette solution est laissée à température ambiante pendant 4 h puis à 5 °C pendant 20 h. Cette étape conduit à la formation d'un gel laiteux qui, lorsqu'il est soumis à une irradiation UV à 254 nm, prend une teinte bleue intense. Afin de limiter la taille des agrégats, cette suspension bleue est traitée au bain à ultrasons, induisant une transition du bleu vers le rouge (Figure 87c).

La morphologie de cet assemblage pDAPro a été caractérisée par microscopie électronique à transmission (TEM). Une inspection minutieuse des images TEM a révélé un réseau dense composé de rubans torsadés d'une longueur variable (quelques microns) mais d'une largeur homogène d'environ 18 nm (Figure 87d).

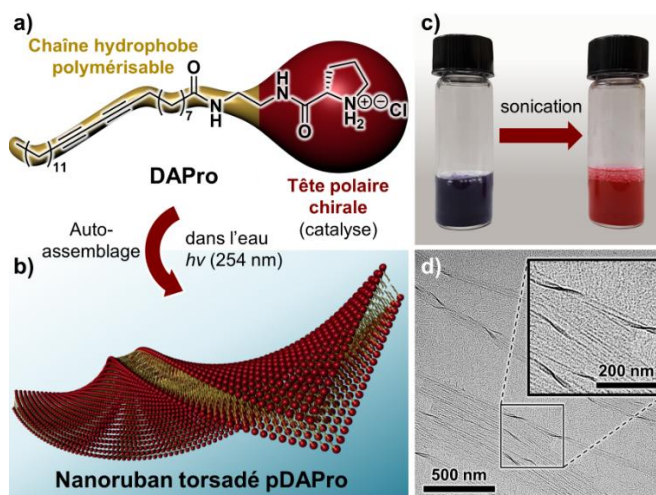


Figure 87. a) Représentation schématique de l'amphiphile DAPro et b) son assemblage en rubans pDAPro ; c) changement de couleur lors de la sonication au bain à ultrasons ; d) Image des nano-rubans obtenue par microscopie électronique à transmission.

Le nano-ruban a également été étudié par spectroscopie UV-Visible et par dichroïsme circulaire (CD) (Figure 88).

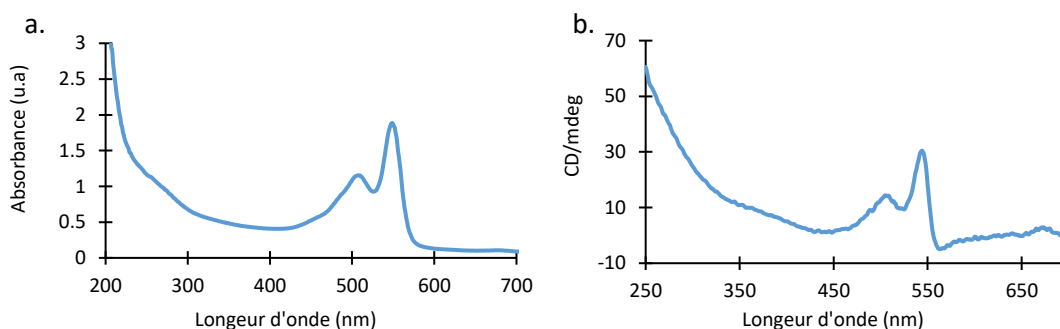


Figure 88. Spectres UV-Vis (a) et CD (b) de pDAPro dans H₂O (0,1 mM).

Le spectre d'absorption montre une bande d'absorption large de 300 nm jusqu'à 200 nm dans l'eau, qui est attribuée au fragment proline conjugué au groupe amide. Un autre pic d'absorption vers 545 nm est observé, caractéristique du système PDA rouge.

Concernant le spectre de dichroïsme circulaire, un large pic positif de 300 à 200 nm a été enregistré, ce qui est cohérent avec celui de la bande d'absorption des spectres UV-vis. De plus, un pic positif vers 545 nm est aussi détecté, suggérant que le réseau PDA participe également à l'établissement de la chiralité supramoléculaire.

3. Application à la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau.

a. Criblage du système catalytique

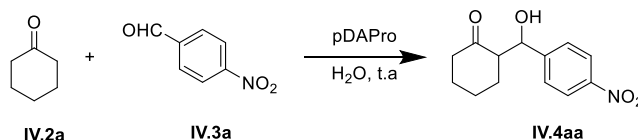
Les catalyseurs supramoléculaires formulés à partir des amphiphiles DAPro ont ensuite été évalués dans une réaction modèle d'aldolisation énantiosélective entre la cyclohexanone (**IV.2a**) et le *p*-nitrobenzaldéhyde (**IV.3a**) (Tableau 6). Les systèmes testés comprennent les micelles pDAPro, les nano-rubans rouge pDAPro et les nano-rubans non polymérisés.

Il n'a pas été possible de tester les micelles non polymérisées formulées à partir de l'amphiphile DAPro en raison d'une stabilité insuffisante. En effet, après une nuit de stockage à température ambiante, la solution de micelles non polymérisées devient trouble et des agrégats sont visibles au fond du pilulier. Ce phénomène n'est pas observé pour les micelles polymérisées.

Les nano-rubans bleus initialement obtenus, sont très sensibles aux stimuli. Lors d'une dilution, d'une addition de réactifs ou même d'une agitation forte du mélange réactionnel, ils deviennent rapidement rouges. C'est pourquoi pour ce projet, seuls les nano-rubans rouges, issus du traitement des nano-rubans bleus au bain à ultrasons, ont été utilisés.

L'eau a été choisie comme seul solvant, la charge en catalyseur a été fixée à 5 % en moles, et les réactions ont été conduites à température ambiante. Les premiers résultats sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Evaluation des différents systèmes catalytiques.^a



Entrée	Formulation	Charge (mol%)	Temps (h)	Conversion ^b (%)	<i>dr</i> <i>anti:syn</i> ^b	<i>ee</i> ^c (%)
1	Micelle	5	24	59	91:09	74
2	Micelle	5	72	93	91:09	74
3	Nano-ruban rouge	5	24	95	90:10	68
4	Nano-ruban non polymérisé	5	24	90	90:10	68

^aConditions: pDAPro catalyseur (0,00625 mmol, 5 mol%), **IV.2a** (1,25 mmol), et **IV.3a** (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit anti.

Après 24 h, la conversion de la réaction d'aldolisation catalysée par les micelles pDAPro a atteint 59 % (entrée 1). Après 3 jours, nous obtenons 93 % de conversion (entrée 2). Le rapport des diastéréoisomères *anti/syn* (*dr*) est quant à lui invariable dans les deux expériences (91:9), de même que l'excès énantiomérique du produit majoritaire *anti* (74 % *ee*).

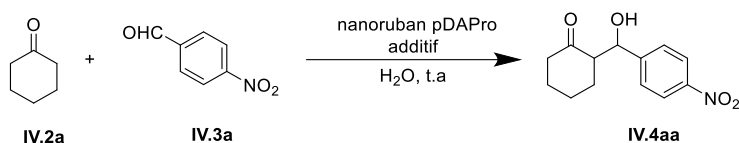
La réaction catalysée par les nano-rubans rouge pDAPro est quant à elle presque totale après 24 h (95 %). Dans ces conditions, un *dr* (90:10) et un *ee* (68 %) sont obtenus (entrée 3). Des résultats voisins ont été produits avec les nano-rubans non polymérisés (90 % conversion, 90:10 *dr* et 68 % *ee*, entrée 4). Cependant, les nano-rubans non polymérisés ne peuvent pas être recyclés car ils se dissocient en monomères en présence d'un solvant organique lors du traitement de la réaction (extraction). Ce comportement n'est pas observé pour les nano-rubans rouges qui sont stables même en présence de solvants organiques. De plus, ils présentent une affinité forte pour la phase aqueuse, ce qui offre des possibilités de recyclage du catalyseur.

Ainsi, les micelles et les nano-rubans rouges ont été retenus comme catalyseurs pour la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau. Cependant, dans la suite de ce chapitre, seule l'optimisation pour les nano-rubans sera abordée. L'étude portant sur les micelles est en cours au laboratoire et sera présentée dans un autre rapport.

b. Criblage des conditions pour la réaction d'aldolisation catalysée par les nano-rubans rouges pDAPro

Tous les résultats du criblage des conditions optimales pour le système nano-ruban sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Criblage des conditions réactionnelles pour la réaction d'aldolisation catalysée par les nano-rubans.^a



Entrée	Charge en catalyseur (mol%)	Additif	Temps (h)	Concersion ^b (%)	<i>dr</i> anti/syn ^b	<i>ee</i> ^c (%)
1	1		24	80	86:14	65
2	5		24	95	90:10	68
3	10		24	81	90:10	64
4	5	HCl (5 mol%)	24	26	92:8	-
5	5	TFA (5 mol%)	24	75	95:5	88
6	5	AcOH (5 mol%)	24	99	87:13	64
7	5	HCOOH (5 mol%)	24	99	92:8	74
8	5	PhCOOH (5 mol%)	24	>99	93:7	89

^aConditions: nano-ruban pDAPro (0,00625 mmol, 5 mol%), additif (0,00625 mmol, 5 mol%), IV.2a (1,25 mmol), et IV.3a (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit *anti*.

Tout d'abord, la charge en catalyseur est modulée entre 1 et 10 % en moles (entrée 1 à 3). La diminution de la charge à 1 mol% (entrée 1) ou son augmentation à 10 mol% (entrée 3) entraîne non seulement une diminution de la conversion de la réaction, mais aussi un léger recul des *dr* et *ee*. Nous avons donc conservé une charge catalytique de 5 mol% pour la suite de ce travail.

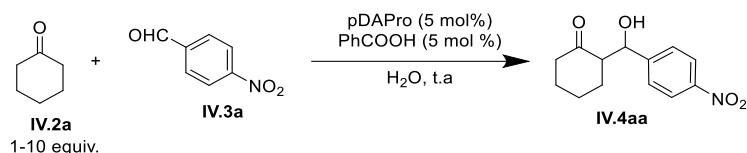
Afin d'améliorer l'efficacité globale de la transformation, certains acides de Brønsted ont ensuite été testés comme co-catalyseur. Des études ont montré que l'utilisation des additifs acides donne souvent des résultats positifs pour la conversion et la sélectivité de la réaction d'aldolisation.¹⁰⁴ L'utilisation de 5 mol% d'acides forts comme acide chlorhydrique et trifluoroacétique (TFA) diminue le taux de conversion de la réaction mais améliore significativement les sélectivités, notamment le *ee* dans le cas de TFA (*dr* = 95:5, *ee* = 88 %) (Entrée 4 et 5). Au contraire, l'utilisation d'acide moyennement fort comme l'acide acétique (Entrée 6) est bénéfique à la vitesse de réaction, mais nuisible à l'énantiosélectivité de la transformation. Le même commentaire s'applique pour l'utilisation de l'acide formique (Entrée 7). Le meilleur compromis entre taux de conversion et sélectivité s'est avéré être

¹⁰⁴ (a) J. N. Moorthy, S. Saha. Eur. J. Org. Chem. 2009, 739-748; (b) C. Ji, Y. Peng, C. Huang, N. Wang, Y. Jiang. Synlett 2005, 986-990; (c) B. Wang, G. Chen, L. Liu, W. Chang, J. Li. Adv. Synth. Catal. 2009, 351, 2441-2448.

l'ajout de 5 mol% d'acide benzoïque (Entrée 8), ce qui a permis une conversion presque complète en produit **IV.4aa** en 24 h avec des valeurs *dr* et *ee* de 93:7 et 89 %, respectivement.

Nous avons également testé l'influence de la quantité de cyclohexanone en faisant varier le nombre d'équivalents de 1 à 10. Les résultats sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Criblage du nombre d'équivalents de cyclohexanone.^a



Entrée	Nb.équivalent de cyclohexanone	Temps (h)	Conversion ^b (%)	<i>dr</i> <i>anti:syn</i> ^b	<i>ee</i> ^c (%)
1	1	24	37,5	80:20	66
2	4	24	>99	87:13	70
3	10	24	>99	93:07	89

^aConditions: nano-ruban pDAPro (0,00625 mmol, 5 mol%), PhCOOH (0,00625 mmol, 5 mol%), **IV.2a** (x equiv.), et **IV.3a** (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit *anti*.

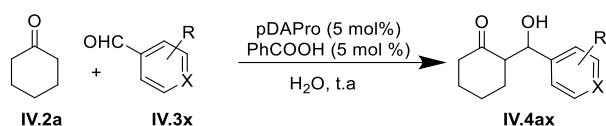
L'augmentation du nombre d'équivalents de cyclohexanone conduit à une augmentation de la vitesse de la réaction. À partir de 4 équivalents de cyclohexanone (entrée 2), la conversion est totale et la diastéréosélectivité et l'énantiosélectivité sont améliorées. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 10 équivalents de cyclohexanone.

Conditions retenues :

- Charge en catalyseur : 5 mol%
- Additif : acide benzoïque (5 mol%)
- 10 équiv. de cyclohexanone
- Température ambiante
- Eau comme seul solvant

c. Exemplification du système des nano-rubans pDAPro

Pour évaluer l'efficacité du catalyseur en nano-ruban pDAPro, ce dernier a été testé sur une variété de substrats dans les conditions réactionnelles optimisées, à savoir 5 % en moles de pDAPro et 5 % en moles d'acide benzoïque, à température ambiante dans l'eau. Nous avons d'abord étudié la réaction de la cyclohexanone avec des aldéhydes aromatiques diversement substitués. Les résultats sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Portée de la réaction d'aldolisation catalysée par les nano-rubans pDAPro entre la cyclohexanone **IV.2a** et divers aldéhydes.^a

Entrée	Aldéhyde	IV.3	Temps (h)	Conversion ^b (%)	<i>dr</i> <i>anti/syn</i> ^b	<i>ee</i> ^c (%)
1		IV.3b	24	94	87:13	80
2		IV.3c	24	99	91:9	86
3		IV.3d	24	95	91:9	86
4		IV.3e	24	88	87:13	84
5		IV.3f	24	92	84:16	80
6		IV.3g	24	99	81:19	82
7		IV.3h	72	34	90:10	88
8		IV.3i	72	12	86:14	82
9		IV.3j	24	99	82:18	80
10		IV.3k	192	84	87:13	76
11		IV.3l	72	0	-	-

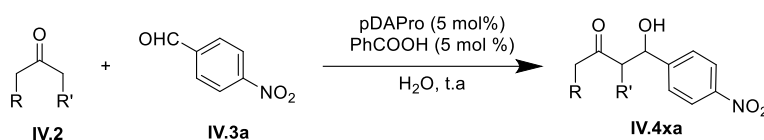
^aConditions: nano-ruban pDAPro (0,00625 mmol, 5 mol%), PhCOOH (0,00625 mmol, 5 mol%), **IV.2a** (1,25 mmol), et **IV.3** (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit *anti*.

Le système s'est révélé être très efficace avec des aldéhydes pauvres en électrons, tant en terme de conversion que de sélectivité. En plus du *p*-nitrobenzaldéhyde **IV.3a**, les dérivés *ortho*- (**IV.3b**, entrée 1) et les *mé*ta-nitrobenzaldéhydes (**IV.3c**, entrée 2) ont également été convertis avec une excellente conversion (94 % et 99 %, respectivement) et une bonne sélectivité (*dr* = 87:13 et 91:9, *ee* = 80 % et 86 %, respectivement). L'ester méthylique **IV.3d** (Entrée 3) a été transformé avec une conversion de 95 % avec de très bons *dr* (91: 9) et *ee* (86 %). Les substrats halogénés, à savoir le *p*-chloro (**IV.3e**, entrée 4) et le *p*-bromobenzaldéhyde (**IV.3f**, entrée 5), réagissent de même facilement (conversions de 88 % et 92 %, respectivement) et sélectivement (*dr* = 87:13 et 84:16, *ee* = 84 et 80 %, respectivement). Le *p*-

cyanobenzaldéhyde (**IV.3g**, entrée 6) est également transformé quantitativement ($dr = 81:19$, $ee = 82$ %). Malheureusement, le benzaldéhyde simple (**IV.3h**, entrée 7) n'est que peu réactif dans nos conditions de réaction, conduisant à une conversion faible de 34 % mais avec cependant une bonne sélectivité ($dr = 90:10$, $ee = 88$ %). De même, le *p*-méthoxybenzaldéhyde (**IV.3i**, entrée 8), riche en électrons, n'a pas conduit à une conversion supérieure à 12 % après 72 h, même si la sélectivité est satisfaisante ($dr = 86:14$, $ee = 82$ %). L'efficacité du système a également été testée sur d'autres aldéhydes aromatiques, notamment l'isonicotinaldéhyde (**IV.3j**, entrée 9), qui a été entièrement converti en 24 h ($dr = 82:18$, $ee = 80$ %), ainsi que le 1-naphtalaldéhyde (**IV.3k**, entrée 10) qui a réagi avec une bonne conversion (84 %) et sélectivité ($dr = 87:13$, $ee = 76$ %). Il est à noter que la cinétique de cette dernière réaction est plutôt lente (8 jours de réaction). La réaction avec l'isobutyraldéhyde (**IV.3l**, entrée 11) n'a pas donné de produit même après 3 jours de réaction.

Plusieurs cétones autres que la cyclohexanone ont également été mises à réagir avec l'aldéhyde **IV.3a**, donnant généralement une bonne conversion, mais une sélectivité moyenne (Tableau 10).

Tableau 10. Portée de la réaction d'aldolisation catalysée par les nano-rubans pDAPro entre le *p*-nitrobenzaldéhyde **IV.3a** et diverses cétones.^a



Entrée	Cétone	IV.2	Temps (h)	Conversion ^b (%)	dr^b <i>anti/syn</i>	ee^c (%)
1		IV.2b	24	99	36:64	54 ^d
2		IV.2c	144	60	45:55	20 ^e
3 ^f		IV.2d	72	98	-	48
4 ^g		IV.2e	72	97	-	47

^aConditions: pDAPro nano-ruban (0,00625 mmol, 5 mol%), PhCOOH (0,00625 mmol, 5 mol%), **IV.2a** (1,25 mmol), et **IV.3** (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour le produit *anti*. ^d ee donné pour produit *anti*. Le produit *syn* a été obtenu avec 30% ee . ^e ee donné pour produit *syn*. Le produit *anti* a été obtenu avec 2% d' ee . ^fRéaction réalisée avec 5 mmol de **IV.2d**. ^gL'aldolisation intervient en position C1 de la 2-octanone **IV.2e**.

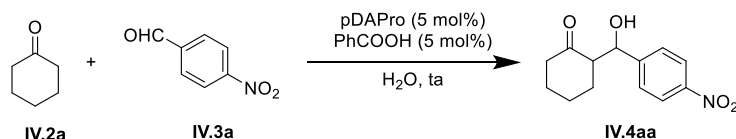
La réaction de **IV.3a** avec la cyclopentanone (**IV.2b**, entrée 1) a conduit à une conversion complète au bout de 24 h, mais n'a donné que des dr (36:64) et ee (54 %) modérés. Il est à noter que la diastéréosélectivité de la cyclopentanone est inversée par rapport à la cyclohexanone car le produit *syn* est obtenu majoritairement. Dans le cas de la cycloheptanone (**IV.2c**, entrée 2), la réaction atteint 60 % de conversion au bout de 144 h et la sélectivité est limitée ($dr = 45:55$, $ee = 20$ %). En utilisant de l'acétone (**IV.2d**, entrée 3), nous avons obtenu une conversion de 98 % avec 48 % ee après 72 h. Des résultats similaires ont été observés avec la 2-octanone (**IV.2e**, entrée 4), soit 97 % de conversion après 72 h de réaction et 47 % ee .

d. Recyclage du catalyseur

Nous avons tout d'abord essayé de démontrer la nature hétérogène de la transformation organocatalysée, c'est-à-dire que le processus catalytique se déroule effectivement à la surface des nanostructures et n'est pas activé par des amphiphiles « contaminants » à base de proline en solution. Pour cela, une réaction d'aldolisation a été réalisée dans des conditions habituelle à la seule différence que la suspension de catalyseur pDAPro a été filtrée sur une membrane de 0,2 μm avant ajout au milieu réactionnel. Cette étape a pour but d'éliminer le catalyseur solide mais pas d'éventuelles traces d'amphiphile. Dans ces conditions, la vitesse de réaction a été significativement réduite puis que nous observons que 30 % de conversion après 24 h, et les produits d'aldolisation ont été obtenus sous la forme de composés racémiques.

Une caractéristique importante de la catalyse hétérogène est la possibilité de récupérer le catalyseur et de le recycler pour des réactions ultérieures. Dans l'idéal, l'étape de récupération devrait être aussi simple que possible et la réutilisation ne devrait pas impliquer de traitement ni de réactivation des espèces catalytiques. En ce qui nous concerne, un protocole de recyclage très simple a été utilisé. Une fois la réaction terminée, le produit d'aldolisation a été extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle, laissant le catalyseur dans de l'eau prêt à être utilisé dans le cycle suivant. Nous avons effectué cinq réactions d'aldolisation consécutives entre **IV.2a** et **IV.3a** avec le même échantillon de catalyseur pDAPro (avec ajout de 5 mol% d'acide benzoïque à chaque cycle) en utilisant ce protocole de recyclage et nous avons été heureux de constater que ni la conversion ni la sélectivité n'étaient affectées au cours des expériences (Tableau 11, entrée 1-5).

Tableau 11. Recyclage du catalyseur nano-ruban pDAPro 1.^a



Entrée	Catalyseur	Temps (h)	Conversion ^b (%)	<i>dr</i> <i>anti:syn</i> ^b	<i>ee</i> ^c (%)
1	Frais	24	99	93:7	89
2	1 ^{er} recyclage	24	99	93:7	89
3	2 ^e recyclage	24	99	93:7	89
4	3 ^e recyclage	24	99	93:7	89
5	4 ^e recyclage	24	99	93:7	89

^aConditions: nano-ruban pDAPro (0,00625 mmol, 5 mol%), PhCOOH (0,00625 mmol, 5 mol%), **IV.2a** (1,25 mmol), et **IV.3** (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit *anti*.

Les produits d'aldolisation ont été obtenus systématiquement avec une conversion quasi totale, avec 93:7 *dr* et 89 % *ee*. Ces résultats soulignent la robustesse du système catalytique, qui conserve son activité sur plusieurs cycles.

Notre catalyseur supramoléculaire à base de L-proline s'est avéré être efficace sur divers substrats dans l'eau sans addition de solvants organiques. Les performances globales de ce catalyseur dans l'eau peuvent être rationalisées par la structure particulière des nano-rubans qui offre, en plus du centre proline actif, un domaine hydrophobe localisé à l'interface des chaînes lipophiles. Ce domaine est susceptible de prendre en charge les réactifs hydrophobes impliqués dans la réaction d'aldolisation de telle sorte qu'il se comporte comme un nanoréacteur favorisant la dispersion aqueuse des réactifs et leur concentration au voisinage des sites actifs du catalyseur. En même temps, le domaine hydrophobe

isole l'état de transition de l'eau, minimisant ainsi l'interférence du milieu aqueux sur le devenir de la transformation, notamment en ce qui concerne sa sélectivité. De ce point de vue, le nano-ruban peut être considéré comme une structure mimant les aldolases qui catalysent efficacement le même type de transformation dans la nature. Comme notre procédé passe par la formation transitoire d'une énamine, nous avons, dans la suite de ce travail, souhaité explorer le potentiel de notre catalyseur pour d'autres transformations chimiques impliquant le même type d'intermédiaire à savoir la réaction de Mannich et celle de Michael.

4. Application à la réaction de Michael asymétrique dans l'eau

La formation de liaisons C-C par addition conjuguée 1,4 de nucléophiles sur la position β de composés carbonyles α,β -insaturés (réaction de Michael) est fréquemment utilisée en synthèse organique.¹⁰⁵ De nombreux efforts ont été déployés pour développer des méthodes catalytiques et stéréosélectives efficaces.¹⁰⁶ Bien que des progrès remarquables aient été réalisés dans la conception de catalyseurs asymétriques contenant des métaux, ce n'est que récemment que des transformations asymétriques utilisant de petites molécules organiques comme catalyseurs ont été rapportées.¹⁰⁷

Les nucléophiles carbonés contenant un centre méthylène actif ont été largement utilisés dans les additions directes de Michael, tandis que les composés carbonyles simples doivent généralement être convertis en espèces plus réactives telles que les éthers d'énol et les énamines avant utilisation dans une version indirecte de la réaction (Figure 89).

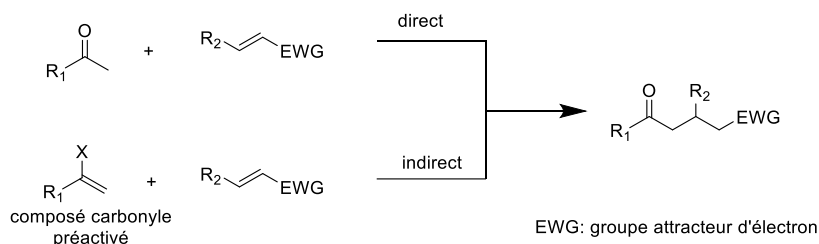


Figure 89. Réaction de Michael directe et indirecte.

Afin de pouvoir effectuer l'addition directe des composés carbonyles sur les accepteurs de Michael en évitant l'étape d'activation, il est possible d'utiliser un catalyseur « aminé » capable de former de façon transitoire une énamine. En effet, les énamines peuvent être formées de manière réversible à partir d'amines et de dérivés carbonyles (aldéhydes, cétones) et utilisées comme intermédiaires dans un cycle catalytique (Figure 90). Une réaction ultérieure avec un accepteur conduit au produit d'addition de Michael souhaité. L'hydrolyse induite par l'eau générée *in situ* libère le produit et régénère le catalyseur. Ainsi, la L-proline et ses dérivés ont montré leur capacité à catalyser la réaction de Michael de façon asymétrique.¹⁰⁸

¹⁰⁵ (a) B. E. Rossiter, N. M. Swingle. Chem. Rev. 1992, 92, 771; (b) B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long. Prog. Polym. Sci., 2006, 31, 487-531.

¹⁰⁶ (a) N. Krause, A. Hoffmann-Roder. Synthesis 2001, 171; (b) O. M. Berner, L. Tedeschi, D. Enders. Eur. J. Org. Chem. 2002, 1877; (d) J. Christoffers, A. Baro. Angew. Chem., Int. Ed. 2003, 42, 1688; (e) M. P. Sibi, S. Manyem. Tetrahedron 2000, 56, 8033.

¹⁰⁷ (a) S. B. Tsogoeva. Eur. J. Org. Chem. 2007, 1701; (b) A. Berkessel, H. Groger. Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Application in Asymmetric Synthesis; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; (c) P. I. Dalko, L. Moisan. Angew. Chem., Int. Ed. 2004, 43, 5138.

¹⁰⁸ (a) D. Enders, A. Seki, Synlett 2002, 26; (b) B. List, P. Pojarliev, H. Martin. J. Org. Lett. 2001, 3, 2423.

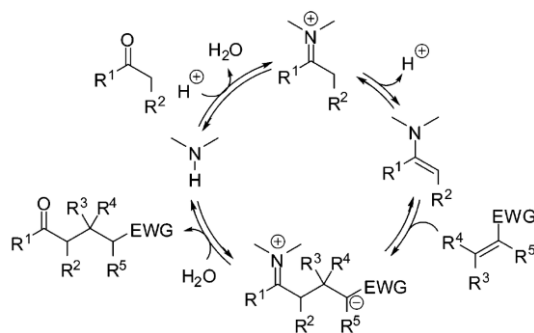
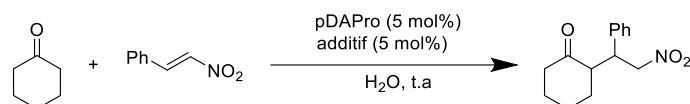


Figure 90. Réactions de Michael catalysées par une amine.

Notre catalyseur nano-ruban pDAPro a été évalué dans une réaction de Michael directe énantiosélective entre la cyclohexanone et le *trans*- β -nitrostyrène (Tableau 12). Les conditions réactionnelles utilisées pour la réaction d'aldolisation ont été conservées : l'eau comme seul solvant, 5 mol% du catalyseur et de l'additif. Les réactions ont été conduites à température ambiante.

Tableau 12. Criblage des conditions pour la réaction directe de Michael.^a



Entrée	Additif (mol%)	Temps (h)	Conversion ^b (%)	<i>dr</i> <i>anti/syn</i> ^b (%)	<i>ee</i> ^c (%)
1	-	168	Trace	-	-
2	PhCOOH (5 mol%)	24	62	10:90	10
3	PhCOOH (5 mol%)	48	70	8:92	10
4 ^d	PhCOOH (5 mol%)	24	52	28:72	-
5	TFA (5 mol%)	24	24	12:88	-
6	TFA (5 mol%)	168	78	10:90	10
7	AcOH (5 mol%)	24	23	19:81	-
8	AcOH (5 mol%)	48	24	18:82	-
9	APTS (5 mol%)	24	23	14:86	-
10	APTS (5 mol%)	48	35	11:89	-

^aConditions: nano-ruban pDAPro (0,00625 mmol, 5 mol%), additif (0,00625 mmol, 5 mol%), cyclohexanone (1,25 mmol), *trans*- β -nitrostyrène (0,125 mmol) dans l'eau (1 mL) à température ambiante. ^bDéterminé par RMN ¹H du brut réactionnel. ^cDéterminé par analyse CLHP en phase chirale pour produit *anti*. ^dRéaction est réalisée dans une solution saturée de NaCl.

La réaction sans additif (entrée 1) est très lente. Après 7 jours, seules des traces du produit sont détectées par CCM. L'utilisation d'acide benzoïque accroît la vitesse de la réaction (entrée 2). En effet, après 24 h, une conversion de 62 % est obtenue avec une bonne diastéréosélectivité *syn* (*dr* = 10:90). Cependant, l'énantiosélectivité mesurée est faible (*ee* = 10 %). Prolonger le temps de la réaction jusqu'à 48 h n'améliore pas la réaction (conversion = 70 %, *dr* = 8:92, *ee* = 10 %). Il a été rapporté que la saumure, dans certains cas, pouvait augmenter la vitesse et la sélectivité de la réaction de Michael.¹⁰⁹ Nous l'avons ainsi testée pour notre réaction mais aucune amélioration n'est observée (entrée 4). L'utilisation d'autres acides comme l'acide trifluoroacétique, l'acide acétique et l'acide *para*-toluènesulfonique n'a pas non plus permis d'activer la réaction de Michael.

¹⁰⁹ (a) N. Mase, K. Watanabe, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, III. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4966; (b) N. Kaplaneris, G. Koutoulougenis, M. Raftopoulou, C. G. Kokotos. J. Org. Chem. 2015, 80, 5464-5473.

Notre catalyseur ne peut donc être appliqué à la réaction de Michael dans l'eau qu'en utilisant l'acide benzoïque comme additif. À 5 mol% de nano-ruban et d'acide benzoïque, la réaction a atteint 70 % de conversion et le *dr* est de 8:92 après 2 jours de réaction. Malheureusement, l'excès énantiomérique plafonne à 10 %. Cette sélectivité *syn* et la faible énantiosélectivité que nous observons sont en accord avec la littérature relative aux réactions d'additions conjuguées sur des nitro-oléfines et catalysées par la proline.¹⁰⁸ Ainsi, la sélectivité *syn* peut être expliquée par une préférence pour deux des états de transition (1 et 2) par rapport aux états de transition 3 et 4 présentés dans la Figure 91. En effet, dans les états de transition 1 et 2, il existe des interactions électrostatiques favorables entre l'azote partiellement positif de l'énamine et le groupe nitro partiellement négatif.

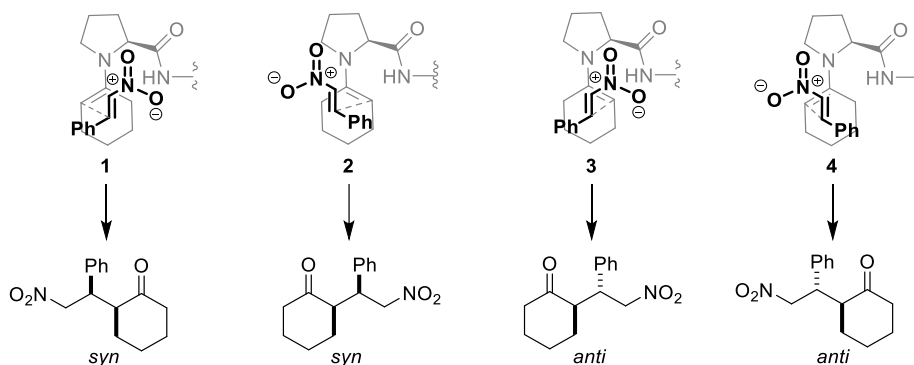


Figure 91. Les 4 états de transition proposé pour l'addition de Michael catalysée par le nano-ruban.

5. Application à la réaction de Mannich directe asymétrique dans l'eau

La réaction de Mannich est une transformation utile pour la construction de molécules azotées.¹¹⁰ Cette réaction a, dans sa version énantiosélective, acquis une popularité croissante pour la construction du motif β -amino-carbonyle qui est présent dans de nombreux médicaments et produits naturels. La capacité de la réaction de Mannich à générer de la diversité dans des composés synthétisés la rend également attractive.

Dans la réaction de Mannich catalysée par une énamine, l'électrophile accepteur est une imine. Ainsi, en fonction de la méthode de formation de l'imine, deux variantes de cette réaction existent : une variante directe avec les trois composants de la réaction, à savoir deux composés carbonyles et une amine et une variante indirecte utilisant des imines et/ou des équivalents énolates préformés (Figure 92).

¹¹⁰ (a) M. Arend, B. Westermann, N. Risch. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1998, 37, 1044; (b) M. M. B. Marques. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 348; (c) M. Shibasaki, S. Matsunaga. *J. Organomet. Chem.* 2006, 691, 2089; (d) A. Cordova. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37, 102.

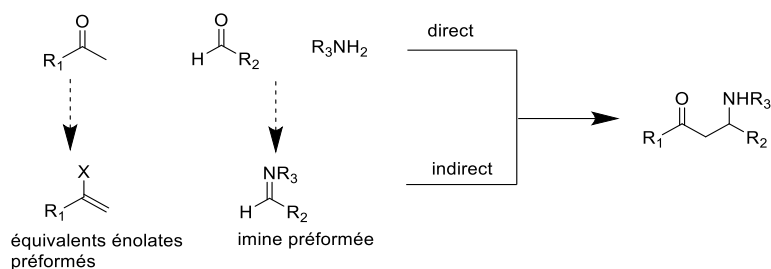


Figure 92. Réactions directe et indirecte de Mannich.

Les premières réactions de Mannich asymétriques catalysées par une énamine ont été décrites par List en 2000.¹¹¹ De la même manière que les réactions d'aldolisation, les premières réactions de Mannich asymétriques catalysées par la proline font également intervenir un mécanisme de type énamine. Ainsi, nous avons souhaité tester les performances de notre catalyseur en nano-ruban pour la réaction de Mannich. Tout d'abord, le nano-ruban a été utilisé dans une réaction de Mannich directe énantiosélective entre la cyclohexanone, le *p*-nitrobenzaldéhyde et la *p*-anisidine. Comme pour la réaction d'aldolisation, l'eau a été choisie comme seul solvant, la charge en catalyseur a été fixée à 5 mol% et les réactions ont été conduites à température ambiante. Dans un premier temps, l'acide benzoïque a été choisi comme additif à 5 mol% (Figure 93).

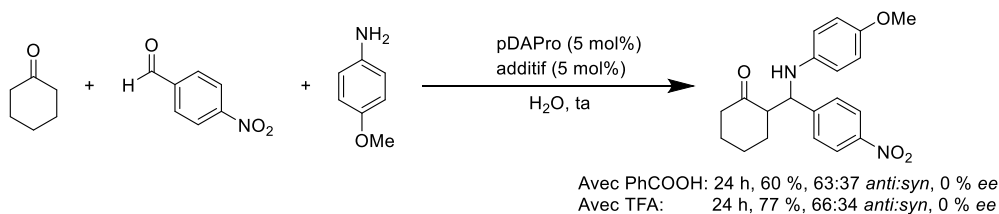


Figure 93. Réaction de Mannich directe asymétrique catalysée par les nano-rubans.

Dans ces conditions, le produit se forme après 24 h de réaction (conversion = 60 %). Par contre, la diastéréosélectivité est médiocre (*dr* = 63:37) et le produit de Mannich est obtenu sous la forme d'un racémate. Afin de tenter d'optimiser la sélectivité, un autre additif a été utilisé. L'acide trifluoroacétique a été ainsi choisi car, dans la réaction d'aldolisation, il avait donné d'excellents *dr* et *ee* (cf. Tableau 7, entrée 5). En utilisant TFA comme additif, la réaction de Mannich directe est plus rapide (77 % de conversion en 24 h) mais aucune amélioration de la diastéréosélectivité n'est observée et un mélange racémique est encore obtenu. Dans ces deux conditions, contrairement à la sélectivité *syn* attendue, une préférence pour la sélectivité *anti* est observée.

De la même manière, notre catalyseur nano-ruban pDAPro a été évalué dans une réaction de Mannich indirecte et énantiosélective entre la cyclohexanone et l'imine préformée du *p*-nitrobenzaldéhyde avec *p*-anisidine. Les mêmes conditions ont été choisies : l'eau comme seul solvant, 5 mol% du catalyseur et de l'additif (acide benzoïque et TFA). Les réactions ont été conduites à température ambiante (Figure 94).

¹¹¹ B. List. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 9336.

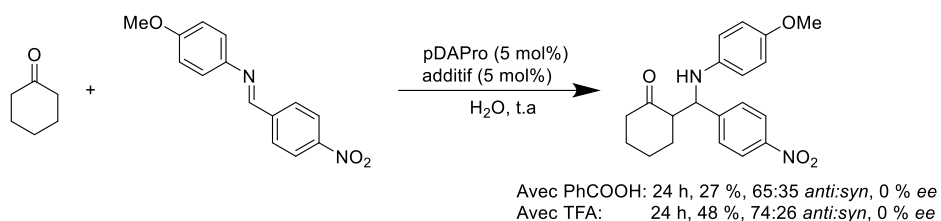


Figure 94. Réaction de Mannich indirecte asymétrique catalysée par les nano-rubans.

En utilisant l'acide benzoïque comme additif, le produit se forme mais qu'en faible quantité (27 % après 24 h) et de mauvaises sélectivités sont obtenues ($dr = 65:35$, $ee = 0$ %). L'utilisation de 5 mol% de TFA comme additif donne un meilleur taux de conversion (48 % après 24 h), mais n'améliore que de peu la sélectivité ($dr = 74:26$, $ee = 0$ %). De la même façon que la version directe, la version indirecte donne également une sélectivité *anti*.

Nos nano-rubans sont ainsi actifs pour catalyse de la réaction de Mannich dans l'eau avec une préférence pour le diastéréoisomère *anti* ($anti:syn = 2:1$) mais cependant sans induire d'énantiosélectivité. Cette diastéréosélectivité inhabituelle et l'absence d'induction asymétrique par rapport aux réactions catalysées par la proline ne sont pas encore totalement compris. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour mieux appréhender le mécanisme d'action des nano-rubans dans cette réaction.

IV. Développement d'un nouveau catalyseur supramoléculaire

Nous avons vu dans la partie III de ce chapitre que l'ajout d'un additif acide était le plus souvent requis pour activer les réactions d'aldolisation. Cet additif agit en synergie avec le dérivé de proline pour améliorer les rendements et les sélectivités des transformations catalysées. Afin d'éviter l'ajout d'un co-catalyseur acide dans la réaction d'aldolisation, un nouveau catalyseur supramoléculaire incorporant d'une part un dérivé de proline et d'autre part un groupement acide carboxylique a été développé.

1. Synthèse de l'amphiphile

Pour la conception du nouvel amphiphile, nous avons décidé de garder la chaîne C_{25} hydrophobe diacétylène et de la conjuguer avec une tête polaire dérivée de la proline dont les groupements amine et acide carboxylique sont intacts. L'amphiphile **IV.10** a été synthétisé à partir de *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-prolinate de méthyle qui a d'abord été mis à réagir avec le chlorure de toluène-4-sulfonyl pour donner le dérivé tosylé **IV.5**. Ce dernier, après une S_N2 avec de l'azoture de sodium, conduit à l'azido **IV.6**, qui est ensuite réduit dans une réaction de Staudinger (PPh_3/H_2O). L'amine résultante **IV.7** est alors couplée à l'acide pentacosanoïque afin d'obtenir l'intermédiaire protégé **IV.8**. Des conditions basiques sont utilisées pour déprotéger le groupement acide carboxylique par une réaction de saponification. La déprotection de l'amine est ensuite réalisée en conditions acides (HCl). L'amphiphile final **IV.10** est obtenu avec un rendement global de 29 %.

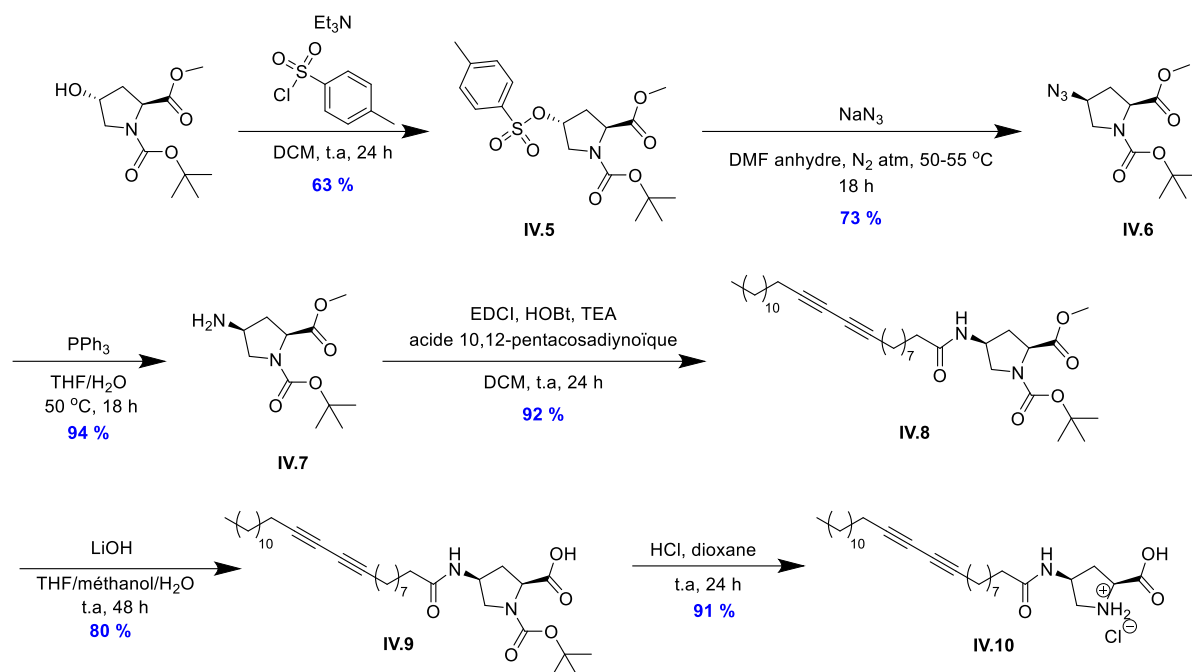


Figure 95. Synthèse de l'amphiphile IV.10.

2. Formulation de l'amphiphile IV.10 en nano-bâtonnets

L'amphiphile **IV.10** (10 mg) est dissous dans un mélange de l'éthanol/méthanol 1:1 (200 μL). Cette solution est ensuite ajoutée à de l'eau (2 mL) et le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h. Il se forme au cours du processus une suspension laiteuse résultant de la formation d'assemblages en bicouches. La suspension est ensuite soumise à une irradiation UV à 254 nm pendant 2 min, ce qui provoque l'apparition d'une couleur bleue intense. Un traitement de la suspension bleue au bain à ultrasons pendant 1 heure conduit à finalement une suspension colloïdale de couleur rouge.

La morphologie de cet assemblage a été caractérisée par microscopie électronique à transmission (TEM). L'imagerie TEM a révélé un réseau dense de nanostructures composé de nano-bâtonnets (Figure 96).

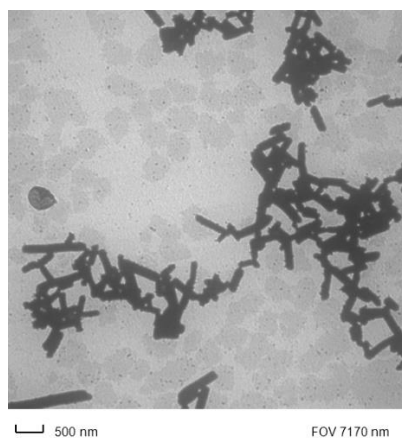


Figure 96. Image TEM des nano-bâtonnets formées à partir des amphiphiles IV.10.

Ces nano-bâtonnets sont, comme les nano-rubans, constitués d'une structure bicouche résultant de l'assemblage des amphiphiles **IV.10** dans lesquels les chaînes alkyles sont intercalées et en interaction par effet hydrophobe. L'assemblage est également maintenu, au niveau des têtes polaires, par un nombre plus important de liaisons hydrogène du fait de la présence des acides carboxyliques. Ces liaisons induisent une contrainte qui a pour conséquence de provoquer l'enroulement de la structure en bicouche sur elle-même jusqu'à former une spirale et finalement un bâtonnet.

3. Application des nano-bâtonnets à la réaction d'aldolisation directe asymétrique dans l'eau

Le nouveau catalyseur supramoléculaire a ensuite été évalué dans la réaction d'aldolisation énantiosélective entre la cyclohexanone (**IV.2a**) et le *p*-nitrobenzaldéhyde (**IV.3a**). Aucun additif n'a été utilisé puisque le catalyseur incorpore déjà dans sa structure une fonction acide. Pour le premier essai, nous avons fixé la charge en catalyseur à 5 mol%. L'eau a été utilisée comme seul solvant et la réaction a été réalisée à température ambiante (Figure 97).

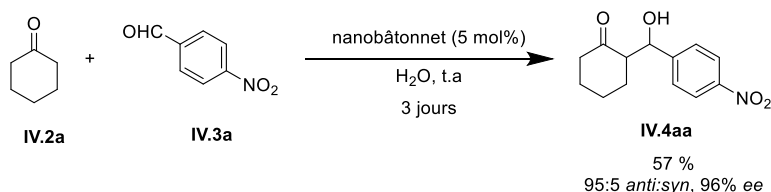


Figure 97. Réaction d'aldolisation directe asymétrique catalysée par les nanobâtonnets.

La réaction catalysée par les nano-bâtonnets formulés à partir des amphiphiles **IV.10** est plus lente par rapport à des nano-rubans dans les mêmes conditions. En effet, après 3 jours, la conversion de la réaction catalysée par les nano-bâtonnets atteint seulement 57 %, tandis qu'une conversion de 95 % après 24 h (Tableau 6, entrée 3) avait été obtenue pour la réaction catalysée par les nano-rubans. Cependant, en utilisant les nano-bâtonnets, la sélectivité a été grandement améliorée, puisque nous obtenons un ratio diastéréomérique de 95:5 en faveur de l'isomère *anti* et un excès énantiomérique de 96 %. Cette sélectivité est la meilleure obtenue dans le cadre de nos expériences et a probablement pour origine l'assistance intramoléculaire de l'acide carboxylique qui permet de synchroniser la séquence des événements réactionnels.

V. Conclusion

De nouveaux amphiphiles portant une tête polaire dérivée de proline et une chaîne lipophile diacétylénique ont été synthétisés, auto-assemblés en milieu aqueux et photopolymérisés pour donner des nano-rubans torsadés, des nano-bâtonnets ou des micelles. Les catalyseurs supramoléculaires ont été étudiés pour la promotion de réactions d'aldolisation énantiosélectives. Les trois catalyseurs se sont avérés être efficaces dans l'eau sans ajout de solvant organique.

Une étude approfondie a démontré une très bonne réactivité, diastéréo- et énantiosélectivité du système nano-ruban sur divers substrats. Ce dernier est également actif dans des conditions durables (température ambiante, atmosphère non contrôlée, faible charge en catalyseur, eau en tant que

solvant unique). De plus, le catalyseur peut être recyclé plusieurs fois sans aucune perte d'activité. De ce point de vue, ce catalyseur peut être considéré comme un mime d'aldolase qui favorise la compartimentation des réactifs, ce qui confère une sélectivité unique.

Par la suite, le catalyseur nano-ruban a été appliqué aux réactions de Michael et Mannich. Des produits correspondants ont été obtenus, mais sous la forme de mélanges le plus souvent racémiques. Néanmoins, des conditions de réaction douces peuvent être utiles pour la construction de composés non chiraux, et des études complémentaires sur la structure du catalyseur et les conditions de réaction pourraient fournir des variantes asymétriques utiles de ces réactions.

Les systèmes micellaires et nano-bâtonnets ont également donné des résultats prometteurs pour la réaction d'aldolisation asymétrique et méritent donc d'être étudié de façon plus approfondie. Pour les micelles, une étude avec des co-catalyseurs acides pourrait être conduite afin d'améliorer vitesse et stéréosélectivité. Quant aux nano-bâtonnets, ils fournissent déjà une réaction qui est sélective mais dont la cinétique doit être améliorée.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons, au cours de ce travail de thèse, étudié des nanostructures supramoléculaires obtenues par auto-assemblage d'amphiphiles diacétyléniques polymérisables pour des applications biomédicales et pour la catalyse. Deux grandes familles de composés, les micelles sphériques et les rubans en bicouche, ont été développés et valorisés pour la transfection intracellulaire d'ARN interférent, la catalyse de réactions de cycloadditions *in vitro*, ou encore l'induction asymétrique de réactions d'aldolisation.

Dans la première partie du travail, des micelles polydiacétyléniques ont été conçues de telle sorte qu'elles puissent lier un ARN interférent, le transporter à travers la membrane cytoplasmique et le délivrer dans le compartiment intracellulaire. Nous avons étudié de façon systématique la contribution des têtes polaires cationiques présentes à la surface de micelles polymérisées pour la prise en charge, le transfert et la libération des siARN. Plusieurs composés amphiphiles portant une tête cationique variable ont été synthétisés et évalués sur la lignée cellulaire HeLa. Le système d'administration micellaire a montré un comportement variable en fonction du motif cationique et les performances de transfection ont été rationalisées par i) la capacité des micelles à interagir avec les acides nucléiques, ii) la capacité des micelles à être internalisées, iii) la basicité des amines qui joue un rôle dans l'effet pompe à protons pour le relargage de la cargaison siARN. Un système (amine secondaire **II.10**) a montré une efficacité particulière avec toutefois une légère cytotoxicité associée à des rapports N/P élevés. Cependant, cet effet délétère a pu être évité en ajustant à la fois le rapport N/P et la concentration en siARN de telle sorte que le système soit pleinement opérationnel à N/P = 10 avec une concentration fixe en siARN de 5 nM.

Dans une deuxième partie, nous avons conçu un catalyseur micellaire capable de promouvoir la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen dans le compartiment intracellulaire de la lignée HeLa. Des nanoparticules de cuivre (I) ont été synthétisées puis encapsulées dans le cœur hydrophobe de micelles polymérisées dont la surface est constituée de motifs polyéthylèneglycol. La présence d'unités PEG neutres confère un caractère biocompatibilisant au vecteur nanométrique qui masque non seulement la toxicité potentielle du cuivre mais autorise également l'utilisation du système catalytique *in vitro*. La micelle se comporte en outre comme un nanoréacteur qui permet de concentrer les réactifs au voisinage du catalyseur et d'accélérer la transformation chimique. Nous avons mis en œuvre la réaction de click dans les cellules HeLa en utilisant une sonde profluorescente (3-azido-7-hydroxycoumarine) dont la particularité est d'émettre un signal de fluorescence amplifié une fois « clické ». Cette fluorescence a été mise à profit pour valider l'approche click *in vitro* par la visualisation du signal associé au conjugué qui se forme *in situ* par cycloaddition 1,3-dipolaire.

Dans le dernier chapitre, différents auto-assemblages photopolymérisés ont été formulés à partir d'un même amphiphile qui associe une chaîne hydrophobe diacétylénique à une tête polaire dérivée de la L-proline. Ainsi, des micelles sphériques et des nanorubans ont été produits et évalués comme organocatalyseurs semi-hétérogènes dans différentes transformations asymétriques. Bien que les deux systèmes soient réactifs pour la réaction d'aldolisation directe dans l'eau pure, nous avons concentré, pour la suite de notre étude, nos efforts sur les nanorubans qui sont les plus performants en termes de cinétique réactionnelle. Des rendements élevés (> 99 %), de bonnes diastéréosélectivités (jusqu'à 86 %) et énantiosélectivités (jusqu'à 89 %) ont été obtenus en présence de 5 % en moles de nanoruban en présence d'un activateur acide (acide benzoïque). L'assemblage se comporte également comme ici un nanoréacteur dans lequel la réaction a lieu et contribue favorablement au processus global en permettant, i) la dispersion des réactifs dans l'eau, ii) leur concentration près des sites actifs

du catalyseur, et iii) la séquestration des états de transition du milieu aqueux (réduisant ainsi les interférences du solvant). Le catalyseur peut être recyclé plusieurs fois sans aucune perte d'activité. Ce système nanoruban a également été appliqué aux réactions de Michael et de Mannich. Les produits correspondants ont été obtenus, mais malheureusement sous la forme d'un mélange racémique. Enfin, un dernier amphiphile combinant les groupement amine et acide carboxylique de la L-proline a été synthétisé, assemblé sous forme de nanobâtonnet, et évalué dans la catalyse de la réaction d'aldolisation asymétrique. Bien que la cinétique de la réaction soit plus lente par rapport au système nanoruban, des sélectivités sans précédent ont été obtenues ($dr = 95:5$ et $ee = 96\%$). Ce système semble donc prometteur mais nécessitera cependant des étapes d'optimisation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma–Aldrich and used without further purification. Reactions were carried out under nitrogen using dry solvents, unless otherwise stated.

THF was distilled from sodium/benzophenone before use. Dichloromethane was distilled from CaH_2 .

Photo-polymerization experiments were carried out using a 40 W low pressure mercury UV lamp (Heraeus) emitting light at a wavelength of 254 nm.

All degassed experiments were prepared by purging vacuum-nitrogen (5 cycles) and the reaction was conducted under an atmosphere of nitrogen.

Ultrasonic mixing was achieved using a Branson sonifier 550 equipped with a 3 mm tapered microtip (300 ms/s pulses, Output power 50%).

Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out using a Vasco Flex instrument from Cordouan Technologies equipped with a laser diode ($\lambda = 450$ nm). Zeta potential measurements were performed on a Wallis instrument from Cordouan Technologies equipped with a laser diode ($\lambda = 635$ nm).

Flash column chromatography was performed using the Teledyne Isco CombiFlash Rf flash chromatography and analytical TLC was performed on Merck precoated silica gel (60 F254); visualization was carried out with UV and/or heating with a solution of KMnO_4 in water and/or with a 5–7% solution of PMA in EtOH.

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE DPX 400 spectrometer. ^1H NMR spectra were recorded at 400 MHz and data are reported as follows: chemical shift in ppm from tetramethylsilane as internal standard, multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintuplet, m = multiplet or complex signals, coupling constant (J) in Hz, integration. ^{13}C NMR spectra were recorded at 100 MHz.

Electrospray mass spectra were obtained using an ESI-Quadripole autopurify, Waters (pump 2545, mass: ZQ2000) Mass Spectrometer.

IR-spectra were recorded using a Perkin-Elmer 2000 FT-IR. Wavenumbers are given in cm^{-1} at their maximum intensity.

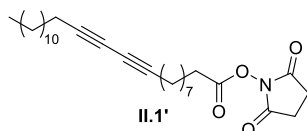
UV spectra were recorded on a Varian Carry 50 Scan UV-Vis in quartz cells.

Fluorescence analysis was performed on Fluoromax-4 from Horiba Jobin Yvon.

CHAPTER II : MICELLES POLYDIACÉTYLÉNIQUES POUR LA TRANSFECTION D'ARN INTERFÉRENT

I. Organic synthesis

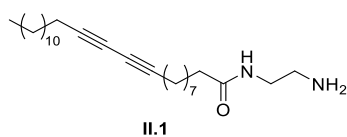
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl pentacos-10,12-diynoate (II.1')



Under N₂, 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.6 g, 8.35 mmol) was added to a solution of 10,12-pentacosadiynoic acid (2 g, 5.34 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.1 g, 9.56 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight and then poured into water. The aqueous phase was extracted three times with CH₂Cl₂. The organic phases were collected, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂) affording compound **II.1'** (2.4 g, 96%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.84 (s, 4H), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 1.79–1.69 (m, 2H), 1.56–1.46 (m, 4H), 1.45–1.19 (m, 26H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.3, 168.8, 77.7, 77.6, 65.4, 65.3, 32.0, 31.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.8, 28.5, 28.4, 25.7, 24.6, 22.8, 19.3, 19.3, 14.2 ppm.

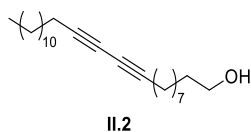
N-(2-aminoethyl)pentacosa-10,12-diynamide (II.1)

Under N₂, a solution of **II.1'** (500 mg, 1.06 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise to a solution of ethylene diamine (709 μ L, 10.6 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic phase was washed with water and brine before it was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 90:10:1) affording compound **II.1** (417 mg, 94%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (s, 1H), 3.30 (q, J = 5.8 Hz, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.25–2.16 (m, 6H), 1.62–1.25 (m, 32H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.6, 77.7, 77.6, 65.4, 65.3, 42.0, 41.5, 36.9, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.5, 28.4, 25.9, 22.8, 19.3, 19.3, 14.2 ppm.

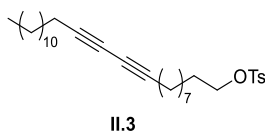
ESI-MS (ES⁺) 417.7 [M+H]⁺

Pentacosa-10,12-diyn-1-ol (II.2)

To a stirred suspension of lithium aluminum hydride (0.91 g, 20.02 mmol) in THF (100 mL), a solution of 10,12-pentacosadiynoic acid (5.00 g, 13.34 mmol) in THF (50 mL) was added at 0 °C under N₂ atmosphere. The resulting mixture was stirred for 90 min at room temperature. The reaction was quenched by adding 1 N HCl solution (25 mL) and the mixture concentrated to dryness under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 30 mL), and the combined organic layers washed with 1 N HCl (20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and evaporated under vacuum to afford **II.2** as a white solid (4.74 g, 98% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.63 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.58-1.25 (m, 34H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 77.7, 77.6, 65.4, 65.2, 63.2, 32.9, 32.1, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 28.2, 25.7, 22.6, 19.2, 14.1 ppm.

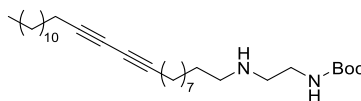
Pentacos-10,12-diynyl-4-methylbenzenesulfonate (II.3)

To a stirred solution of **II.2** (4.40 g, 12.20 mmol) in CH_2Cl_2 (60 mL) were successively added *p*-toluenesulfonyl chloride (3.49 g, 18.30 mmol), triethylamine (2.55 mL, 18.30 mmol), and catalytic amounts of DMAP. The resulting solution was stirred overnight at room temperature. A saturated solution of NaHCO_3 (25 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2×15 mL). The organic phases were combined, washed with a saturated solution of NaCl (15 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (CH_2Cl_2 100%) affording compound **II.3** (6 g, 96%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (dd, $J = 6.4$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 7.34 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 2H), 4.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.64 (m, 34H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 144.7, 133.5, 129.9, 128.0, 77.8, 77.6, 70.8, 65.5, 65.4, 32.1, 31.3, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 28.2, 25.4, 22.8, 21.8, 19.4, 14.3 ppm.

***tert*-butyl (2-(pentacosa-10,12-diyn-1-ylamino)ethyl)carbamate
(II.4)**

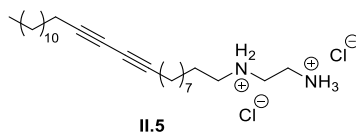


II.4

To a stirred solution of **II.3** (71.4 mg, 0.139 mmol) and Na_2CO_3 (73.5 mg, 0.693 mmol) in CH_3CN (3 mL) was added *N*-Boc-ethylenediamine (111 mg, 0.693 mmol). The solution was stirred at 70 °C for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was poured into a saturated solution of NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4 $\times$), and the organic layers were combined, washed with a saturated solution of NaCl , dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 90:10:1) affording compound **II.4** (36.5 mg, 52%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.7 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 3.28 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.61–1.15 (m, 41H), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

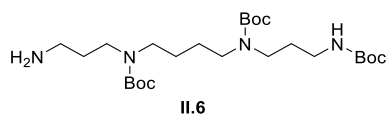
ESI-MS (ES^+) 503.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

***N*¹-(pentacosa-10,12-diyn-1-yl)ethane-1,2-diaminium chloride (II.5)**

To a stirred solution of **II.4** (36.5 mg, 0.073 mmol) in MeOH (2 mL) was added 104 μ L of acetyl chloride at 0 °C. After 1 h, stirring was stopped and the resulting precipitate was filtered off. Washing with acetonitrile followed by drying under vacuum affords the compound **II.5** (13.6 mg, 39%).

¹H NMR (400 MHz, Méthanol-d₄) δ 3.29 (s, 4H), 3.10–2.98 (m, 2H), 2.24 (td, *J* = 6.9, 2.5 Hz, 4H), 1.78–1.67 (m, 2H), 1.58–1.22 (m, 32H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm.

ESI-MS (ES⁺) 403.6 [M+H]⁺, 202.4 [M+2H]²⁺

***N*¹,*N*²,*N*³-tri-*tert*-BOC-spermine (II.6)**

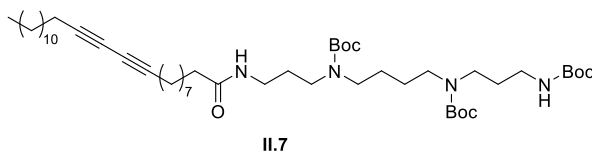
To a stirred solution of spermine (200 mg, 0.988 mmol) in MeOH at -78° C was added ethyl-trifluoroacetate (120 μ L, 1 mmol). The mixture was stirred for 1 h at -78°C followed by stirring for 1 h at 0 °C, to afford a mixture containing predominantly mono-trifluoroacétamide, but also di-trifluoroacétamide. Immediately, di-*tert*-butyldicarbonate (873 mg, 4 mmol) was added to this solution and stirring was continued for an additional hour at room temperature. The TFA protecting group was then cleaved by increasing the pH to 11 with aqueous ammonia and stirring for 15 h at room temperature, to afford, after purification by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 90:10:1), the desired compound **II.6** (188 mg, 38%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (bs, 27H), 1.42 (bs, 2H), 1.60 (bs, 4H), 2.67 (bs, 4H), 2.92–3.33 (m, 10H), 4.82 (s, 2H), 5.32 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155.9, 155.9, 155.8, 79.4, 46.6, 46.2, 44.3, 44.1, 43.6, 39.2, 38.4, 37.6, 37.2, 32.1, 30.5, 28.3 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 503.7 [M+H]⁺

***tert*-butyl (4-((*tert*-butoxycarbonyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)butyl)(3-(pentacos-10,12-diynamido)propyl)carbamate (II.7)**



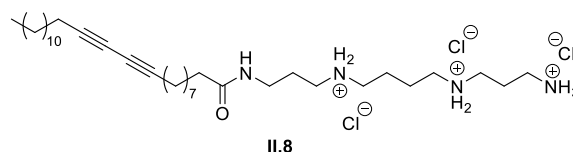
Compound **II.1'** (0.2 g, 0.414 mmol) and **II.6** (93 mg, 0.185 mmol) were dissolved in DCM (5 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under N₂. The organic phase was washed with water and brine before it was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) affording compound **II.7** (88 mg, 55%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.85 (s, 1H), 3.49–2.85 (m, 12H), 2.23–1.94 (m, 8H), 1.69–1.05 (m, 66H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 156.9, 154.6, 80.0, 79.9, 79.8, 77.7, 77.6, 66.4, 66.3, 48.0, 48.0, 46.4, 46.4, 39.1, 38.7, 36.4, 31.4, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.4, 29.4, 29.3, 29.1, 29.1, 29.0, 28.7, 28.7, 28.6, 28.6, 28.6, 28.5, 28.50, 27.6, 26.1, 26.1, 26.0, 22.7, 19.7, 19.6, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 860.1 [M+H]⁺

***N*¹-(3-ammoniopropyl)-*N*⁴-(3-(pentacos-10,12-diynamido)propyl)butane-1,4-diaminium chloride (II.8)**



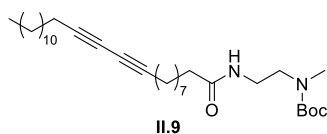
To a stirred solution of **II.7** (88 mg, 0.102 mmol) in MeOH (2 mL) was added acetyl chloride (0.15 mL) at 0°C. After 1 h, stirring was stopped and the resulting precipitate was filtered off. Washing with acetonitrile followed by drying under vacuum affords the compound **II.8** (46 mg, 67%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.73–7.31 (m, 7H), 4.13–2.78 (m, 12H), 2.66–1.74 (m, 14H), 1.68–1.10 (m, 33H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.9, 77.2, 77.1, 66.9, 66.9, 46.3, 46.3, 42.2, 41.5, 38.7, 37.9, 36.4, 31.8, 29.3, 29.3, 29.2, 29.2, 29.2, 29.1, 29.1, 29.0, 28.9, 28.9, 28.6, 28.3, 28.3, 26.4, 25.6, 25.5, 24.9, 24.9, 22.9, 18.7, 18.6, 14.3 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 559.9 [M+H]⁺, 280.6 [M+2H]²⁺, 187.4 [M+3H]³⁺

***tert*-butyl methyl(2-(pentacosa-10,12-diynoylamino)ethyl)carbamate (II.9)**



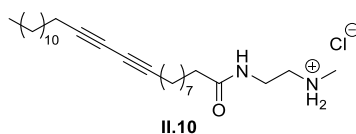
Under N₂, a solution of compound **II.1'** (200 mg, 0.42 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added dropwise to *N*-Boc-*N*-methylethylenediamine (111 mg, 0.63 mmol) diluted in 5 mL of CH₂Cl₂. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic phase was then washed with water and brine before it was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/AcOEt, 70:30) affording compound **II.9** (216 mg, 96%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.38 (s, 1H), 3.47–3.28 (m, 4H), 2.86 (s, 3H), 2.28–2.06 (m, 6H), 1.64–1.12 (m, 41H), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.8, 157.4, 80.1, 77.7, 77.6, 65.4, 65.3, 53.6, 47.5, 39.1, 36.9, 34.9, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.5, 28.5, 28.4, 25.8, 22.8, 19.3, 19.30, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 531.8 [M+H]⁺

***N*-methyl-2-(pentacosa-10,12-diynoylamino)ethanaminium chloride (II.10)**

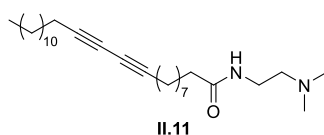


To a solution of the compound **II.9** (200 mg, 0.38 mmol) in MeOH (2 mL) was added, at 0 °C, acetyl chloride (536 μ L, 7.6 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was dispersed and centrifuged three times (10 000 $\times g$, 3 min) in Et₂O to afford compound **II.10** (156 mg, 89%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.32 (s, 2H), 7.72–7.62 (m, 1H), 3.75–3.63 (m, 2H), 3.35–3.23 (m, 2H), 2.80 (t, J = 5.0 Hz, 3H), 2.39–2.28 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.67–1.13 (m, 32H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 178.5, 77.8, 77.6, 65.4, 65.3, 50.0, 36.9, 36.1, 34.0, 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.9, 28.5, 28.4, 25.6, 22.8, 19.3, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 431.8 [M+H]⁺

***N*-(2-(dimethylamino)ethyl)pentacos-10,12-diynamide (II.11)**

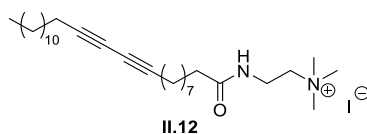
Under N₂, a solution of compound **II.1'** (500 mg, 1.06 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise to *N,N*-dimethylethylenediamine (232 μL, 6.36 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (10 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic phase was then washed with water and brine before it was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) affording compound **II.11** (446 mg, 95%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.11 (s, 1H), 3.39–3.25 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.30–2.11 (m, 12H), 1.67–1.14 (m, 32H), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.4, 77.7, 77.6, 65.4, 65.3, 58.1, 45.1, 36.8, 36.6, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.5, 28.4, 25.8, 22.8, 19.3, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 445.7 [M+H]⁺

***N,N,N*-trimethyl-2-(pentacosa-10,12-diynamido) ethan-1-aminium iodide (II.12)**



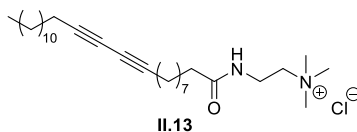
Under N₂, compound **II.11** (400 mg, 0.9 mmol) was stirred at room temperature for 3 days in iodomethane in excess (5 mL). Iodomethane solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) affording compound **II.12** (465 mg, 88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.94–3.72 (m, 4H), 3.46 (s, 9H), 2.34–2.15 (m, 6H), 1.69–1.12 (m, 32H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.0, 77.8, 77.6, 65.6, 65.4, 65.3, 54.7, 36.5, 34.3, 32.0, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.5, 28.4, 25.5, 22.8, 19.3, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES⁺) 459.8 [M]⁺, (ES⁻) 126.9 [I]⁻

***N,N,N*-trimethyl-2-(pentacosa-10,12-diynamido) ethan-1-aminium chloride (II.13)**



A 1 cm-diameter column was packed with 2.5 g of wet anion exchange Amberlyst A-26 resin (Cl form) and washed successively with water and with water-MeOH mixtures (25 mL of each solvent mixture) to reach pure MeOH. The compound **II.12** (21 mg, 0.036 mmol) in methanol (0.8 mL) was then passed slowly through the resin and further eluted with MeOH (25 mL). The solvent was evaporated to afford compound **II.13** (17.7 mg, 100%). ESI(-)-MS experiment qualitatively confirmed that iodine was no longer present in the sample.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.61 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.91–3.64 (m, 4H), 3.40 (s, 9H), 2.31–2.14 (m, 6H), 1.65–1.12 (m, 32H), 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.9, 77.7, 77.6, 65.6, 65.4, 65.3, 54.2, 36.3, 34.4, 32.0, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.4, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.5, 28.4, 25.5, 22.8, 19.3, 14.2 ppm.

ESI-MS (ES^+) 459.8 $[\text{M}]^+$, (ES^-) 35.0, 37.0 $[\text{Cl}]^-$

II. Synthesis and characterization of polymerized micelle

Unless otherwise specified, these procedures were applied to all the amphiphiles synthesized.

1. Assembly and dialysis of the micelles

Amphiphile (10 mg) was first protonated in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 80:20 (1 mL) and 37% HCl (1 μL). The solvent was evaporated under reduced pressure and a white solid was formed. The solid was then solubilized in 10 mM HCl (1 mL) and sonicated with an ultrasonic probe for 30 min. The solution was then subjected to UV irradiation at 254 nm for 5 h to yield a pale-yellow solution of photo-polymerized product. Deionized water was added to replace the volume that was lost by evaporation during the photo-polymerization process. The dialyses were performed in 3 000 MWCO dialysis membranes (Thermo Fisher) against a 1000 times larger volume of slightly acidic water (0.1% v/v of 37% HCl) over 7 days.

2. Critical Micelle Concentration (CMC) measurements

CMC values were measured using the pyrene inclusion method. This method takes advantage of the environment specific fluorescence of the pyrene probe, as a detection of organized lipidic environment. A set of dilutions were prepared from 10 mM stock solutions of micelles ranging from 2 mM to 1 μM . A 1 mM pyrene solution in DMSO (1 μL) of was added to each sample (1 mL) and stirred vigorously for 2 h before fluorescence measurement.

Fluorescence spectra were recorded at 339 nm UV excitation wavelength at 5 nm band pass. The relative fluorescence intensities at 373 nm and 384 nm were recorded and the $I_{373\text{nm}}/I_{384\text{nm}}$ ratios were plotted against log of mM concentrations. The CMC is deduced from the inflexion point.

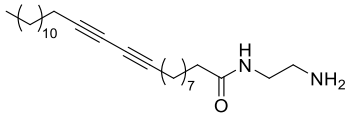
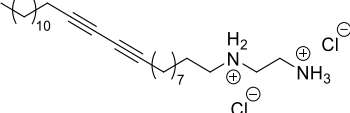
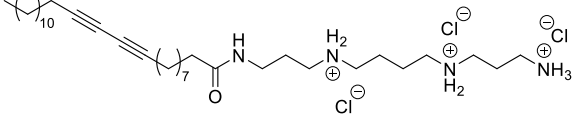
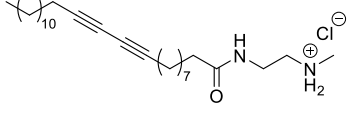
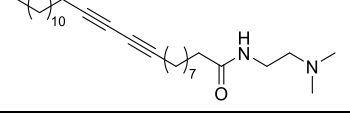
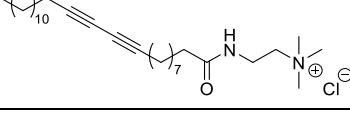
3. Size measurements by Dynamic Light Scattering (DLS)

Six acquisitions (60 s each) were performed on the polymerized micelle samples. The non-polymerized micelles are unstable and can't be analyzed by DLS. Mean hydrodynamic diameter values were summarized in Table 1.

4. Zeta potential measurements

Samples were introduced in a dedicated cuvette equipped with an electrode and measurements were performed under 7.2 mV electric field. The values of mean hydrodynamic diameter, zeta potential and CMC were summarized in Table 1.

Table 1. Mean hydrodynamic diameter, zeta potential and CMC values of synthesized micelles.

Micelle	Corresponding amphiphile	Mean hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)	CMC (mg mL ⁻¹)
II.1		6.6	29	0.06
II.2		7	Not measured	Not measured
II.8		7	Not measured	Not measured
II.10		6.5	16	0.03
II.11		9	15	0.03
II.13		7	33	0.01

5. Gel retardation assay

Complexes micelle@siRNA were prepared by mixing 20 pmol of scrambled (UNR) siRNA diluted in OptiMEM with varying amounts of micelles to achieve specific N/P ratios, ranging from 1 to 100. Four micelles **II.1**, **II.10**, **II.11** and **II.13** were used to form complexes. After 20 min of incubation, DNA loading buffer (Thermo Fisher) was added to the resulting complexes, and samples were loaded into a 2% (w/v) agarose gel containing 1 mM EDTA and 40 mM Tris acetate buffer pH 8.0 (TAE, Gibco). Sample migration was performed at 70 V for 80 min, and after electrophoresis, the gel was stained during 30 min with TAE buffer containing 0.5 µg mL⁻¹ ethidium bromide (Sigma-Aldrich). After two subsequent washes in TAE buffer, the complexes micelle@siRNA were detected with an UV Transilluminator (Vilber Lourmat) at 254 nm.

III. siRNA transfection and proliferation/survival assay

The human cervical adenocarcinoma Hela cell line (ATCC) was routinely grown in DMEM (Sigma) supplemented with 10% [v/v] Fetal Bovine Serum (PAA), Penicillin (100 UI mL⁻¹, Sigma) and Streptomycin (100 µg mL⁻¹, Sigma). For transfection purpose, siRNAs diluted in OPTIMEM (Gibco) were complexed with either our micelles at various N/P ratios, or with Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies), in collagen-coated (Rat tail collagen, Sigma), clear bottom, black-walled 384-well

culture plates (Greiner µClear plates, Cat# 781091). After 20 min of complexation, Hela cells were seeded on top of the complexes (1000 cells/well; final [siRNA] = 20 nM), and incubated for three days at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator (Forma Stericycle, Thermo). Plates were then fixed overnight with para-formaldehyde (4% [w/v] in PBS, Sigma), and nucleic acids were stained with Hoechst 33342 (2 µg mL⁻¹, Sigma). After a PBS wash, plates were imaged on a High Content Imaging device (Operetta HCS epifluorescence microscope, Perkin Elmer). Three fields per well were acquired at 10× magnification in the blue channel ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \pm 20$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 445 \pm 35$ nm). An automated algorithm was developed under Harmony 3.0 (Perkin Elmer) as described before.¹¹² Briefly, the algorithm segments nuclear Regions of Interest (ROI) based on the DNA-bound Hoechst fluorescence, then quantifies the total cell amount per well. All results were normalized to the untreated wells, and expressed as averaged results $\pm$ SD of four wells per condition. A pool of cytotoxic siRNAs (Allstars maximal death control, Qiagen) and a scrambled siRNA (UNR, target sequence: AAGCCGGTATGCCGGTTAAGT, Qiagen) were used as positive and negative phenotypic controls of transfection efficiencies, respectively.

IV. Optimization of transfection of micelle II.10 and characterization of complexes micelle II.10@siRNA

1. Optimization of transfection of micelle II.10

The procedure for siRNA transfection described above was used. However, the final siRNA concentration was varied from 1 to 10 nM.

2. Size distribution and zeta potential measurement of complexes micelle II.10@siRNA

Buffering solutions

All buffering solutions were prepared as described below.

- HBG pH 7.5 (10 mM Hepes, 10 mM Hepes-Na and 5% glucose w/v)
- HEPES pH 7.5 (10 mM Hepes, 10 mM Hepes-Na)

Sample preparation

Complexes were prepared by mixing 143 µL of micelles II.10 (7 mg mL⁻¹) with 250 µL of siRNA (20 µM) (N/P = 10) in a total volume adjusted to 1 mL with Hepes buffered glucose (pH 7.5). Recordings were performed after 20 minutes of incubation at room temperature.

DLS analysis

¹¹² R. El helou, G. Pinna, O. Cabaud, J. Wicinski, R. Bhajun, L. Guyon, C. Rioualen, P. Finetti, A. Gros, B. Mari, P. Barbry, F. Bertucci, G. Bidaut, A. Harel-Bellan, D. Birnbaum, E. Charafe-Jauffret and C. Ginestier. Cell Rep. 2017, 18, 2256.

After 20 min of incubation at room temperature, size distribution of the complexes was determined by DLS. Mean hydrodynamic diameter value of 80 nm was recorded for the complexes micelle **II.10**@siRNA (Figure 98a).

Zeta potential measurement

The same complexes produced for DLS analysis were submitted to zeta potential measurement. Samples were introduced in a dedicated cuvette equipped with an electrode and measurements were performed under 7.2 mV electric field. Value of 8 mV was found.

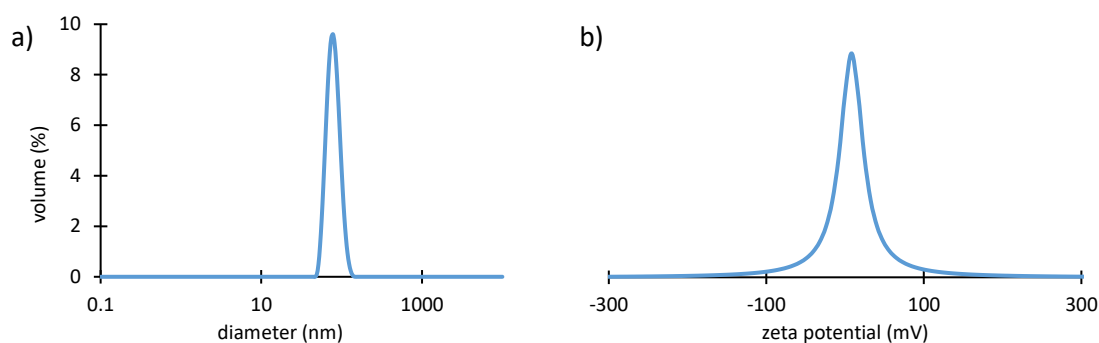


Figure 98. (a) DLS and (b) zeta potential profile of complexes micelle **II.10**@siRNA.

3. Cellular uptake of complexes micelle@siRNA

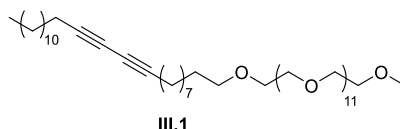
Hela cells were reverse transfected with complexes micelle@siRNA in 16-well glass Chamber Slides (Labtek Cat#178599, Nunc) to achieve an N/P ratio of 10 and a final siRNA concentration of 10 nM. Micelles **II.1**, **II.10**, **II.11** and **II.13** were used to form complexes. Two different siRNAs were transfected, either our scrambled negative control siRNA (UNR), or an irrelevant sequence coupled to Alexa 488 fluorophore (AllStars Neg. siRNA AF 488, Cat# 1027292, Qiagen). 12 h post transfection, cells were fixed for 20 min with paraformaldehyde (4% [w/v] in PBS), and nucleic acids were stained with Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The Labtek media chambers were then removed, and the glass slides were mounted on coverslips using mounting medium (Shandon Immu-mount, Thermo). Image acquisition of fixed cells was performed with a Nikon A1 confocal microscope with a frame size of 512 $\times$ 512 pixels, using a $\times 20$ (0.8 NA) objective, and Galvano lasers at 405 and 488 nm for illumination of Hoechst and Alexa 488 dyes, respectively. For quantification of a high number of cells, mosaics of 6 $\times$ 6 pictures were assembled with 15% stitching. Pictures acquired in the various fluorescence channels were then overlaid under ImageJ (Fiji)¹¹³.

¹¹³ Schindelin, J. et al. Nat. Methods 9, 676–682 (2012).

CHAPTER III : MICELLES PDA POUR LA CATALYSE *IN VITRO*

I. Organic synthesis

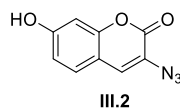
DAPEG₅₅₀ (III.1)



Under nitrogen, polyethyleneglycol monomethyl ether (MW = 550, 70 mg, 0.13 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to a suspension of sodium hydride (6 mg, 0.26 mmol) in dry THF (2 mL). The mixture was refluxed for 30 min and allowed to cool down to room temperature. Compound **II.3** (268 mg, 0.52 mmol) in tetrahydrofuran (2 mL) was then slowly added and the reaction was stirred at room temperature for 96 h. After concentration under vacuum, purification by column chromatography (DCM/MeOH 95:5) afforded the compound **III.1** (47 mg, 40%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80–3.45 (m, 44H), 3.33 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 1.57–1.45 (m, 6H), 1.37–1.17 (m, 28H), 0.83 (t, *J* = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 77.4, 77.3, 72.5, 71.9, 70.7–70.2, 70.3, 70.0, 65.3, 65.2, 61.6, 58.9, 31.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, 28.7, 28.3, 26.0, 22.6, 19.1, 14.0 ppm.

3-Azido-7-hydroxycoumarin (III.2)

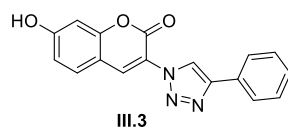
A mixture of 2,4-dihydroxy benzaldehyde (2.76 g, 20 mmol), *N*-acetylglycine (2.34 g, 20 mmol), anhydrous sodium acetate (60 mmol) in acetic anhydride (100 mL) was refluxed under stirring for 4 h. The reaction mixture was poured onto ice to give a yellow precipitate. After filtration, the yellow solid was washed by ice water before it was refluxed in a solution of conc. HCl and ethanol (2:1, 30 mL) for 1 h, then ice water (40 mL) was added to dilute the solution. The solution was then cooled in an ice bath and NaNO₂ (40 mmol) was added. The mixture was stirred for 5-10 min and NaN₃ (60 mmol) was added in portions. After stirring for another 15 min, the resulting precipitate was filtered off, washed with water, and dried under reduced pressure to afford compound **III.2** (2.2 g, 54% overall). The product was pure enough for further reactions.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 6.79 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.56 (s, 1 H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 161.0, 158.0, 153.4, 128.7, 128.5, 121.8, 114.5, 112.0, 102.7 ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Org. Lett.* 6, **2004**, 4603–4606).

7-hydroxy-3-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromen-2-one
(III.3)



In a mixture of phenylacetylene (18 mg, 0.17 mmol) and compound **III.2** (34.5 mg, 0.17 mmol) in water and ethyl alcohol (v/v = 1:1, 5 mL), a freshly prepared 1 M sodium ascorbate aqueous solution (34 μ L, 0.034 mmol) was added, followed by the addition of copper (II) sulfate pentahydrate 7.5% in water (28 μ L, 0.0085 mmol). The heterogeneous mixture was stirred vigorously overnight in the dark at room temperature. Ethanol was removed and the residue was diluted with water (5 mL), cooled in ice, and then the precipitate was collected by filtration. After washing the precipitate with cold water (10 mL), it was dried under vacuum to afford 43.6 mg of compound **III.3** (84%)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.87 (m, 6.89, 2 H), 7.38 (m, 1 H), 7.44 (t, J = 6.77 Hz, 2 H), 7.52 (d, J = 8.27 Hz, 1 H), 8.63 (s, 1 H), 8.98 (s, 1 H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Org. Lett.* **6**, **2004**, 4603–4606).

II. Formation of catalysts and reagents

1. Synthesis and characterization of pDAPEG₅₅₀ micelles

DAPEG₅₅₀ (10 mg) was dissolved in deionized water (1 mL) yielding a solution that was probe-sonicated (300 ms pulses per second, 25 W output power) for 10 min. The solution was then subjected to UV light (254 nm, low pressure mercury UV lamp, Heraeus) irradiation for 4 h to yield pDAPEG₅₅₀ micelles. The micelles pDAPEG₅₅₀ displayed a mean hydrodynamic diameter of *ca.* 9 nm, as determined by dynamic light scattering (DLS) measurements (Figure 99).

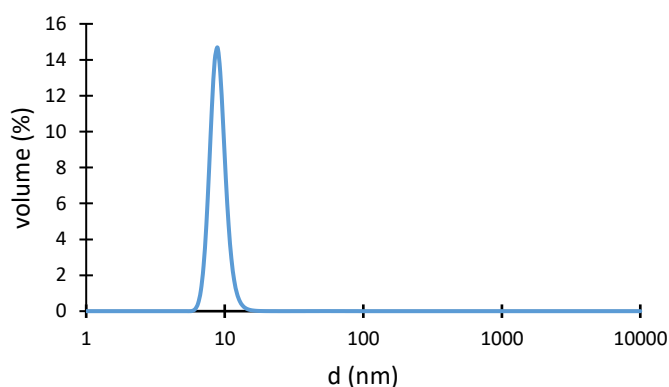


Figure 99. DLS profile of micelle pDAPEG₅₅₀.

2. Synthesis and characterization of Cu₂O nanoparticles

Cu₂O nanoparticles were prepared according to the procedure reported by O'Brien et al. (*J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9506). Briefly, 122 mg of copper(I) acetate (1 mmol) was mixed with of oleic acid (1 mL) and trioctylamine (5 mL) under a nitrogen flow. The reaction mixture was heated to 180 °C and kept at this temperature for 1 h to afford a grey colloid. This colloid was then quickly heated to 270 °C. The grey color changed to deep red and the reaction mixture was stirred at 270 °C for 1 h. After cooling to room temperature, ethanol (25 mL) was added and the precipitate was separated by centrifugation (8000 rpm, 10 min). The obtained nanoparticles were re-dispersed in hexane (15 mL) to provide a dark red solution the color of which evolved to deep green through formation of Cu₂O nanoparticles.

Cu₂O nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) and found to be spheroidal with a mean diameter of 8.6 ± 1.8 nm.

3. Encapsulation of Cu₂O nanoparticles in micelles

Cu₂O nanoparticles in hexane (0.1 M, 500 μ L) were added to a solution of micelles (pDAPEG₅₅₀ or pDAPEG₂₀₀₀, 10 mg mL⁻¹, 1 mL) and sonicated until hexane evaporation (*ca.* 30 min). The clear deep green colloid was then filtered on a 0.22 μ m membrane.

ICP-MS measurements allowed the determination of a 6.4 mM copper content in pDAPEG₅₅₀ micelles.

Dynamic light scattering (DLS) showed an average diameter of ca. 30 nm for Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ (Figure 100).

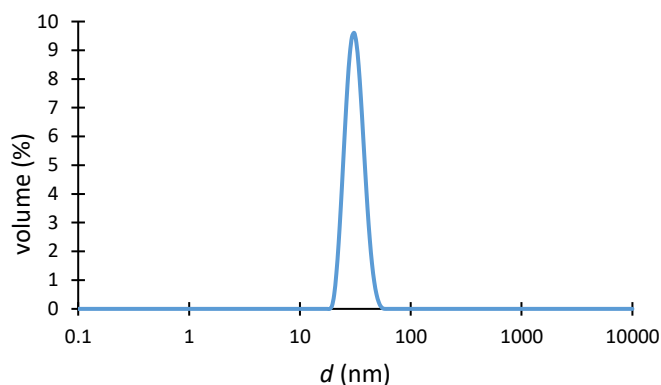


Figure 100. DLS profile of the catalyst Cu₂O@pDAPEG₅₅₀.

4. Encapsulation of reagents in micelles

A solution of compound **III.2** (2 mg), phenylacetylene (10 mg) or triazole product **III.3** (1 mg) in acetone (100 μ L) was prepared. This solution was then added to the micelles solution (1 mL, 10 mg mL⁻¹) and the mixture was sonicated for 30 min (3 $\times$ 10 min). This step led to the encapsulation of these compounds in the core of the polymerized micelles. After sonication, acetone was totally evaporated, and a filtration step was carried out to remove compound residues that were not encapsulated.

Concentration of the encapsulated compound was determined by using UV-absorption spectroscopy. Firstly, solutions of encapsulated compounds in methanol were prepared. For compound **III.2**, 50 μ L of the solution containing **III.2** encapsulated was diluted in 5 mL of methanol. For phenylacetylene and the triazole **III.3**, 100 μ L of the solution containing encapsulated compound were diluted in 5 mL of methanol. Absorption intensity of these solutions was then measured, and the concentration was deduced from a calibration curve obtained from the corresponding compound.

The solutions obtained after encapsulation of reagents and catalyst inside micelles will be used as stock solution for other studies.

III. Evaluation of the click reaction in vial

1. Evaluation of the click reaction at high dilution

Firstly, stock solutions of 3-azido-7-hydroxycoumarin **III.2** (10 mM) and phenylacetylene (10 mM) in DMSO were prepared. Then, the catalyst Cu₂O@pDAPEG₅₅₀ (5 μ L, 32 nmol Cu), **III.2** in DMSO (5 μ L, 50 nmol) and phenylacetylene in DMSO (5 μ L, 50 nmol) were mixed in water (485 μ L), at 37 °C. After a period of time, the reaction mixture was submitted to UPLC. The changes of fluorescence of the reaction mixture was also detected by fluorescence spectrometer.

2. Evaluation of the click reaction with encapsulated reagents

Briefly, the catalyst $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ (1.2 μL , 7.7 nmol Cu), **III.2**@ $p\text{DAPEG}_{550}$ (1 μL , 3.72 nmol **III.2**) and Ph@ $p\text{DAPEG}_{550}$ (2.8 μL , 3.75 nmol phenylacetylene) were mixed in water (495 μL), at 37 °C. The changes of fluorescence of the reaction mixture was detected by fluorescence spectrometer.

IV. Evaluation of the click reaction in living cell

Preparation of micelle solution for biological study:

For control experiments: stock micelle solution (empty micelle, **III.2**@ $p\text{DAPEG}_{550}$, Ph@ $p\text{DAPEG}_{550}$ and $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$, [micelle] = 10 mg mL^{-1}) (150 μL) was diluted in 4850 μL of OptiMEM.

For the click reaction: the solution of catalyst in OptiMEM was prepared by mixing 45 μL of the stock $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$ ([micelle] = 10 mg mL^{-1}) and 4955 μL of OptiMEM. The reaction mixture in OptiMEM was prepared by mixing 75 μL of stock Ph@ $p\text{DAPEG}_{550}$ ([micelle] = 10 mg mL^{-1}) and 30 μL of stock **III.2**@ $p\text{DAPEG}_{550}$ ([micelle] = 10 mg mL^{-1}) with 4895 μL of OptiMEM.

Click reaction in living cell

For this study, Hela cells were seeded in 96-well plates (100 μL /well) at 5 000 cells/well and incubated at 37 °C, 5% CO_2 for 24 h to allow cell adhesion to the well bottom.

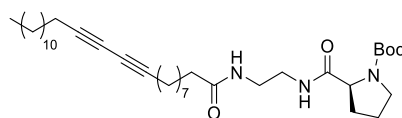
For control experiments, 50 μL of the prepared micelle solutions in OptiMEM (empty micelle, **III.2**@ $p\text{DAPEG}_{550}$, Ph@ $p\text{DAPEG}_{550}$ and $\text{Cu}_2\text{O}@p\text{DAPEG}_{550}$) or OptiMEM alone (50 μL) were layered on top of the culture wells. Plates were then incubated for 3 or 24 h. After that, cells were washed with PBS twice and the fluorescence images were collected using a high content imaging device (Operetta microscope). Cellular fluorescence intensity was quantitated as the integrated nuclear fluorescence in cellular regions of interest.

For the click reaction, 50 μL of the solution of the catalyst diluted in OptiMEM were first added to the culture wells, and cells were incubated for 3 h. Supernatants were then removed and cells were washed three times with PBS to eliminate extracellular nanoparticles. The wells were replaced with 100 μL of fresh medium and 50 μL of the reaction mixture in OptiMEM (**III.2**@ $p\text{DAPEG}_{550}$ and Ph@ $p\text{DAPEG}_{550}$) were added. Plates were then incubated for 3 or 24 h, then treated and analyzed the same way as control experiments.

CHAPTER IV : DES ASSEMBLAGES PDA POUR LA CATALYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE DE RÉACTIONS D'ALDOLISATION DANS L'EAU

I. Organic synthesis

***tert*-Butyl-2-((2-(pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate**



Under N₂, compound **II.1** (600 mg, 1.44 mmol) (its preparation was reported in Chapter II), *N*-Boc-L-proline (309 mg, 1.44 mmol), EDC-HCl (300 mg, 1.58 mmol), and HOBt (330 mg, 2.16 mmol) were dissolved in 12 mL of anhydrous CH₂Cl₂. NEt₃ (600 μL, 4.32 mmol) was then added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 24 h before the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). The protected proline adduct was obtained as a colorless solid (842 mg, 96% yield).

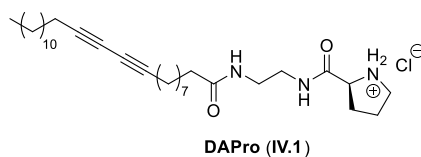
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.81 (bs, 1H), 6.34 (bs, 1H), 4.13–4.11 (m, 2H), 3.38–3.24 (m, 6H), 2.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.03–1.89 (m, 1H), 1.82–1.79 (m, 2H), 1.57–1.49 (m, 2H), 1.47–1.14 (m, 39 H), 0.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 192.9, 174.0, 173.4, 80.5, 77.4, 77.3, 65.3, 65.2, 60.5, 47.2, 39.7, 39.5, 36.6, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 28.9, 28.8, 28.4, 28.4, 28.3, 25.7, 24.6, 22.7, 19.2, 14.1 ppm.

IR (cm⁻¹) 3300, 2925, 2853, 1649, 1545, 1391.

ESI-MS (ES)⁺ 614.8 [M+H]⁺

2-((2-(Pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)carbamoyl)pyrrolidin-1-ium chloride (IV.1)



The above prepared *tert*-Butyl-2-((2-(pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (671 mg, 1.09 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (5.5 mL). After 2 h at room temperature, dioxane was evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10). Compound **IV.1** was obtained as a pale yellow waxy solid (449 mg, 80% yield).

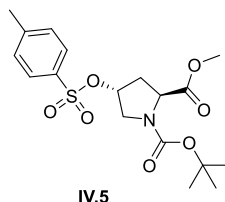
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (bs, 1H), 4.41 (bs, 1H), 3.42–3.23 (m, 6H), 2.41–2.39 (m, 1H), 2.17 (t, *J* = 7 Hz, 6H), 2.01–1.95 (m, 3H), 1.52–1.39 (m, 6H), 1.29–1.18 (m, 28H), 0.81 (t, *J* = 7 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.7, 170.1, 77.6, 77.3, 65.3, 65.2, 60.1, 46.7, 39.8, 39.0, 36.5, 31.9, 30.3, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 29.0, 28.9, 28.4, 25.8, 24.6, 22.7, 19.2, 14.1 ppm.

IR (cm⁻¹) 3251, 3072, 2923, 2853, 1643, 1550, 1455.

ESI-MS (ES)⁺ 514.9 [M+H]⁺

1-*tert*-butyl 2-methyl (2*S*,4*R*)-4-(((4-methylphenyl)sulfonyl)oxy)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.5)



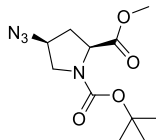
To a solution of 1-*tert*-butyl 2-methyl (2*S*, 4*R*)-4-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate (5.12 g, 20.8 mmol) in DCM (35 mL) was added trimethylamine (8.6 mL, 61.7 mmol). The solution was cooled to 0 °C and after the addition of tosyl chloride (8.56 g, 44.9 mmol) the solution was stirred at room temperature for 20 h. Then saturated sodium bicarbonate was added (35 mL). The resulted solution was extracted with DCM (3 × 100 mL). The combined organic layer were dried over MgSO₄. The solvent was removed under vacuum and the residue was passed through a short pad of silica eluting with EtOAc and cyclohexane 1:1 ratio. The resulted solution was concentrated in vacuum and the crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 80:20) affording compound **IV.5** (5.2 g, 63%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72–7.70 (m, 2H), 7.31–7.28 (m, 2H), 4.99–4.94 (m, 1H), 4.34–4.28 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.57–3.48 (m, 2H), 2.50–2.43 (m, 0.5 H), 2.39–2.31 (m, 0.5 H), 1.35 (s, 4.5H) 1.32 (s, 4.5H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 172.9, 154.3, 153.6, 145.7, 133.9, 133.7, 130.4, 127.9, 80.1, 79.1, 78.7, 57.6, 57.3, 52.6, 52.3, 52.4, 51.9, 37.5, 36.1, 28.6, 28.5, 21.9 ppm.

ESI-MS (ES)⁺ 400.5 [M+H]⁺

**1-*tert*-butyl 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidine-1,2-dicarboxylate
(IV.6)**



IV.6

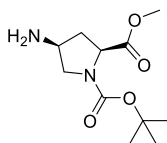
The compound **IV.5** (2 g, 5 mmol) and NaN₃ (878 mg, 13.5 mmol) were stirred in dry DMF (200 mL) at 45–55 °C overnight. The solvent was evaporated, and the residue was taken up with ethyl acetate (15 mL) and H₂O (8 mL). After separation of the layers, the organic phase was washed with H₂O until it was neutral and then successively with HCl (0.1 N) and brine. The mixture was dried over MgSO₄, filtered, and the solvent was removed under vacuum. NMR of the crude mixture showed good purity of compound **IV.6**. The product was used without further purification (990 mg, 73%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.40 (m, 1H), 4.23–4.10 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.77–3.67 (m, 1H), 3.57–3.41 (m, 1H), 2.58–2.38 (m, 1H), 2.27–2.11 (m, 1H), 1.49 (s, 4.5 H), 1.44 (s, 4.5H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 171.9, 154.0, 153.4, 80.5, 59.3, 58.3, 57.7, 57.4, 52.3, 51.3, 50.8, 36, 35.1, 28.3 ppm.

NMR data are in agreement with the literature (Chem. Eur. J., **2012**, 18, 13320–13330).

1-*tert*-butyl 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-aminopyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.7)



IV.7

A mixture of compound **IV.6** (0.95 g, 3.51 mmol) and PPh_3 (1.379 g, 5.26 mmol) in THF (8.5 mL) and water (0.4 mL) was stirred at 50 °C for 16 h. Purification with column chromatography using DCM/MeOH (20:1) afforded the compound **IV.7** (810 mg, 94%).

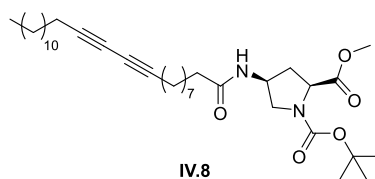
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.34–4.18 (m, 1H), 3.73 and 3.72 (2s, 3H), 3.70–3.58 (m, 1H), 3.56–3.43 (m, 1H), 3.29–3.16 (m, 1H), 2.51–2.35 (m, 1H), 1.84–1.73 (m, 1H), 1.44 and 1.39 (2s, 9H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.0, 173.9, 154.5, 153.8, 80.3, 80.2, 58.4, 58.0, 55.6, 55.1, 52.4, 52.2, 51.3, 50.5, 39.6, 38.9, 28.5, 28.4 ppm.

ESI-MS (ES) $^+$ 245.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

NMR data are in agreement with the literature (Chem. Eur. J., **2012**, 18, 13320–13330).

1-*tert*-butyl 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(pentacosadiynoylamino)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate (IV.8)

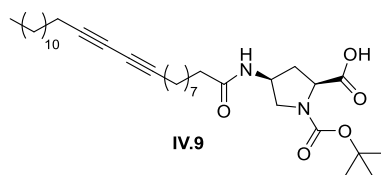


10,12-pentacosadiynoic acid (618 mg, 1.65 mmol), compound **IV.7** (611 mg, 2.5 mmol), EDC-HCl (479 mg, 2.5 mmol) and HOBt (2.5 mmol) were dissolved in anhydrous DCM under nitrogen atmosphere. To the solution, triethylamine (627 μ L, 4.5 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 16 h. Then reaction mixture was concentrated under vacuum and the crude residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH, 97:3) affording compound **IV.8** (910 mg, 92%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (dd, $J = 42.1, 9.0$ Hz, 1H), 4.70–4.58 (m, 1H), 4.30 (ddd, $J = 35.6, 10.0, 2.0$ Hz, 1H), 3.76 and 3.78 (2s, 3H), 3.63–3.24 (m, 2H), 2.52–2.33 (m, 1H), 2.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.18 – 2.05 (m, 2H), 1.98–1.82 (m, 1H), 1.65–1.14 (m, 41H), 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.3, 175.1, 172.6, 172.5, 154.3, 153.6, 80.8, 80.7, 77.7, 77.4, 65.4, 65.3, 57.8, 57.7, 53.8, 53.1, 52.8, 52.5, 48.7, 47.7, 36.9, 35.9, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.9, 28.5, 28.4, 28.3, 25.6, 22.8, 19.3, 19.3, 14.2 ppm.

(2*S*,4*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-(pentacosa-10,12-diynoylamino)pyrrolidine-2-carboxylic acid (IV.9)



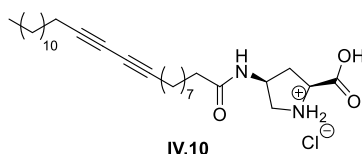
LiOH (55.8 mg, 2.33 mmol) was added to a solution of compound **IV.8** (800 mg, 1.33 mmol) in methanol (14 mL) and water (1.6 mL) at -5 °C with stirring. The reaction temperature was then allowed to rise to room temperature. After the mixture was stirred for 2 days, the solvents were evaporated *in vacuo* at room temperature, and the residue was dissolved in DCM. The pH of the solution was adjusted carefully to pH 5-6 with 10% KHSO₄. The organic phase was washed with brine. All the aqueous phases were extracted with DCM three times. The combined organic phase was dried over MgSO₄. After filtration, the solvent was evaporated *in vacuo*. Purification by column chromatography DCM/MeOH (90:10) afforded the compound **IV.9** (550 mg, 80%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (s, 1H), 4.80 – 4.20 (m, 2H), 3.68 – 3.18 (m, 2H), 2.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 2.08 (s, 2H), 1.78 – 1.05 (m, 42H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.9, 173.7, 155.1, 80.4, 77.7, 77.7, 66.4, 66.3, 57.9, 50.7, 50.3, 36.8, 35.4, 31.9, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.4, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 29.0, 28.9, 28.3, 28.3, 28.3, 25.8, 22.7, 19.5, 19.4, 14.1 ppm.

ESI-MS (ES)⁺ 587.9 [M+H]⁺

(2S,4S)-2-carboxy-4-(pentacosa-10,12-diynoylamino)pyrrolidinium chloride (IV.10)

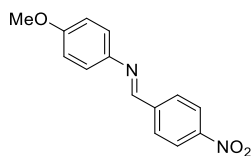


Compound **IV.9** (253 mg, 0.43 mmol) was dissolved 4 M HCl in dioxane (2 mL). The reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 24 h. A white glassy precipitate was formed. The solvent (dioxane) was removed under vacuum. The resulting residue was dissolved in a minimum amount of MeOH and diethylether was gradually added to the solution to precipitate the product out. The suspension was then transferred to an Eppendorf tube and centrifuged (10000 $\times g$, 3 min). The supernatant was removed and the white precipitate was again dispersed in diethylether. The Eppendorf tube was centrifuged one more time. The whole washing-centrifugation process was repeated again. The final white precipitate was dried overnight under vacuum, affording compound **IV.10** (205 mg, 91%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.80–4.40 (m, 2H), 4.0–3.5 (m, 2H), 3.0–2.0 (m, 8H), 1.78–1.05 (m, 34H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.1, 77.7, 77.4, 65.5, 65.4, 59.6, 49.9, 48.3, 36.4, 33.9, 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.1, 29.1, 28.6, 28.6, 25.8, 22.8, 19.4, 14.3 ppm.

ESI-MS (ES) $^+$ 487.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

***N*-(4-methoxyphenyl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine**

In a round-bottom flask, *p*-anisidine (123 mg, 1 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL). Anhydrous magnesium sulfate (400 mg, 3.3 mmol) was added, followed by addition of 4-nitrobenzaldehyde (151 mg, 1 mmol). The reaction was allowed to stir overnight and was then filtered, and the solvent removed in vacuo. The yellow solid obtained was then washed with pentane and brought to dryness under vacuum (204 mg, 80%).

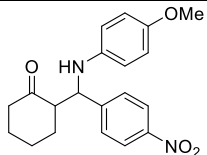
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (s, 1H), 8.36–8.27 (m, 2H), 8.12–8.00 (m, 2H), 7.37–7.28 (m, 2H), 7.00–6.90 (m, 2H), 3.85 (s, 3H) ppm.

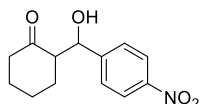
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.3, 154.8, 149.0, 143.6, 142.0, 129.1, 124.0, 122.6, 114.6, 55.5 ppm.

Spectral data is consistent with the literature (Green Chemistry, **2009**, 11, 166-168).

Analytical data for aldol, Mannich and Michael product

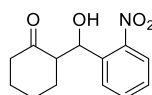
IV.4	Structure	¹ H NMR (CDCl ₃ , -CHOH, δ)		HPLC			
		<i>syn</i>	<i>anti</i>	Column	Eluent	<i>syn</i> (min)	<i>anti</i> (min)
IV.4aa		5.48 (d) (<i>J</i> = 1.8 Hz)	4.90 (d) (<i>J</i> = 8.4 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 90:10 (1 mL/min)	12.61 13.71	14.67 (major) 17.52 (minor)
IV.4ab		5.95 (d) (<i>J</i> = 2.1 Hz)	5.44 (d) (<i>J</i> = 7.2 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 98:2 (1.5 mL/min)	9.80 11.08	16.20 (major) 17.71 (minor)
IV.4ac		5.46 (d) (<i>J</i> = 2.2 Hz)	4.89 (d) (<i>J</i> = 8.5 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 90:10 (1 mL/min)	10.99 11.41	12.82 (major) 15.29 (minor)
IV.4ad		5.44 (br s)	4.84 (d) (<i>J</i> = 8.6 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 98:2 (1.5 mL/min)	16.75 18.18	21.92 (major) 23.51 (minor)
IV.4ae		5.35 (d) (<i>J</i> = 2.4 Hz)	4.76 (d) (<i>J</i> = 8.7 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 95:5 (1 mL/min)	8.65 8.95	11.42 (major) 14.13 (minor)
IV.4af		5.34 (d) (<i>J</i> = 2.6 Hz)	4.75 (d) (<i>J</i> = 8.7 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 98:2 (1.5 mL/min)	8.63 8.84	12.16 (major) 14.92 (minor)
IV.4ag		5.41 (d) (<i>J</i> = 2.6 Hz)	4.82 (d) (<i>J</i> = 8.1 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 90:10 (1 mL/min)	12.73 14.51	15.38 (major) 18.66 (minor)
IV.4ah		5.39 (d) (<i>J</i> = 2.4 Hz)	4.79 (d) (<i>J</i> = 8.8 Hz)	CHIRAPAK IA 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 98:2 (1 mL/min)	17.55 28.61	33.14 (minor) 34.77 (major)
IV.4ai		5.32 (d) (<i>J</i> = 1.8 Hz)	4.74 (d) (<i>J</i> = 8.9 Hz)	CHIRAPAK IA 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 95:5 (2 mL/min)	8.69 10.11	14.64 (minor) 16.33 (major)
IV.4aj		5.38 (d) (<i>J</i> = 2.1 Hz)	4.78 (d) (<i>J</i> = 8.1 Hz)	CHIRAPAK IA 250×4.6 mm	CO ₂ /MeOH 95:5 (4 mL/min)	8.01 19.80	10.47 (major) 12.10 (minor)
IV.4ak		5.57 (d) (<i>J</i> = 1.99 Hz)	4.97 (d) (<i>J</i> = 8.8 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 95:5 (1 mL/min)	11.70 12.80	16.32 (major) 18.64 (minor)
IV.4ba		5.41 (brs)	4.84 (d) (<i>J</i> = 9.0 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 90:10 (1 mL/min)	13.06 15.43	16.60 (major) 18.22 (minor)
IV.4ca		5.30 (brs)	4.92 (d) (<i>J</i> = 7.4 Hz)	CHIRAPAK AD-RH 150×4.6 mm	(H ₂ O+0.1% TFA) / (ACN+0.1% TFA) 40:60 (1 mL/min)	6.50 (minor) 15.74 (major)	9.717 12.037
IV.4da		-	-	CHIRAPAK AD-RH 150×4.6 mm	(H ₂ O+0.1% TFA) / (ACN+0.1% TFA) 70:30 (1 mL/min)	16.39 (major)	20.25 (minor)
IV.4ea		-	-	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 90:10 (1 mL/min)	9.18 (major)	9.89 (minor)
		3.78 (td) (<i>J</i> = 9.9, 4.5 Hz)	4.03 (m)	CHIRAPAK IA 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 99:1 (2 mL/min)	17.434 26.666	20.497 24.814

	4.78 (d) (<i>J</i> = 4.3 Hz)	4.63 (d) (<i>J</i> = 5.7 Hz)	CHIRAPAK IB 250×4.6 mm	Hexane/2-PrOH 95:5 (1.5 mL/min)	29.308 37.916	26.143 27.587
---	----------------------------------	----------------------------------	---------------------------	---------------------------------------	------------------	------------------

2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4aa)

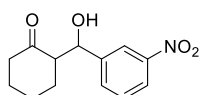
¹H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.90 (dd, *J* = 8.4, 3.0 Hz, 1H), 4.08 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 2.68–2.54 (m, 1H), 2.54–2.44 (m, 1H), 2.46–2.28 (m, 1H), 2.19–2.05 (m, 1H), 1.91–1.76 (m, 1H), 1.77–1.48 (m, 3H), 1.45–1.30 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5383).

2-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ab)

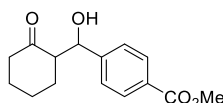
¹H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl₃) δ 7.90–7.78 (m, 1H), 7.80–7.72 (m, 1H), 7.68–7.58 (m, 1H), 7.47–7.37 (m, 1H), 5.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.17 (s, 1H), 2.95–2.65 (m, 1H), 2.53–2.23 (m, 2H), 2.19–1.99 (m, 1H), 1.94–1.45 (m, 5H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734).

2-(Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ac)

¹H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl₃) δ 8.40–7.95 (m, 2H), 7.79–7.39 (m, 2H), 4.89 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 2.72–2.21 (m, 3H), 2.19–1.96 (m, 1H), 1.91–1.76 (m, 1H), 1.74–1.46 (m, 3H), 1.45–1.29 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734).

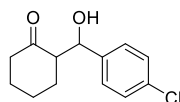
Methyl 4-(hydroxy(2-oxocyclohexyl)methyl)benzoate (IV.4ad)

¹H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.84 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 4.02 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.66–2.55 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.43–2.30

(m, 1H), 2.15–2.05 (m, 1H), 1.86–1.74 (m, 1H), 1.73–1.61 (m, 1H), 1.59–1.48 (m, 2H), 1.40–1.24 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

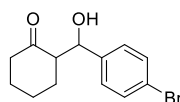
2-((4-Chlorophenyl)(hydroxy)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ae)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.38–7.19 (m, 4H), 4.76 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 2.62–2.41 (m, 2H), 2.42–2.28 (m, 1H), 2.17–1.98 (m, 1H), 1.90–1.74 (m, 1H), 1.74–1.46 (m, 3H), 1.37–1.18 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

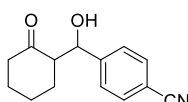
2-((4-Bromophenyl)(hydroxy)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4af)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.52–7.41 (m, 2H), 7.24–7.14 (m, 2H), 4.75 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.62–2.42 (m, 2H), 2.42–2.28 (m, 1H), 2.16–2.04 (m, 1H), 1.90–1.76 (m, 1H), 1.73–1.62 (m, 1H), 1.61–1.47 (m, 2H), 1.37–1.18 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

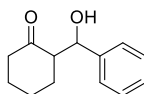
4-(Hydroxy(2-oxocyclohexyl)methyl)benzonitrile (IV.4ag)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.75–7.54 (m, 2H), 7.51–7.33 (m, 2H), 4.82 (dd, $J = 8.4, 3.0$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 2.71–2.20 (m, 3H), 2.16–2.00 (m, 1H), 1.92–1.74 (m, 1H), 1.75–1.43 (m, 3H), 1.42–1.18 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

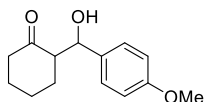
2-(Hydroxy(phenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ah)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.41–7.23 (m, 5H), 4.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.96 (s, 1H), 2.70–2.54 (m, 1H), 2.55–2.43 (m, 1H), 2.42–2.29 (m, 1H), 2.14–2.02 (m, 1H), 1.84–1.47 (m, 4H), 1.38–1.19 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4982).

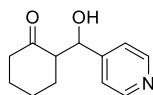
2-(Hydroxy(4-methoxyphenyl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ai)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.25–7.16 (m, 2H), 6.95–6.81 (m, 2H), 4.74 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.64–2.30 (m, 3H), 2.14–2.02 (m, 1H), 1.86–1.47 (m, 5H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 958).

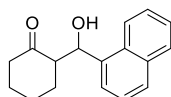
2-(Hydroxy(pyridin-4-yl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4aj)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 8.71–8.40 (m, 2H), 7.51–6.96 (m, 2H), 4.78 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 2.68–2.53 (m, 1H), 2.53–2.28 (m, 2H), 2.19–2.02 (m, 1H), 1.92–1.78 (m, 1H), 1.76–1.49 (m, 3H), 1.45–1.32 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 958).

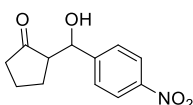
2-(Hydroxy(naphthalen-1-yl)methyl)cyclohexan-1-one (IV.4ak)



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.95–7.69 (m, 4H), 7.57–7.33 (m, 3H), 4.97 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 2.81–2.64 (m, 1H), 2.59–2.29 (m, 2H), 2.15–2.00 (m, 1H), 1.86–1.46 (m, 4H), 1.43–1.22 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Org. Lett.* **2006**, 8, 4417).

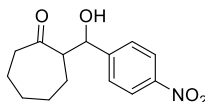
2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cyclopentan-1-one (IV.4ba)



^1H NMR (*syn* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 8.29–8.07 (m, 2H), 7.62–7.40 (m, 2H), 5.41 (s, 1H), 2.81 (s, 1H), 2.54–2.07 (m, 3H), 2.05–1.47 (m, 4H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

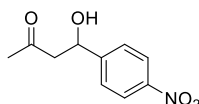
2-(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)cycloheptan-1-one (IV.4ca)



^1H NMR (*syn* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 8.31–8.10 (m, 2H), 7.65–7.44 (m, 2H), 5.30 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.62 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.06–2.78 (m, 1H), 2.69–2.38 (m, 2H), 1.96–1.29 (m, 8H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

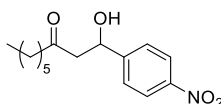
4-Hydroxy-4-(4-nitrophenyl)butan-2-one (IV.4da)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.26 (dt, $J = 7.7, 3.3$ Hz, 1H), 3.61 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 2.92–2.75 (m, 2H), 2.22 (s, 3H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Chem. Commun.* **2002**, 3024).

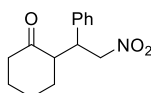
1-Hydroxy-1-(4-nitrophenyl)nonan-3-one (IV.4ea)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.29–5.22 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 2.93–2.69 (m, 2H), 2.44 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.58 (d, $J = 14.7$ Hz, 2H), 1.37–1.19 (m, 6H), 0.87 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 734).

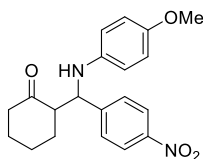
2-(2-nitro-1-phenylethyl)cyclohexan-1-one



^1H NMR (*syn* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3) δ 7.34–7.23 (m, 3H), 7.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.94 (dd, $J = 12.5, 4.5$ Hz, 1H), 4.63 (dd, $J = 9.9, 12.5$ Hz, 1H), 3.76 (dt, $J = 4.5, 9.9$ Hz, 1H), 2.68 (ddd, $J = 8.1, 8.4, 12.3$ Hz, 1H), 2.49–2.33 (m, 2H), 2.10–2.04 (m, 1H), 1.79–1.52 (m, 4H), 1.52–1.19 (m, 1H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Org. Lett.* **2006**, 8, 2901).

2-(((4-methoxyphenyl)amino)(4-nitrophenyl)methyl)cyclohexan-1-one



^1H NMR (*anti* diastereoisomer, 400 MHz, CDCl_3): δ 8.14 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.61–7.46 (m, 2H), 6.71–6.6 (m, 2H), 6.5–6.4 (m, 2H), 4.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.90–2.75 (m, 1H), 2.48–2.25 (m, 2H), 2.20–1.85 (m, 3H), 1.75–1.58 (m, 3H) ppm.

NMR data are in agreement with literature (*Synlett*, **2018**, 29(5), 630–634).

II. Self-assembly procedure

1. Micelle assembly from amphiphile IV.1

The formation of micelles was performed by solubilizing 10 mg of amphiphile **IV.1** into a 10 mM solution of HCl (1 mL). The solution was sonicated using an ultrasonic probe for 30 min. The solution was then subjected to UV irradiation at 254 nm for 5 h to yield a pale-yellow solution of photo-polymerized micelle.

2. Nanoribbon assembly from amphiphile IV.1

A solution of amphiphile **IV.1** in water (10 mg mL^{-1}) was sonicated for 30 min. The clear solution was left at room temperature for 4 h, and then kept at 5 °C for 20 h. The solution slowly evolved to an opaque gel-like colloid (Figure 101a). The gel was UV-irradiated for 2 min at 254 nm. In the course of irradiation, the white gel turned into a dark blue suspension (Figure 101b). The suspension was then sonicated for 1 h. This led to an increase of the temperature of the sonication bath (55 °C) and to a drastic color change, as the colloidal suspension turned crimson red (Figure 101c). The final polymerized aggregates are dissociated as small nanoribbons (pDAPro).

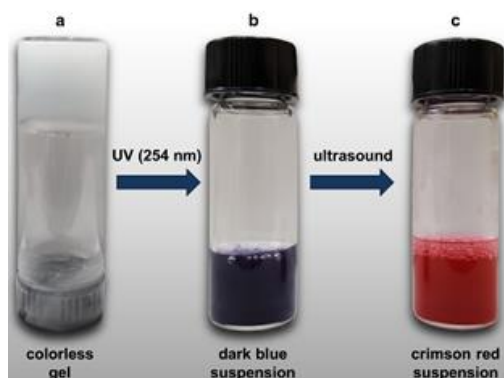


Figure 101. Different stages in the formation of the nanoribbon.

3. Nanorod assembly from amphiphile IV.10

Amphiphile **IV.10** (10 mg) was added to a 1:1 EtOH/MeOH mixture (200 μ L) and bath-sonicated until complete dissolution. The solution was then added to pure water (2 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h, giving rise to a turbid suspension resulting from the formation of bilayer assemblies. The turbid suspension was then subjected to UV irradiation (254 nm, low pressure mercury UV lamp, Heraeus) for 2 min, resulting in the development of an intense blue color. Treatment of this blue solution by bath-sonication gave a red solution.

III. Characterization of all the assemblies

1. Size measurements by Dynamic Light Scattering (DLS) of micelles

Six acquisitions (60 s each) were performed on the polymerized micelle sample. The non-polymerized micelles are unstable and can't be analyzed by DLS. Mean hydrodynamic diameter values of 6 nm was registered (Figure 102).

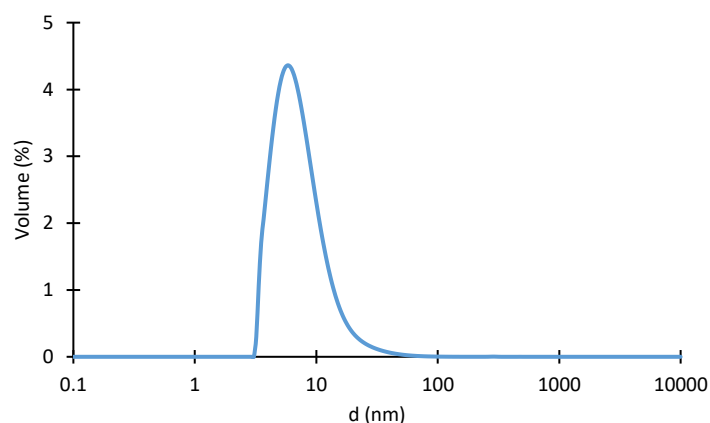


Figure 102. DLS profile of pDAPro micelle.

2. TEM observation of the nanoribbon and the nanorod systems

Transmission electron microscopy (TEM) images of the nanoribbons were acquired on a FEI F20 microscope at 200 kV and recorded on a Gatan One View camera.

The nanorods were analyzed by a low voltage transmission electron microscope at 5 kV, the benchtop Lowvoltage Electron Microscope LVEM5 by Delong instruments. For optimum contrast we used ultrathin TEM grids with carbon film coated, 3 - 4 nm thickness, 200 mesh Copper. The TEM grids were ionized in a Glow discharge system ELMO for EM grids (Cordouan technologies). The parameters used are as follows: 45 second flow of plasma discharge at 0.1–0.15 mbar atmosphere and 1.2–1.4 mA. 5 μ L samples were deposited on ionized grids. Once all water was evaporated, grids were analyzed directly with the LVEM5 in TEM mode.

3. UV-absorption and Circular dichroism (CD) spectra of the nanoribbons

UV and CD spectra were recorded with a JASCO J-815 spectrophotometer at a concentration of 0.1 mM of nanoribbon.

IV. Catalysis

1. General procedure for the aldol reaction

At room temperature, to a suspension of the catalyst (0.00625 mmol, 5 mol%) in water (1 mL) was added the additive (0.00625 mmol, 5 mol%) (if necessary) and ketone **IV.2** (1.25 mmol, 10 equiv.). The reaction mixture was stirred for 15 min, before aldehyde **IV.3** (0.125 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for the indicated time and worked-up by extraction twice with EtOAc. The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc) to afford pure aldol products. All the reported aldol products are known compounds, and their spectroscopic data are identical to those reported in the literature. The *ee* values were determined by chiral HPLC analysis using a SHIMADZU LC-10AD intelligent pump, SPD-10A UV detector, and C-R8A integrator.

2. Recycling procedure of the nanoribbon

At room temperature, to a suspension of the nanoribbon (0.00625 mmol, 5 mol%) in water (1 mL) was added benzoic acid (0.00625 mmol, 5 mol%) and cyclohexanone **IV.2a** (1.25 mmol, 10 equiv.). The reaction mixture was stirred for 15 min, before 4-nitrobenzaldehyde **IV.3a** (0.125 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for 24 h. The mixture was then extracted twice with EtOAc, the combined organic phases were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc, 85:15) to afford pure aldol product **IV.4aa**.

The remaining aqueous phase was reused to carry out further reactions, by simple addition of benzoic acid, cyclohexanone **IV.2a** and 4-nitrobenzaldehyde **IV.3a** for each additional run.

3. Procedure for the Mannich reaction catalyzed by the nanoribbon system

Direct Mannich reaction

At room temperature, to a suspension of the nanoribbon (0.00625 mmol, 5 mol%) in water (1 mL) was added the additive (0.00625 mmol, 5 mol%) (if necessary) and cyclohexanone (1.25 mmol, 10 equiv.). The reaction mixture was stirred for 15 min, before 4-nitrobenzaldehyde (0.125 mmol, 1 equiv.) and *p*-anisidine (0.1375 mmol, 1.1 equiv.) were added. The reaction mixture was vigorously stirred for the indicated time and worked-up by extraction twice with EtOAc. The combined organic phases were

dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc, 85:15) to afford the Mannich product. The *ee* values were determined by chiral HPLC analysis using a SHIMADZU LC-10AD intelligent pump, SPD-10A UV detector, and C-R8A integrator.

Indirect Mannich reaction

The same procedure was used but instead of adding 4-nitrobenzaldehyde and *p*-anisidine, the imine *N*-(4-methoxyphenyl)-1-(4-nitrophenyl)methanimine was introduced to the reaction mixture.

4. Procedure for the Michael reaction catalyzed by the nanoribbon system

At room temperature, to a suspension of the nanoribbon (0.00625 mmol, 5 mol%) in water (1 mL) was added the additive (0.00625 mmol, 5 mol%) (if necessary) and cyclohexanone (1.25 mmol, 10 equiv.). The reaction mixture was stirred for 15 min, before (*E*)-(2-nitrovinyl)benzene (0.125 mmol, 1 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for the indicated time and worked-up by extraction twice with EtOAc. The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 95:5) to afford the Michael product. The *ee* values were determined by chiral HPLC analysis using a SHIMADZU LC-10AD intelligent pump, SPD-10A UV detector, and C-R8A integrator

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. Wegner. *Z. Naturforsch., Teil B*, 1969, 24, 824-832.
- ² (a) B. Tieke, H. J. Graf, G. Wegner, B. Naegel, H. Ringsdorf, A. Banerjee, D. Day and J. B. Leto. *Colloid Polym. Sci.*, 1977, 255, 521-531; (b) D. Day and H. J. Ringsdorf. *Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 1978, 16, 205-210.
- ³ (a) N. Mino, H. Tamura and K. Ogawa. *Langmuir* 1992, 8, 594-598; (b) R. R. Chance, G. N. Patel and J. D. Witt. *J. Chem. Phys.*, 1979, 71, 206; (c) M. Shibata, F. Kaneko, M. Aketagawa and S. Kobayashi. *Thin Solid Films* 1989, 179, 433-437.
- ⁴ D. Charych, J. Nagy, W. Spevak and M. Bednarski. *Science* 1993, 261, 585-588.
- ⁵ M. D. Mowery, M. Cai, H. Menzel and C. E. Evans. *J. Vac. Sci. Technol., A* 1999, 17, 2136.
- ⁶ S. R. Diegelmann and J. D. Tovar. *Macromol. Rapid Commun*, 2013, 34, 1343-1350.
- ⁷ J. T. Wen, J. M. Roper and H. Tsutsui. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2018, 57, 9037.
- ⁸ D. J. Ahn and J. M. Kim. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 805.
- ⁹ R. W. Carpick, D. Y. Sasaki, M. S. Marcus, M. A. Eriksson, A. R. Burns. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2004, 16, R679-R697.
- ¹⁰ (a) B. J. Orchard, S. K. Tripathy. *Macromolecules*, 1986, 19, 1844; (b) H. Eckhardt, D. S. Boudreaux, R. R. Chance. *J. Chem. Phys.*, 1986, 85, 4116; (c) S. H. W. Hankin, M. J. Downey, D. J. Setman. *Polymer*, 1992, 33, 5098.
- ¹¹ (a) B. Yoon, S. Lee, J.-M. Kim. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1958-1968; (b) R. Jelinek, M. Ritenberg. *RSC Adv.*, 2013, 3, 21192-21201.
- ¹² S. Okada, S. Peng, W. Spevak, D. Charych. *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 5, 229-239.
- ¹³ (a) Y. J. Chen, G. M. Carter, S. K. Tripathy. *Solid State Commun*, 1985, 54, 19-22; (b) P. S. Vincett, G. G. Roberts. *Thin Solid Films*, 1980, 68, 135-171.
- ¹⁴ J.-S. Filhol, J. Deschamps, S. G. Dutremez, B. Boury, T. Barisien, L. Legret and M. Schott. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 6976-6988.
- ¹⁵ D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra. *Adv. Condens. Matter Phys.* 2015, 2015, 1-22.
- ¹⁶ W. C. Griffin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1949, 1, 311.
- ¹⁷ W. C. Griffin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1954, 249-256.
- ¹⁸ B. Tieke and G. Lieser. *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, 88, 471-486.
- ¹⁹ (a) R. Viswanathan, J. A. Zasadzinski, D. K. Schwartz. *Science* 1993, 261, 449; (b) J. A. Zasadzinski, R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes, D. K. Schwartz. *Science* 1994, 263, 1726.
- ²⁰ (a) T. E. Wilson and M. D. Bednarski. *Langmuir*, 1992, 8, 2361-2364; (b) A. A. Deckert, J. C. Horne, B. Valentine, L. Kiernan, L. Fallon. *Langmuir*, 1995, 11, 643-649.

- ²¹ Y. Scindia, L. Silbert, R. Volinsky, S. Kolusheva, R. Jelinek. *Langmuir*, 2007, 23, 4682-4687.
- ²² S. Wang, J. Ramirez, Y. Chen, P. G. Wang, R. M. Leblanc. *Langmuir*, 1999, 15, 5623-5629.
- ²³ D. Day, H.-H. Hub, H. Ringsdorf. *Isr. J. Chem.*, 1979, 18, 325-329.
- ²⁴ S. Li, L. Zhang, J. Jiang, Y. Meng, M. Liu. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 37386-37394.
- ²⁵ L. Silbert, I. Ben Shlush, E. Israel, A. Porgador, S. Kolusheva, R. Jelinek. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 7339-7344.
- ²⁶ (a) J. M. Schnur, R. Price, P. Schoen, P. Yager, J. M. Calvert, J. Georger, A. Singh. *Thin Solid Films*, 1987, 152, 181-206; (b) A. L. Plant, D. M. Benson, G. L. Trusty. *Biophys. J.*, 1990, 57, 925-933.
- ²⁷ (a) D. A. Frankel, D. F. O'Brien. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 10057-10069; (b) G. Wang, R. I. Hollingsworth. *Adv. Mater.*, 2000, 12, 871-874; (c) Q. Cheng, M. Yamamoto, R. C. Stevens. *Langmuir*, 2000, 16, 5333-5342.
- ²⁸ Y. Zhou, T. Shimizu. *Chem. Mater.*, 2008, 20, 625-633.
- ²⁹ (a) J. Song, Q. Cheng, S. Kopta, R. C. Stevens. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3205-3213; (b) J. Song, Q. Cheng, R. C. Stevens. *Chem. Phys. Lipids*, 2002, 2002, 203-214; (c) J. Song, J. S. Cisar, C. R. Bertozzi. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 8459-8465.
- ³⁰ S. Pakhomov, R. P. Hammer, B. K. Mishra, B. N. Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 3040-3042.
- ³¹ S. B. Lee, R. Koepsel, D. B. Stolz, H. E. Warriner, A. J. Russell. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 13400-13405.
- ³² J. V. Selinger, M. S. Spector, J. M. Schnur. *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 7157-7169.
- ³³ J. Ogier, T. Arnould, G. Carrot, A. Lhumeau, J.-M. Delbos, C. Boursier, O. Loreau, F. Lefoulon, E. Doris, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 3902-3907.
- ³⁴ N. Mackiewicz, E. Gravel, A. Garofalakis, J. Ogier, J. John, D. M. Dupont, K. Gombert, B. Tavitian, E. Doris, F. Ducongé. *Small* 2011, 7 (19), 2786-2792.
- ³⁵ A. Perino, A. Klymchenko, A. Morere, E. Contal, A. Rameau, J.-M. Guenet, Y. Mely, A. Wagner. *Macromol. Chem. Phys.* 2011, 212, 111-117.
- ³⁶ T. Michinobu, H. Osako, K. Shigehara. *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 111.
- ³⁷ S. R. Sheth and D. E. Leckband. *Langmuir* 1997, 13, 5652-5662.
- ³⁸ C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen. *The Plant Cell*. 2, 279-289 (1990).
- ³⁹ A. Fire et al. *Nature* 391, 806-811 (1998).
- ⁴⁰ E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. *Nature*, 409, 363-366 (2001).
- ⁴¹ S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon. *Nature* 404, 293-296 (2000).

- ⁴² (a) J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay and B. A. Sullenger. *RNA*, 2004, 10, 766-771; (b) D. M. Dykxhoorn, D. Palliser and J. Lieberman. *Gene Ther*, 13, 541-552 (2006).
- ⁴³ (a) S. Choung, Y. J. Kim, S. Kim, H. O. Park, Y. C. Choi. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 342, 919-927 (2006); (b) A. H. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, K. A. Alexander, K. A. Nucleic Acids Res. 32 (2004) 5991-6000.
- ⁴⁴ J. Elmén et al. *Nucleic Acids Res.* 33, 439-447 (2005).
- ⁴⁵ C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H.-P. Vornlocher and C. Unverzagt. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4975-4977 (2004).
- ⁴⁶ R. Waehler, S. J. Russell and D. T. Curiel. *Nature Rev. Genet.* 8, 573-587 (2007).
- ⁴⁷ S. Höbel, A. Aigner. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013, 5, 484-501.
- ⁴⁸ (a) T. S. Zimmermann, A. C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John and A. D. Judge. *Nature*, 2006, 441 (7089), 111-114; (b) T.W. Geisbert, L. E. Hensley, E. Kagan, E. Z. Yu, J. B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E. A. Fritz, P. B. Jahrling, K. McClintock, J. R. Phelps, A. C. Lee, A. Judge, L. B. Jeffs, I. MacLachlan. *J. Infect. Dis.* 193 (2006) 1650-1657.
- ⁴⁹ A. De Fougères, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, 6 (6), 443-453.
- ⁵⁰ I. Theodorou, A. Parambath, B. Lelandais, D. Clarisse, A. Doerflinger, E. Gravel, F. Ducongé and E. Doris. *Chem. Commun.*, 2015, 51, 14937.
- ⁵¹ (a) A. Doerflinger, N. N. Quang, E. Gravel, G. Pinna, M. Vandamme, F. Ducongé and E. Doris, *Chem. Commun.*, 2018, 54, 3613 ; (b) A. Doerflinger, N. N. Quang, E. Gravel, F. Ducongé, E. Doris, *Int. J. Pharm* (2019), 565, 59-63.
- ⁵² K. Porte, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, B. Eddhif, P. Poinot, E. Gravel, E. Doris, A. Wijkhuisen, D. Audisio, S. Papot, F. Taran. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 6366-6370.
- ⁵³ J. Alliot, I. Theodorou, D. V. Nguyen, C. Forier, F. Ducongé, E. Gravel and E. Doris. *Nanoscale*, 2019, 11, 9756.
- ⁵⁴ P. Neuberg, A. Perino, E. Morin-Picardat, N. Anton, Z. Darwich, D. Weltin, Y. Mely, A. S. Klymchenko, J.-S. Remy, A. Wagner. *Chem. Commun.* 2015, 51 (58), 11595-11598.
- ⁵⁵ K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99 (7), 2039-2044.
- ⁵⁶ R. A. Casero, Jr, P. M. Woster. *J. Med. Chem.* 2009, 52 (15), 4551-4573.
- ⁵⁷ (a) C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer, D. G. Anderson. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013, 110, 12881-12886; (b) M. Jayaraman, S. M. Ansell, B. L. Mui, Y. K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J. K. Narayanannair and K. G. Rajeev. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, 51, 8529-8533.

- ⁵⁸ (a) O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 92, 7297; (b) G. Creusat, A. S. Rinaldi, E. Weiss, R. Elbaghdadi, J. S. Remy, R. Mulherkar and G. Zuber. *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 994.
- ⁵⁹ R. A. Sheldon. *Green Chem.*, 2007, 9, 1273.
- ⁶⁰ C. Capello, U. Fischer and K. Hungerbühler. *Green Chem.*, 2007, 9, 927.
- ⁶¹ D. S. MacMillan, J. Murray, H. F. Sneddon, C. Jamieson and A. J. B. Watson. *Green Chem.*, 2012, 14, 3016.
- ⁶² D. C. Rideout and R. Breslow. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 7816.
- ⁶³ R. Breslow. *Acc. Chem. Res.*, 1991, 24, 159.
- ⁶⁴ S. Narayan, J. Muldoon, M. G. Finn, V. V. Fokin, H. C. Kolb, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3339.
- ⁶⁵ (a) R. Wohlgemuth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 713-724; (b) M. T. Reetz. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 12480-12496.
- ⁶⁶ T. Nishikata, A. R. Abela and B. H. Lipshutz. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 781.
- ⁶⁷ J. Dey, M. Saha, A. Kumar Pal and K. Ismail. *RSC Adv.*, 2013, 3, 18609.
- ⁶⁸ D. Clarisse, P. Prakash, V. Geertsens, F. Miserque, E. Gravel, E. Doris. *Green Chem.* 2017, 19, 3112-3115.
- ⁶⁹ R. Huisgen. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1963, 2, 565.
- ⁷⁰ (a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 2596; (b) C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal. *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 3057.
- ⁷¹ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin. *Science* 2013, 340, 457-460.
- ⁷² L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand. *Science Advances* 2015, 1, e1500304.
- ⁷³ (a) A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 11782-11783; (b) A. J. Link, D. A. Tirrell. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 11164-11165.
- ⁷⁴ C. Y. Jao, M. Roth, R. Welti, A. Salic. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 15332-15337.
- ⁷⁵ D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 16893-16899.
- ⁷⁶ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974-6998.
- ⁷⁷ (a) H. Struthers, T. L. Mindt, R. Schibli. *Dalton T.* 2009, 39, 675-696; (b) E. Haldón, M. C. Nicasio, P. J. Pérez. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 9528-9550.
- ⁷⁸ V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 12705-12712.

- ⁷⁹ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin. *Org. Lett.* 2004, 6, 2853–2855.
- ⁸⁰ (a) C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 5852-5856; (b) V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 126, 5982-5986; (c) Y. Su, L. Li, H. Wang, X. Wang, Z. Zhang. *Chem. Commun.* 2016, 52, 2185-2188.
- ⁸¹ (a) C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu and P. Wu. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50, 8051-8056; (b) H. Jiang, B. P. English, R. B. Hazan, P. Wu and B. Ovrn. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, 54, 1765-1769.
- ⁸² M. Yang, A. S. Jalloh, W. Wei, J. Zhao, P. Wu and P. R. Chen. *Nat. Commun.*, 2014, 5, 4981-7679.
- ⁸³ (a) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104, 16793; (b) J. C. Jewetta and C. R. Bertozzi. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1272.
- ⁸⁴ M. Yin, C.-K. Wu, Y. Lou, C. Burda, J. T. Koberstein, Y. Zhu and S. O'Brien. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 9506.
- ⁸⁵ F. Wang, Y. Zhang, Z. Liu, Z. Du, L. Zhang, J. Ren, X. Qu. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 6987.
- ⁸⁶ (a) J. Clavadetscher, S. Hoffmann, A. Lilienkamp, L. Mackay, R. M. Yusop, S. A. Rider, J. J. Mullins, M. Bradley. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 15662-15666; (b) J. Clavadetscher, E. Indrigo, S. V. Chankeshwara, A. Lilienkamp, M. Bradley. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 6864-6868; (c) Y. Bai, X. Feng, H. Xing, Y. Xu, B. K. Kim, N. Baig, T. Zhou, A. A. Gewirth, Y. Lu, E. Oldfield, S. C. Zimmerman. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 11077-11080.
- ⁸⁷ K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang. *Org. Lett.* 2004, 6, 4603-4606.
- ⁸⁸ E. Gravel, B. Thézé, I. Jacques, P. Anilkumar, K. Gombert, F. Ducongé and E. Doris. *Nanoscale*, 2013, 5, 1955.
- ⁸⁹ S. P. Moore and B. M. Sutherland. *Anal. Biochem.*, 144, 15-19 (1985).
- ⁹⁰ (a) Z. G. Hajos and D. R. Parrish. *J. Org. Chem.*, 1974, 39, 1615-1621; (b) U. Eder, G. Sauer and R. Weichert. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1971, 10, 496-497.
- ⁹¹ B. List, R. A. Lerner and C. F. Barbas. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 2395-2396.
- ⁹² (a) S. Bahmanyar, K. N. Houk, H. J. Martin and B. List. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 2475-2479; (b) F. R. Clemente and K. N. Houk. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, 43, 5766-5768; (c) L. Hoang, S. Bahmanyar, K. N. Houk and B. List. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 16-17; (d) B. List, L. Hoang and H. J. Martin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 5839-5842.
- ⁹³ C. Marquez, J. O. Metzger. *Chem. Commun.* 2006, 1539.
- ⁹⁴ K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui and C. F. Barbas, III. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 5260-5267.
- ⁹⁵ (a) A. Cordova, W. Notz and C. F. Barbas, III. *Chem. Commun.*, 2002, 3024-3025; (b) Y.-Y. Peng, Q.-P. Ding, Z. Li, P. G. Wang and J.-P. Cheng, *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, 3871-3875; (c) A. Hartikka and P. I.

- Arvidsson. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1831-1834; (d) S. S. Chimni, D. Mahajan and V. V. S. Babu. *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 5617-5619; (e) Y.-S. Wu, Y. Chen, D.-S. Deng and J. Cai. *Synlett*, 2005, 1627-1629.
- ⁹⁶ (a) S. Aratake, T. Itoh, T. Okano, N. Nagae, T. Sumiya, M. Shoji and Y. Hayashi. *Chem.-Eur. J.*, 2007, 13, 10246-10256; (b) Y. Hayashi, S. Aratake, T. Okano, J. Takahashi, T. Sumiya and M. Shoji. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 5527-5529; (c) Y. Hayashi, T. Sumiya, J. Takahashi, H. Gotoh, T. Urushima and M. Shoji. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 958-961.
- ⁹⁷ N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, III. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 734.
- ⁹⁸ (a) K. Akagawa, S. Sakamoto, K. Kudo. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 8185; (b) X. J. Li, M. Q. Chen, B. L. Yang, S. L. Zhang, X. B. Jia and Z. G. Hu. *RSC Adv.*, 2014, 4, 43278-43285.
- ⁹⁹ (a) A. J. Boersma, R. P. Megens, B. L. Feringa, G. Roelfes. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 2083-2092 (b) T. Yamamoto, Y. Akai, M. Sugimoto, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, 53, 12785-12788; (c) M. Raynal, F. Portier, P. W. N. M. van Leeuwen, L. Bouteiller. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 17687-17690; (d) Q. Jin, L. Zhang, H. Cao, T. Wang, X. Zhu, J. Jiang, M. Liu. *Langmuir* 2011, 27, 13847-13853; (e) J. Jiang, Y. Meng, L. Zhang, M. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 15629-15635.
- ¹⁰⁰ F. Rodríguez-Llansola, J. F. Miravet and B. Escuder. *Chem. Commun.*, 2009, 7303-7305.
- ¹⁰¹ K. S. Lee, J. R. Parquette. *Chem. Commun.* 2015, 51, 15653-15656.
- ¹⁰² S. Bhowmick, L. Zhang, G. Ouyang and M. Liu. *ACS Omega* 2018, 3, 8329-8336.
- ¹⁰³ D. V. Jawale, E. Gravel, E. Villemin, N. Shah, V. Geertsen, I. N. N. Namboothiri, E. Doris. *Chem. Commun.* 2014, 50, 15251-15254.
- ¹⁰⁴ (a) J. N. Moorthy, S. Saha. *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 739-748; (b) C. Ji, Y. Peng, C. Huang, N. Wang, Y. Jiang. *Synlett* 2005, 986-990; (c) B. Wang, G. Chen, L. Liu, W. Chang, J. Li. *Adv. Synth. Catal.* 2009, 351, 2441-2448.
- ¹⁰⁵ (a) B. E. Rossiter, N. M. Swingle. *Chem. Rev.* 1992, 92, 771; (b) B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long. *Prog. Polym. Sci.*, 2006, 31, 487-531.
- ¹⁰⁶ (a) N. Krause, A. Hoffmann-Roder. *Synthesis* 2001, 171; (b) O. M. Berner, L. Tedeschi, D. Enders. *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 1877; (d) J. Christoffers, A. Baro. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42, 1688; (e) M. P. Sibi, S. Manyem. *Tetrahedron* 2000, 56, 8033.
- ¹⁰⁷ (a) S. B. Tsogoeva. *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 1701; (b) A. Berkessel, H. Groger. *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Application in Asymmetric Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; (c) P. I. Dalko, L. Moisan. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 5138.
- ¹⁰⁸ (a) D. Enders, A. Seki, *Synlett* 2002, 26; (b) B. List, P. Pojarliev, H. Martin. *J. Org. Lett.* 2001, 3, 2423.
- ¹⁰⁹ (a) N. Mase, K. Watanabe, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, III. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4966; (b) N. Kaplaneris, G. Koutoulogenis, M. Raftopoulou, C. G. Kokotos. *J. Org. Chem.* 2015, 80, 5464-5473.

¹¹⁰ (a) M. Arend, B. Westermann, N. Risch. *Angew. Chem., Int. Ed.* 1998, 37, 1044; (b) M. M. B. Marques. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 348; (c) M. Shibasaki, S. Matsunaga. *J. Organomet. Chem.* 2006, 691, 2089; (d) A. Cordova. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37, 102.

¹¹¹ B. List. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 9336.

¹¹² R. El helou, G. Pinna, O. Cabaud, J. Wicinski, R. Bhajun, L. Guyon, C. Rioualen, P. Finetti, A. Gros, B. Mari, P. Barbry, F. Bertucci, G. Bidaut, A. Harel-Bellan, D. Birnbaum, E. Charafe-Jauffret and C. Ginestier. *Cell Rep.* 2017, 18, 2256.

¹¹³ Schindelin, J. et al. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).

Titre : Conception et synthèse d'auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques pour les applications en nanomédecine et en catalyse

Mots clés : Nanomédecine, Micelles, siARN, click dans les systèmes vivants, nanoruban, aldolisation asymétrique dans l'eau

Résumé : Les travaux décrits dans ce manuscrit portent sur l'étude de nanostructures obtenues par auto-assemblages d'amphiphiles diacétyléniques polymérisables. Essentiellement deux familles de composés ont été étudiées (micelles sphériques et rubans en bicouche) et valorisées, d'une part, pour des applications biomédicales et, d'autre part, pour la catalyse.

Dans un premier temps, des micelles cationiques polymérisées assemblées à partir d'amphiphiles diacétyléniques sont synthétisées. Ces micelles ont été valorisées pour la prise en charge et la transfection d'ARN interférents *in vitro*.

Ensuite, un catalyseur micellaire « biocompatible » incorporant du cuivre a été développé pour promouvoir des transformations chimiques *in vitro*. Nos études ont ainsi porté sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen que nous avons mise en œuvre dans le compartiment intracellulaire.

Enfin, nous nous intéressons à la synthèse et à la formulation d'amphiphiles diacétyléniques en architectures supramoléculaires qui ont été utilisées pour la catalyse asymétrique et semi-hétérogène de la réaction d'aldolisation.

Title : Design and synthesis of self-assemblies obtained from diacetylene amphiphiles for applications on nanomedicine and catalysis

Keywords : Nanomedicine, Micelles, siRNA, click in living system, nanoribbon, asymmetric aldol reaction in water

Abstract : The work described in this manuscript focuses on the study of nanostructures obtained by self-assembly of polymerizable diacetylenic amphiphiles. Two families of compounds have been studied (spherical micelles and bilayer ribbons) and used for biomedical applications on the one hand and for catalysis on the other.

At first, polymerized cationic micelles assembled from diacetylenic amphiphiles are synthesized. These micelles were valorized for the transfection of small interfering RNAs *in vitro*.

Then a « biocompatible » micellar catalyst incorporating copper was developed to promote *in vitro* chemical transformations. Ours studies focused on the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition that we implemented in the intracellular compartment.

Finally, we are interested in the synthesis and formulation of supramolecular architectures from diacetylenic amphiphiles. These systems have been used for the asymmetric and semi-heterogenous catalysis of the aldol reaction.