



HAL
open science

Molécules amphiphiles hybrides à chaînes hydrogénées et fluorées : synthèse, étude de la dynamique d'auto-association et application au transport de principes actifs hydrophobes

Emilie Grousseau

► To cite this version:

Emilie Grousseau. Molécules amphiphiles hybrides à chaînes hydrogénées et fluorées : synthèse, étude de la dynamique d'auto-association et application au transport de principes actifs hydrophobes. Autre. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0283 . tel-03277535

HAL Id: tel-03277535

<https://theses.hal.science/tel-03277535>

Submitted on 4 Jul 2021

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.

THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
Sciences & Agrosiences

Spécialité / Discipline de doctorat :
Chimie organique

Laboratoire de Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles
Institut des Biomolécules Max Mousseron – UMR 5247

Présentée par
Emilie Grousson

Molécules amphiphiles hybrides
à chaînes hydrogénées et fluorées :

Synthèse, étude de la dynamique d'auto-association
et application au transport de principes actifs hydrophobes

Soutenue publiquement le 02 Avril 2021 devant le jury composé de :

Dr. Marie-Pierre Krafft, Directrice de recherche-CNRS, Université de Strasbourg

Pr. Paul-Alain Jaffrès, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Dr. Muriel Blanzat, Chargée de recherche-CNRS, Université Paul-Sabatier-Toulouse III

Pr. Jerzy Zajac, Professeur, Université de Montpellier II

Dr. Michel Camplo, Maître de conférences-HDR, Université d'Aix-Marseille

Dr. Grégory Durand, Maître de conférences-HDR, Avignon Université

Dr. Christine Contino-Pépin, Maître de conférences-HDR, Avignon Université

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Invité

Invitée

À mes parents,

À mes grand-parents, à qui je dédie ce manuscrit de thèse

RÉSUMÉ

Ces travaux de thèse portent sur la conception de systèmes amphiphiles provenant de l'auto-association de nouveaux tensioactifs hybrides non ioniques fluorocarbonés–hydrocarbonés (F–H) à tête polaire PEGylée ou glucosylée. Ces tensioactifs sont capables de former différents types d'agrégats dans l'eau (micelles et vésicules) et pourraient servir pour l'encapsulation et la vectorisation de principes actifs hydrophobes.

Nous avons mis au point une synthèse multi-étapes modulable d'un fragment hybride F–H à motif sérine qui est ensuite greffé à une tête polaire par réaction *de chimie click*, pour conduire aux tensioactifs hybrides F–H. Une étude détaillée de leurs propriétés d'auto-assemblage (*i.e.* cmc, nombre d'agrégation, taille et stabilité des agrégats) a été réalisée et a permis de préciser l'influence de la longueur des chaînes hydrophobes F–H et de la nature des têtes hydrophiles greffées (Glucose, PEGs) sur l'auto-association des tensioactifs. Ces résultats permettent une meilleure compréhension de la physico-chimie des agrégats qui permettra par la suite la sélection du (des) meilleur(s) candidat(s) pour une future encapsulation de principes actifs.

Enfin, des essais préliminaires d'encapsulation du Paclitaxel (PTX), un agent anti-cancéreux hydrophobe, ont été menés à l'aide d'un tensioactif candidat hybride PEGylée F₈. Malgré de faibles doses de PTX encapsulées et un effet de burst-release rapide, des tests de viabilité cellulaire sur des lignées cancéreuses pulmonaires, ont permis de mettre en évidence le caractère biocompatible du vecteur seul et la conservation de l'activité pharmacologique du PTX dans la formulation micellaire.

Mots clés : tensioactifs hybrides fluorocarbonés/hydrocarbonés, PEG, Glucose, agrégats, systèmes de délivrance de principes actifs.

ABSTRACT

This thesis focused on the design of amphiphilic systems resulting from the self-association of new hybrid nonionic fluorinated/hydrogenated surfactants with a PEGylated or a glucose polar head. In water, these surfactants were found to form different types of stable aggregates, micelles for the PEG series and vesicles for the Glucose series, and thus could be used for the encapsulation and vectorization of hydrophobic drugs.

We developed a versatile multi-step synthesis of a hybrid building block with a serine core which was then grafted to a polar head by a copper(I)-mediated azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction to lead to the F–H hybrid surfactants. A thorough study of their self-assembly properties *i.e.* cmc, aggregation number, size and stability of the aggregates was carried out. We demonstrated that subtle changes in the chemical structure can change the nature and the size of the aggregates with the F₆ PEG series forming rather small and compact micelles, those of the F₈ PEG being larger and likely well-defined while the two Glucose compounds form vesicles.

Finally, preliminary encapsulation trials of Paclitaxel (PTX), an hydrophobic chemotherapeutic agent, were carried out using a hybrid PEGylated surfactant from the F₈ series. Despite low drug-loading and rapid burst-release, cell viability tests on pulmonary cancer lines showed that PEGylated F₈ alone is biocompatible and that PEGylated F₈/PTX formulation does not inhibit the activity of PTX in the micellar formulation.

Keywords : fluorocarbon/hydrocarbon hybrid surfactants, PEG, Glucose, aggregates, drug delivery systems.

REMERCIEMENTS

Ce projet de thèse a été réalisé au laboratoire de Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles (CBSA) de l'Université d'Avignon, sous la direction de la Dr. Christine Contino-Pépin. Il a été financé par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) sur la période d'Octobre 2017 à Janvier 2021.

Je tiens tout d'abord à remercier, la Dr. Marie-Pierre Krafft et le Pr. Paul-Alain Jaffrès, d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse, pour leur investissement et le temps consacré à cette tâche.

Merci également, au Pr. Jerzy Zajac et aux Drs Muriel Blanzat et Michel Camplo, de l'intérêt qu'ils ont porté à ce projet en acceptant de faire partie du jury de thèse.

Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, Grégory Durand, et à ma co-directrice de thèse, Christine Contino-Pépin, pour leur aide et leur soutien sans faille tout au long de ce projet. Grâce à eux, ces trois ans furent d'une grande richesse, tant sur le plan scientifique qu'humain. Leur confiance m'a permis de bénéficier d'opportunités diverses, réalisées en grande autonomie.

Un grand merci à tous nos collaborateurs du laboratoire « *Molecular Biophysics* », basé à l'université technique de Kaiserslautern en Allemagne : le Prof. Dr. Sandro Annette, Florian, Jonas, Kevin, Anne, Johannes, Karolyn, Suzanne et à tous les autres. Lors de mon programme de mobilité sortante, ils m'ont chaleureusement accueillie pendant 2 mois et demi, et ce fut un réel plaisir de pouvoir échanger scientifiquement avec le Prof. Dr. Keller et son équipe ! Leur encadrement, leur aide sur certaines expériences, leur gentillesse et leur soutien ont été essentiels à mon intégration dans ce laboratoire où j'ai pu apprendre quelques mots d'allemand...!

Un grand merci aussi, au Dr. Annette Meister de l'université de Halle-Wittemberg en Allemagne (Equipe ZIK HALOmem & Institut de Biochimie et Biotechnologie), et aussi, Kevin,

doctorant, pour l'aide et le temps consacrés à la réalisation des images de microscopie MET et Cryo-ME sur nos échantillons et pour les nombreuses discussions échangées à ce sujet.

Un grand merci également à l'équipe d'Aix-Marseille Université, aux Drs Marie-Anne Estève et Florian Corréard, et Charlotte, doctorante en pharmacie, pour les tests cellulaires réalisés sur nos échantillons et leur aide sur la partie pharmacologique. Ils m'ont gentiment accueillie dans leur laboratoire pendant deux jours, lors d'une formation sur les cultures cellulaires. Cette formidable opportunité m'a permise d'aborder ma thèse sous un autre angle, d'enrichir mes connaissances et d'appliquer nos travaux à de la délivrance de principes actifs.

J'ai également une pensée toute particulière pour tous mes collègues : Shiraz, Stéphane, J-B, Valentin, Noémie, Marine, Victoria, Pierre, Alice, Floriane, Maxence. Leur bonne humeur, leur aide, leur soutien inconditionnel durant les moments de doute, leur gentillesse, leur sympathie et les fous rires partagés, auront été de solides piliers lors de ces trois années de thèse. J'ai été ravie de travailler en leur compagnie.

Merci également aux anciens et récents doctorants : Anaïs, Christophe, Elodie, Valentin, Adrien, Fatina, Louise, Milan, Léna, Marie, Amandine, Ombéline, Harish,... ; aux autres collègues du département de chimie : Carole, Céline, Delphine, Simon, Emmanuel,... ; Karine Olivier et Saad Merah, pour leur gentillesse et leur soutien depuis toujours.

Je remercie également mes amis, Nicolas, Amélie, Antoine, Nathalie et mon compagnon Vincent, pour leur écoute et leur soutien durant ces trois ans de thèse.

Je remercie enfin, ma famille, et plus particulièrement mes parents, pour m'avoir toujours encouragée dans mes études et dans la vie en général.

À tous, un grand merci.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	6
CHAPITRE I. LES TENSIOACTIFS HYBRIDES À CHAÎNES FLUOROCARBONÉE-HYDROCARBONÉE	20
1. Structure et généralités	22
2. Rétrospective de la synthèse de ces composés	25
2.1 Les tensioactifs ioniques	26
2.1.1 Généralités	26
2.1.2 Particularité des tensioactifs gemini	29
2.1.3 Applications.....	31
2.1.3.1 Stabilisants de microémulsions eau dans le fluide supercritique (H ₂ O/CO ₂ supercritique)	31
2.1.3.2 Modificateur de surface dentaire	33
2.1.3.3 Emulsions pour la polymérisation de fluorure de vinylidène.....	33
2.1.3.4 Stabilisants pour la nucléation et de la croissance de nanoparticules d'or	35
2.1.3.5 Agent photo-sensibles	36
2.2 Les tensioactifs non ioniques	37
2.2.1 Généralités	37
2.2.2 Applications.....	39
2.2.2.1 Transport de principes actifs et d'oxygène avec des perfluorocarbures	39
2.2.2.2 Glycolipides dans l'extraction et la stabilisation de protéines membranaires	39
2.2.2.3 Les dendrimères de Janus hybrides F-H comme potentiels agents de contraste	41
2.2.2.4 Additif pour les mousses extinctives formant un film flottant.....	43
3. Conclusion	44
CHAPITRE II. SYNTHÈSE DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS HYBRIDES F-H	48
1. Voies rétrosynthétiques engagées	51
2. Synthèse des fragments moléculaires hybrides F-H	54
2.1 Etude de la voie de synthèse A	54
2.2 Etude de la voie de synthèse B.....	58
2.3 Etude de la voie de synthèse C.....	65
2.4 Etude de la voie de synthèse D : alternative à la voie C.....	69

3. Synthèse des tensioactifs hybrides F–H	74
3.1 Construction de la série de tensioactifs PEGylés	74
3.1.1 Tensioactifs à chaîne fluorée F ₆	74
3.1.2 Tensioactifs à chaîne fluorée F ₈	79
3.2 Construction de la série de tensioactifs glycosylés	81
3.2.1 Synthèse de F ₆ H ₆ _Glucose et F ₆ H ₈ _Glucose	81
3.2.2 Essai de synthèse en tétraglycosylation	83
3.2.3 Essai de synthèse d'une tête polaire tétraglycosylée	85
CHAPITRE III. CARACTÉRISATION DES AGRÉGATS DE TENSIOACTIFS HYBRIDES F-H.....	90
1. Etude de l'agrégation des tensioactifs hybrides F–H PEGylés	93
1.1 Détermination de la cmc et des paramètres thermodynamiques associés à la micellisation	93
1.1.1 Etude de la série F ₆ PEGylée	93
1.1.1.1 La tensiométrie de surface (TS)	93
1.1.1.2 La titration calorimétrique isotherme (TCI).....	98
1.1.1.3 La spectrofluorimétrie	101
1.1.1.4 Discussion générale.....	104
1.1.2 Etude de la série F ₈ PEGylée	106
1.2 Evaluation de la taille et forme des agrégats.....	114
1.2.1 Détermination de la taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	114
1.2.2 Détermination de la taille par diffusion statique de la lumière (SLS)	119
1.2.3 Etude de la série F ₈ par imagerie électronique à transmission (MET)	127
1.2.3.1 Principe de la technique MET	128
1.2.3.2 Interprétation des résultats.....	130
2. Etude de l'agrégation des tensioactifs glucosylés	131
2.1 Protocole d'agrégation sous forme de vésicules	131
2.2 Caractérisation microscopique par MET et par Cryo-ME	132
2.2.1 Principe de la cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-ME)	132
2.2.2 Discussion générale	133
2.3 Etude cinétique de la stabilisation des vésicules en solution	135
2.3.1 Influence de la température	135
2.3.2 Influence de la nature de la solution tampon.....	136

CHAPITRE IV. TRAVAUX PRÉLIMINAIRES D'ENCAPSULATION D'UN PRINCIPE ACTIF AU SEIN DES AGRÉGATS FORMÉS PAR UN TENSIOACTIF DE LA SÉRIE F ₈ PEGYLÉE	140
1. Choix des candidats tensioactif et principe actif	142
1.1 Le Paclitaxel (PTX)	142
1.1.1 Généralités	142
1.1.2 Les formulations actuelles du PTX	146
1.2 Objectif de l'étude et choix du tensioactif candidat	147
2. Choix du protocole optimal d'encapsulation du PTX	148
2.1 Méthode d'incorporation par injection de solvant organique	148
2.2 Méthode d'incorporation par dispersion aqueuse d'un film organique sec	151
2.3 Optimisation de la méthode d'encapsulation choisie	153
2.3.1 Durée optimale de mise en contact du PTX libre en formulation micellaire	154
2.3.2 Choix du pourcentage massique initial de PTX dans la formulation	155
2.3.2.1 Charge médicamenteuse (C.M.)	155
2.3.2.2 Efficacité d'encapsulation (E.E.)	157
3. Etude cinétique de relargage passif du PTX	158
3.1 Protocole de relargage passif	158
3.2 Résultats et discussion	160
4. Tests de viabilité cellulaire	162
4.1 Principe du test MTT	163
4.2 Innocuité du vecteur seul en présence de cellules A549	164
4.3 Etude de l'activité de la formulation micellaire vis-à-vis des cellules A549	165
 CONCLUSION GÉNÉRALE	 170
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	 176
1. Synthèse et caractérisation des tensioactifs hybrides F-H	178
1.1 Outils de synthèse	178
1.2 Caractérisation des molécules synthétisées au cours de la thèse	179
1.3 Détermination des paramètres de polymérisation des dérivés PEGylés	216
2. Caractérisation des agrégats de tensioactifs hybrides F-H	220
2.1 La tensiométrie de surface (TS)	220
2.2 La titration calorimétrique isotherme (TCI)	222
2.3 La spectrofluorimétrie	223
2.4 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)	224
2.5 La chromatographie d'exclusion stérique – diffusion statique de la lumière (CES-SLS)	224

2.6	La microscopie (MET) et cryo-microscopie (Cryo-ME) électronique à transmission.....	227
2.7	Etude de la stabilité des VUL formées par F ₆ H ₆ _Glucose en DLS.....	229
3.	Encapsulation du paclitaxel par les micelles F₈ PEGylées	230
3.1	Préparation des échantillons par dispersion aqueuse dans un film organique sec.....	231
3.2	Paramètres chromatographiques de la CLHP	232
3.3	Courbe de calibration pour le PTX en CLHP	233
3.4	Quantification du PTX dans chaque échantillon	234
3.5	Tests cellulaires effectués	234
BIBLIOGRAPHIE		238

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

A	absorbance
A₂	second coefficient du Viriel
AcOEt	acétate d'éthyle
A_{min}	aire minimale occupée par un tensioactif à l'interface
AMU	Aix-Marseille Université
APFO	pentadecafluorooctanate d'ammonium
ASC	aire sous la courbe
AU	acétate d'uranyle
Boc	groupe protecteur <i>tert</i> -butoxycarbone
c	concentration
CBz ou Z	groupe protecteur carboxybenzyle
ccm	chromatographie sur couche mince
CES-SLS	chromatographie d'exclusion stérique–diffusion statique de la lumière
cf.	<i>confer</i> ; se reporter à
C_{injection}	concentration à l'injection
CLHP	chromatographie en phase liquide à haute performance
C.M.	charge médicamenteuse
cmc	concentration micellaire critique
COSY	COrrélation Spectroscopy
C_{PTX chargé}	concentration en PTX chargé dans les micelles
Cryo-ME	cryo-microscopie électronique à transmission
c_s^{aq}	concentration en monomères de tensioactif dans la phase aqueuse
c_w	concentration molaire de l'eau
∂n/∂c	incrément d'indice de réfraction
Δρ	puissance
ΔG^o_{mic}	variation de l'énergie libre de Gibbs standard à la micellisation
ΔH^o_{mic}	variation de l'enthalpie standard à la micellisation
Δn	variation de l'indice de réfraction
D	coefficient de diffusion
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DDM	<i>N</i> -dodécylmaltoside
D_H	diamètre hydrodynamique
D_{H0}	diamètre hydrodynamique à dilution infinie
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMF	<i>N,N'</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
\overline{DP}_n	degré de polymérisation moyen en nombre
\overline{DP}_w	degré de polymérisation moyen en masse
DSs	dendrimersomes

EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
E.E.	efficacité d'encapsulation
EPR	Enhanced Permeability and Retention effect
équiv.	équivalent
Et₃N	triéthylamine
EtOH	éthanol
Et₂O	éther diéthylique
F	force de Wilhelmy
F₄	chaîne hydrophobe à 4 carbones perfluorés
F₆	chaîne hydrophobe à 6 carbones perfluorés
F₈	chaîne hydrophobe à 8 carbones perfluorés
FDA	Food and Drug Administration
F–H	Fluorocarboné(es/s) – Hydrocarboné(es/s)
Fluo	spectrofluorimétrie
γ_{cmc}	tension interfaciale à la cmc
Γ_{max}	concentration molaire surfacique par unité de surface à l'interface air-eau
GNFs	GoldNanoFlowers
G(t)	fonction d'auto-corrélation
H₆	chaîne hydrophobe à 6 carbones perhydrogénés
H₈	chaîne hydrophobe à 8 carbones perhydrogénés
H₁₂	chaîne hydrophobe à 12 carbones perhydrogénés
HAP	hydroxyapatite
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HRSM	spectrométrie de masse à haute résolution
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
I_0	intensité incidente
IC₅₀	concentration inhibitrice médiane
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> ; c'est-à-dire
I_f	Intensité fluorescente
isoBCF	<i>i</i> -butyl chloroformate
IR	signal de la variation de l'indice de réfraction
IV_w	viscosité intrinsèque
K	constante optique
K_{mic}	coefficient de répartition des fractions molaires pour la micellisation
λ	longueur d'onde
ln	logarithme népérien
LS	signal de diffusion statique de la lumière
MALDI-TOF	spectromètre de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice
MEB	microscopie électronique à balayage
MeCN	acétonitrile
MeOH	méthanol
MeONa	méthanolate de sodium
MET	microscopie électronique à transmission
\overline{M}_n	masse molaire moyenne en nombre

Ms	groupe mésyl
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
M_w	masse molaire en poids
$\overline{M_w}$	masse molaire moyenne en poids
η	viscosité
n_0	indice de réfraction du solvant
N	nombre d'agrégation
N_A	constante d'Avogadro
ND	non disponible
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
P	paramètre d'empilement
PBS	tampon phosphate salin
Pd/C	palladium sur charbon
PDI	indice de polydispersité
PEG	poly éthylène glycol
PEG750	motif hydrophile PEG à 750 Daltons
PEG800	motif hydrophile PEG à 800 Daltons
PEG2000	motif hydrophile PEG à 2000 Daltons
PFOA	acide perfluorooctanoïque
PFOB	bromure de perfluorooctyle
pH	potentiel d'hydrogène
PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PLA	poly(lactide)
PLGA	monométhoxy-poly(éthylène glycol-block-poly(D,L-lactide))
PPVE	perfluoropropyl vinyl éther
P_θ	facteur de forme
P_{trans}	paramètre de pression
PTX	paclitaxel
PVDF	polyfluorure de vinylidène
PyBOP	benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Pyr.	pyridine
q	vecteur de forme
Q	quantité de chaleur
Q_{demic}	quantité de chaleur issue du phénomène de démicellisation
$Q_{injection}$	quantité de chaleur issue de l'injection
r^2	coefficient de corrélation
R	constante des gaz parfaits
R_f	rapport frontal
R_θ	rapport de Rayleigh
R(F)	chaîne fluorocarbonée
R_H	rayon hydrodynamique
R(H)	chaîne hydrocarbonée
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDR	syndrome de détresse respiratoire
SLS	diffusion statique de la lumière

SM	spectrométrie de masse
t	temps
T	température
Θ	angle
t₀	temps initial
t.a.	température ambiante
tBu	groupe <i>tert</i> -butyle
tBuOH	<i>tert</i> -butanol
t_c	temps de centrifugation
TCI	titration calorimétrique isotherme
Tf	température de fusion
TFA	acide trichloroacétique
THF	tétrahydrofurane
-TΔS°_{mic}	contribution entropique standard à la micellisation
TPGS	tocophérol polyéthylène glycol succinate
t_R	temps de rétention
TS	tensiométrie
UV	signal d'absorbance en ultraviolet
V_H	volume hydrodynamique
VML	vésicules multi-lamellaires
VUL	vésicules uni-lamellaires
v/v	rapport volumique
X_S^{aq}	fraction molaire du tensioactif seul en phase aqueuse
X_S^m	fraction molaire du tensioactif en phase micellaire
%	pourcentage
%_{mass.}	pourcentage massique
%_{mass.,(i)}	pourcentage massique initial

Unités

Å	Angström (10 ⁻¹⁰ mètre)	μm, nm	micro-/nano-mètre
°C	Celsius	M	mole par litre
g/L, mg/L	gramme/milli-gramme par litre	min	minute
J/K/mol	Joule par Kelvin par mole	mL, μL	milli-/micro-litres
kcps	kilocoups par seconde	mL/g, dL/g	milli-/déci-litre par gramme
kDa, Da	kilodalton ; Dalton (g ou kg/mol)	mM, μM, nM	milli-/micro-/nano-mole par litre
kJ/mol	kilo-Joule par mole	mN/m	milli-Newton par mètre
kV	kilovolt	mol/mm²	moles par millimètre carré
h	heure	mV	millivolts
Hz, MHz	Hertz ; mega-Hertz	mW	milliwatt (mJ/sec)
μg/mL	micro-gramme par millilitres	ppm	partie par million (mg/kg)
μJ/s	micro-Joule par seconde	rpm	tour(s) par minute
		sec	seconde

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis les années 1990, la recherche en délivrance de principes actifs (ou *drug delivery* en anglais) a connu une croissance presque exponentielle et constitue toujours une préoccupation majeure. La *Figure 1* représente le nombre de citations faisant apparaître le terme *drug delivery* sur la période 1990-2021¹.

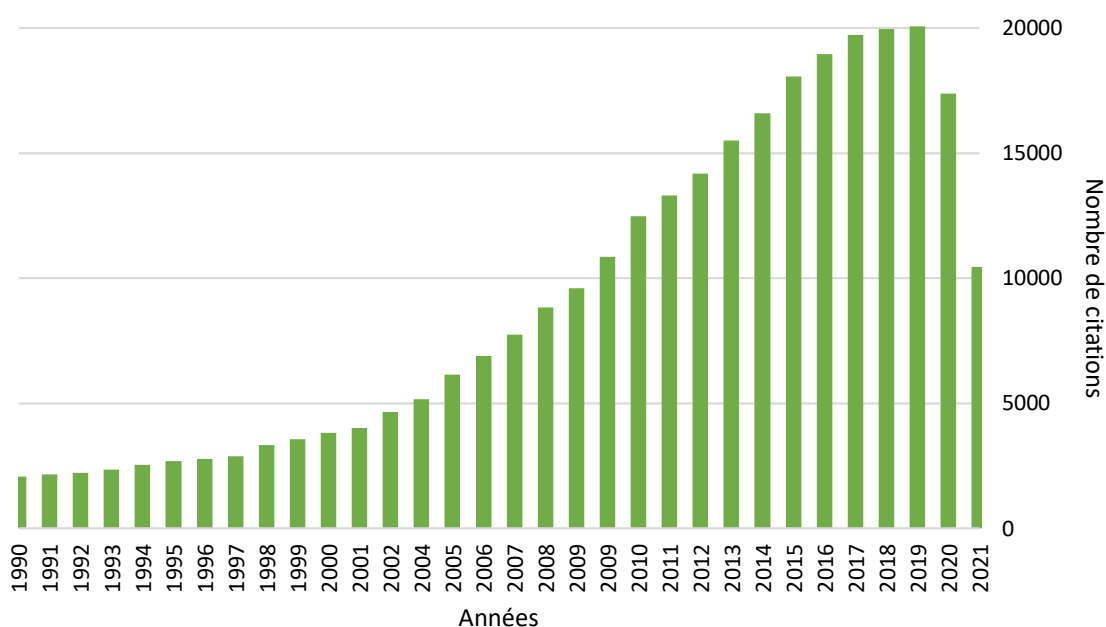


Figure 1. Nombre de citations d'articles comportant le terme « *drug delivery* » dans leur titre ou résumé¹.

Ce domaine consiste à imaginer et moduler des systèmes de délivrance encore appelés nanovecteurs. Ces derniers sont capables de protéger et de transporter un principe actif dans la circulation sanguine jusqu'à son site cible privilégié, lors du passage à travers les barrières naturelles du corps humain (comme par exemple le foie avec le premier passage hépatique)². Leur utilisation est privilégiée, puisque certains principes actifs ont des activités pharmacologiques faibles notamment dû à une faible solubilité, faible perméabilité, une toxicité non négligeable et ils peuvent être rapidement éliminés par le métabolisme du corps humain³. Il est donc nécessaire d'explorer de nouveaux vecteurs qui pourront transporter efficacement ces principes actifs et ainsi créer ou optimiser les formulations de médicaments commercialisés actuellement.

Introduction générale

Il existe différentes familles de vecteurs, dont la taille est généralement entre 100 et 500 nm classés selon leur forme, leur composition (auto-assemblage ou particule seule) ou leur synthèse (contrôlée ou non) qui peuvent avoir des formes diverses et variées (cf. Figure 2)^{4,5}.

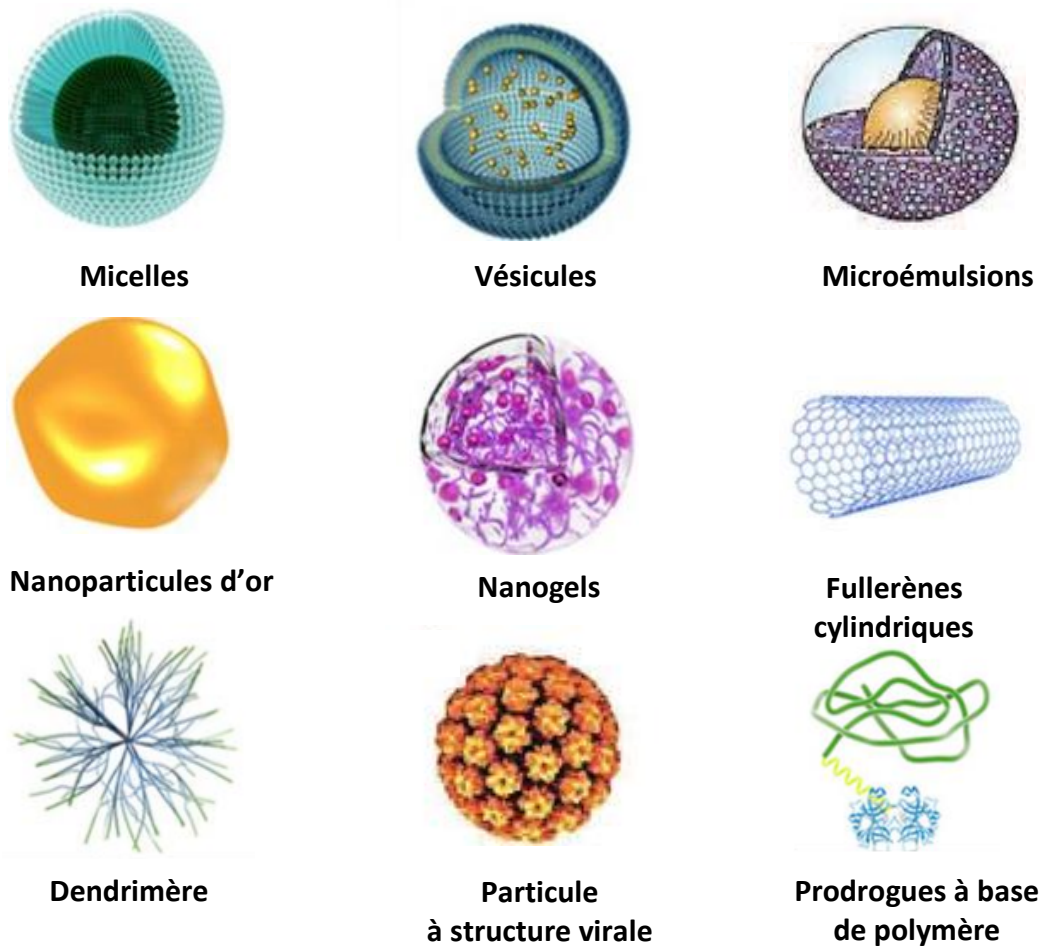


Figure 2. Exemples de nanovecteurs^{4,6}.

Pour qu'un nanovecteur soit efficace, plusieurs paramètres⁷ sont à prendre en compte tels que :

- La sélectivité vis-à-vis de la cible thérapeutique
- La biocompatibilité avec les cellules saines (qu'il soit inerte biologiquement)
- Avoir un effet thérapeutique significatif en apportant une meilleure biodisponibilité du principe actif tout en limitant ces effets secondaires lorsqu'il est administré seul

- Assurer une certaine furtivité du principe actif et de lui-même lorsqu'il est introduit dans la circulation sanguine et qu'il soit non reconnu vis-à-vis du système immunitaire

Parmi les outils de construction de ces systèmes, figurent les tensioactifs qui sont principalement utilisés pour leurs auto-assemblages originaux⁸.

❖ *Les tensioactifs*

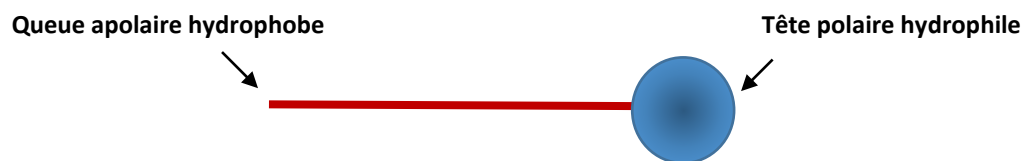


Figure 3. Schéma d'un tensioactif.

Les tensioactifs font partie de la classe des molécules amphiphiles et sont présents de multiples façons dans notre mode de vie (savons, produits cosmétiques, produits alimentaires). Ces molécules possèdent une partie hydrophobe et une partie hydrophile sur la même structure chimique.

Cette configuration leur confère des propriétés physico-chimiques particulières telles que l'abaissement de la tension interfaciale de mélanges en s'adsorbant aux interfaces ou encore la formation d'auto-assemblages dans l'eau au-delà d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (cmc), résultant d'une saturation au préalable de l'interface air/eau en tensioactifs^{9,10} (cf. Figure 4).

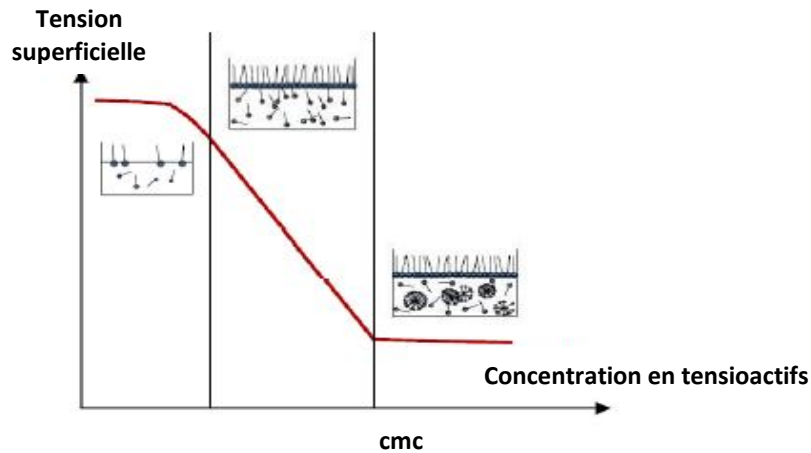


Figure 4. Courbe de la tension de surface en fonction de la concentration en tensioactifs dans la solution ¹⁰.

Ces auto-assemblages peuvent par la suite avoir différentes formes (sphériques, cylindriques, phases lamellaires, micelles inverses) en fonction de la nature de leur partie hydrophobe/tête hydrophile et des forces attractives/répulsives qui régissent leur système (cf. Figure 5). Cette caractérisation est faite par la détermination du paramètre d'empilement P selon l'équation (1) de Ninham et Israelachvili¹¹:

$$P = \frac{V}{a_0 l} \quad (1)$$

Où V représente le volume de la chaîne du tensioactif, l la longueur de chaîne hydrophobe et a_0 la surface optimale à l'interface occupée par une molécule de tensioactif.

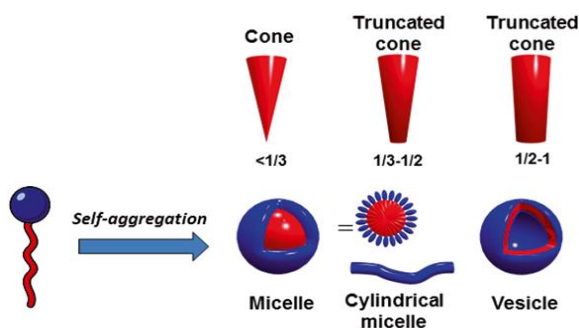


Figure 5. Forme des auto-assemblages en fonction de la valeur du paramètre d'empilement P ¹².

Les deux modèles issus de l'auto-association de ces tensioactifs et dont nous discuterons tout au long de cette thèse sont :

- Les **micelles** qui sont des auto-assemblages dynamiques de molécules amphiphiles généralement de diamètre <50 nm¹³. La dynamique de micellisation traduit le temps de passage d'une molécule de tensioactif entre un état monomérique et un état micellaire et donne également une indication sur la durée de vie dans un état micellaire, généralement de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} sec pour des tensioactifs conventionnels¹⁴. Pour une application en *drug delivery*, ce temps doit être suffisamment lent pour stabiliser le système, ce qui est le cas chez les micelles polymériques¹⁵. Généralement, les actifs hydrophobes tels que certains anti-cancéreux sont solubilisés dans le cœur hydrophobe des micelles¹⁵.
- Les **vésicules** qui sont formées d'une ou plusieurs bicouches de nature phospholipidique (liposomes¹⁶) ou de molécules amphiphiles non ioniques (niosomes¹⁷) renferment un compartiment aqueux. Elles sont généralement plus volumineuses que les micelles. Les niosomes, où le cholestérol est généralement incorporé dans ces vésicules comme excipient, sont réputés plus stables et moins coûteux à produire que les liposomes de phospholipides ce qui les rend très intéressants¹⁸. Grâce à leur bicouche lipidique, les vésicules peuvent encapsuler des actifs hydrophiles et/ou hydrophobes incorporés dans le compartiment aqueux ou dans la bicouche lipidique de la vésicule^{5,16}.

L'élaboration de ces systèmes demeure complexe car ils doivent être établis en fonction des caractéristiques du principe actif choisi, des propriétés d'auto-assemblage des tensioactifs et de la cible visée. Ainsi :

- Les assemblages doivent être suffisamment stables à la dilution pour protéger le principe actif jusqu'à son site de délivrance. Les liposomes sont beaucoup plus résistants à la dilution que les micelles. En effet, pour les micelles, la contrainte de stabilité va généralement de pair avec la cmc des tensioactifs qui les constituent, laquelle doit être suffisamment basse pour éviter la déstabilisation de ces nanovecteurs dans un système dilué, comme la circulation sanguine.

Introduction générale

- Les assemblages doivent avoir une taille comprise entre 10 et 100 nm, leur permettant l'extravasation dans le microenvironnement tumoral grâce à l'effet EPR ou « *enhanced permeation and retention effect* » (cf. Figure 6)^{19,20}. Les micelles étant généralement beaucoup plus petites que les liposomes, elles sont de bons candidats pour tirer profit de l'effet EPR.

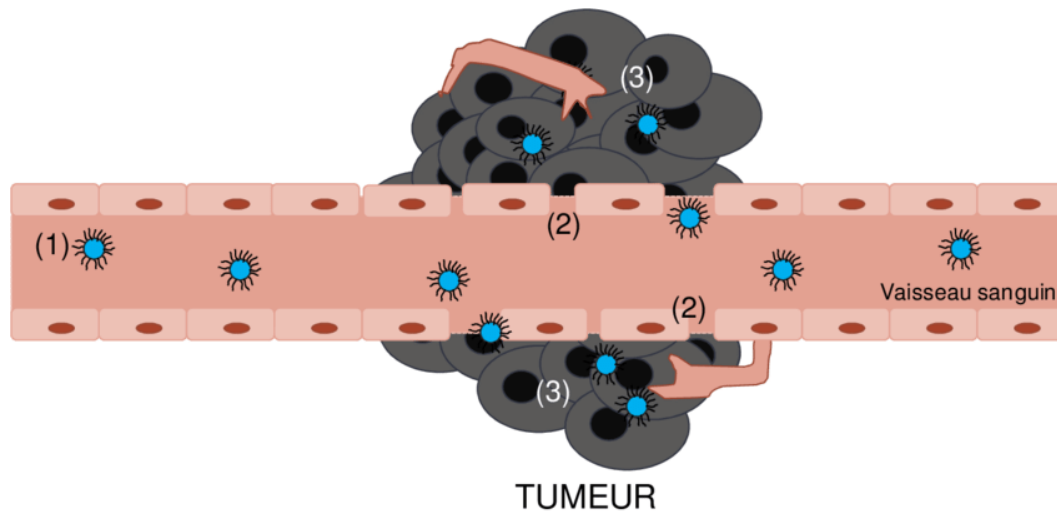


Figure 6. Représentation schématique de l'effet EPR. Les vecteurs à long temps de circulation (1) pénètrent à travers les jonctions endothéliales lacunaires au niveau de la tumeur (2) et y sont retenus du fait de la faible efficacité du drainage lymphatique, ce qui aboutit à une forte accumulation tumorale de ces vecteurs (3)¹⁹.

Une classe de tensioactifs en particulier, les tensioactifs fluorocarbonés, répondent à ces deux critères. Ils sont donc intéressants pour la délivrance de principes actifs, raison pour laquelle ils ont été très étudiés dans la littérature²¹⁻²³.

❖ *Les tensioactifs fluorocarbonés*

Le fluor est l'élément chimique le plus électronégatif de la classification périodique et est donc faiblement polarisable²⁴. En conséquence, son énergie de liaison carbone-fluor (C-F) est très élevée (environ 552 kJ/mol) comparée à celle d'une liaison carbone-hydrogène (338 kJ/mol). Par ailleurs, le diamètre de l'atome est de 0,72 Å lorsqu'il est lié de manière covalente²⁵. Le volume d'une chaîne fluorocarbonée est donc plus important que dans le cas d'une chaîne hydrocarbonée, avec une estimation des volumes d'une unité $-CF_2$ ou $-CF_3$ à 38 Å³ et 92 Å³ respectivement, contre 27 Å³ et 54 Å³ pour une unité $-CH_2$ ou $-CH_3$ respectivement^{23,24}. De plus, les atomes de fluor créent un nuage électronique dense autour du squelette carboné. En conséquence, les chaînes perfluorocarbonées sont rigidifiées avec une demande en énergie de la rotation de la liaison (C-F)–(C-F) plus grande (4,6 kJ/mol) que dans le cas de chaînes hydrocarbonées (2,1 kJ/mol). De ce fait, ces chaînes ont tendance à s'organiser en conformation hélicoïdale pour minimiser cette demande énergétique²⁵.

Les chaînes perfluorocarbonées sont très stables chimiquement et thermiquement, comparées à leurs analogues hydrocarbonés. Cela a un impact sur les propriétés colloïdales des tensioactifs fluorocarbonés, qui ont généralement des cmc plus basses du fait de leur hydrophobie plus marquée, avec en général une contribution du groupe $-CF_2$ sur la micellisation équivalent à 1,5 fois celle d'un méthylène $-CH_2$ ²⁷. D'autre part, leurs propriétés interfaciales sont plus intéressantes avec un abaissement de la tension de surface de l'eau plus important jusqu'à ~20 mN/m et parfois moins, contrairement à ~30-40 mN/m pour les analogues hydrocarbonés²⁴. Enfin, elles sont considérées comme inertes biologiquement²⁶.

De ce fait, on trouve les tensioactifs fluorocarbonés utilisés dans de nombreuses applications comme:

- Émulsifiants pour des microémulsions eau dans le CO₂ supercritique (extraction de molécules polaires)^{28,29} ou dans les perfluorocarbures (systèmes de délivrance d'oxygène ou de principes actifs par ventilation liquidienne)^{23,30}
- Additifs pour l'extraction et la stabilisation de protéines membranaires^{12,31-33}

- Additifs dans les mousses extinctrices de feux³⁴
- Agents de contraste dans le diagnostic biomédical^{35,36}

Toutefois, il existe quelques contraintes pour l'utilisation de ces tensioactifs dans les applications citées :

D'une part, le caractère ambivalent de la chaîne fluorocarbonée, qui est à la fois lipophobe et hydrophobe²³, pourrait limiter la solubilisation d'actifs au sein de ces agrégats. En effet, il a été démontré que les chaînes fluorocarbonées et hydrocarbonées étaient immiscibles, ce qui peut limiter leur utilisation dans le cas de micelles mixtes³⁷.

D'autre part, il existe un problème de bioaccumulation environnementale, notamment pour les tensioactifs fluorocarbonés ayant une longue chaîne perfluorée³⁸.

Enfin, le coût industriel est un facteur réfrénant à la production de ces molécules³⁹. Les travaux de recherche tendent à limiter l'apport de fluor dans les molécules tout en conservant les propriétés colloïdales très intéressantes des tensioactifs fluorocarbonés.

❖ **Objectifs de ces travaux de thèse**

Face à cette problématique, une nouvelle classe de tensioactifs bicaténaires a émergé dans les années 1990, appelée tensioactifs hybrides fluorocarbonés–hydrocarbonés, possédant la particularité d'avoir une chaîne fluorocarbonée et une chaîne hydrocarbonée sur la même structure chimique⁴⁰. Ils possèdent des propriétés assez similaires à leurs analogues fluorocarbonés que nous allons aborder dans un premier chapitre bibliographique. La rétrospective de ces structures hybrides existantes ainsi que leurs applications majeures seront détaillées afin de préciser pourquoi ils pourraient être une alternative souhaitable à leurs analogues fluorocarbonés.

Les objectifs principaux de ces travaux de thèse sont donc :

- De concevoir un tensioactif hybride comme potentiel vecteur (Chapitre II)
- D'étudier les propriétés physico-chimiques du vecteur (Chapitre III)

- D'étudier le potentiel d'encapsulation du vecteur vis-à-vis d'un anti-cancéreux hydrophobe (Chapitre IV).

Dans le chapitre II, nous nous intéresserons à la synthèse de nouveaux tensioactifs non ioniques F–H. Pour s'assurer d'une biocompatibilité du futur vecteur, nous avons choisi de construire notre architecture moléculaire à partir d'un acide-aminé, la sérine, et de motifs hydrophiles de type PEG et glucose. La construction dans un premier temps d'un fragment hybride F–H apolaire avec des longueurs de chaînes variables, permet de concevoir diverses séries de tensioactifs hybrides F–H de géométrie modulables. Dans un second temps, nous avons décidé de greffer ce fragment hybride F–H aux têtes polaires choisies *via* une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre (I) de « *chimie click* » et aboutit à une jonction chimique de type cycle triazole. Ce choix a été porté notamment sur la facilité de mise en œuvre de cette réaction concertée entre un dérivé azoture et un dérivé propargylé, réalisée dans des conditions douces. Son utilisation a permis d'élaborer un modèle de structure amphiphile versatile et originale.

L'étude des propriétés physico-chimiques de ces auto-assemblages est ensuite abordée au Chapitre III. Plusieurs méthodes physico-chimiques à haute sensibilité ont été utilisées pour déterminer dans un premier temps les propriétés de surface et thermodynamiques des tensioactifs PEGylés hydrosolubles qui forment des micelles. Parmi ces méthodes, des expériences en titration calorimétrique isotherme et de spectrofluorimétrie ont été menées dans le cadre d'une mobilité sortante du programme Perdiguier de l'Université d'Avignon en 2019 au sein du laboratoire d'accueil « Molecular Biophysics » du Prof. Dr. S. Keller (Kaiserslautern, Allemagne). Des expériences de diffusion de la lumière statique et dynamique ont également été menées en Allemagne pour déterminer la taille des agrégats formés sur les dérivés PEGylés.

Parallèlement lors de cette mobilité sortante, la faible hydrosolubilité des tensioactifs glucosylés nous a conduits à les valoriser en tant que systèmes vésiculaires hydrosolubles, dont la préparation est détaillée dans le Chapitre III. L'étude de leur stabilité cinétique dans différentes conditions de solvants et de température, a été faite par diffusion dynamique de la lumière, pour s'assurer de leur utilisation en conditions physiologiques.

Enfin, une étude par microscopie électronique à transmission (MET), a permis de visualiser les formes et tailles des agrégats de tensioactifs PEGylés et glucosylés et d'établir un lien entre leur structure chimique et la forme finale des agrégats formés. Cette étude a été menée par nos collaborateurs de l'Université Martin Luther de Halle-Wittenberg en Allemagne, au laboratoire du Dr. Annette Meister (Equipe ZIK HALOmem & Institut de Biochimie et Biotechnologie).

Ces données physico-chimiques ont permis d'élire un tensioactif candidat PEGylé pour une application d'encapsulation d'un anti-cancéreux hydrophobe, le Paclitaxel (PTX), décrite dans le Chapitre IV. Après l'étude comparative des techniques d'encapsulation possibles, nous avons mis au point une formulation vecteur-PTX dont les paramètres d'optimisation (tels que la charge médicamenteuse dans les micelles et l'efficacité d'encapsulation) ont été déterminés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

Par la suite, le phénomène de libération de l'actif, par fuite passive des micelles, a été étudié par suivi cinétique de relargage. En parallèle, des tests de viabilité cellulaire ont été menés sur le vecteur seul et sur cette formulation vecteur-PTX pour s'assurer du caractère biocompatible du vecteur d'une part, et d'une amélioration de l'activité pharmacologique de l'anti-cancéreux par cette formulation, sur des lignées cancéreuses pulmonaires d'autre part. Ces tests ont été réalisés par nos collaborateurs de l'Institut de NeuroPhysiopathologie (équipe GliOME) à Aix-Marseille Université (AMU).

Dans une dernière partie, les modes opératoires utilisés tout au long de la thèse ainsi que les protocoles expérimentaux de synthèse accompagnés de leurs spectres RMN seront présentés en fin de ce manuscrit.

**CHAPITRE I. LES TENSIOACTIFS HYBRIDES À
CHAÎNES FLUOROCARBONÉE-
HYDROCARBONÉE**

La synthèse en trois étapes est réalisée à partir d'un acide perfluoré (6 à 9 carbones perfluorés) sur lequel est greffée une chaîne hydrocarbonée (1 à 9 carbones). L'insertion de la tête polaire anionique sulfonée $-\text{SO}_3\text{Na}$ a été faite par une sulfonation avec le couple acide chlorosulfonique/pyridine. Le rendement global de la synthèse est de 69 % dans le cas de chaînes apolaires à 7 carbones fluorés et 7 carbones hydrogénés. Les auteurs ont rapporté la formation de micelles dont les cmc des composés suivaient l'équation (I.1) de Klevens lorsque la chaîne hydrocarbonée dépasse 2 atomes de carbone⁴² :

$$\log(\text{cmc}) = A - Bl \quad (\text{I.1})$$

Où l est le nombre d'atomes de la chaîne variante fluorocarbonée ou hydrocarbonée, A et B des constantes par une régression linéaire des données expérimentales.

Les résultats ont indiqué une diminution de la cmc de 35 % pour chaque groupement $-\text{CH}_2$ ajouté pour une chaîne fluorocarbonée fixe et de 75 % pour chaque groupement $-\text{CF}_2$ ajouté pour une chaîne hydrocarbonée fixe. Ceci indique une contribution à la micellisation plus forte des $-\text{CF}_2$ par rapport aux $-\text{CH}_2$ ^{40,43}.

Cependant, des problèmes d'hydrolyse des composés ont été reportés, notamment en présence d'humidité, ce qui limite leur stabilité dans le temps. L'explication la plus probable, selon les mêmes auteurs, serait la présence du groupe $-\text{SO}_3\text{Na}$ fortement électroattracteur, lié à la chaîne fluorocarbonée sur le même carbone.

Pour améliorer la stabilité de ces tensioactifs hybrides, le groupe de Yoshino *et al.*⁴⁴ a développé 6 tensioactifs anioniques sulfonés ayant une structure qui diffère de ceux de Guo *et al.* par la présence d'un bras écarteur benzénique. Les chaînes apolaires sont greffées sur l'iodobenzène via une réaction d'acylation de Friedel-Crafts puis d'une perfluoroalkylation au complexe Cu/ diméthylsulfoxyde (DMSO). La tête sulfonate est introduite sur l'aromatique F-H par une sulfonation régiosélective (complexe $\text{SO}_3/1,4$ -dioxane), sur le méthylène en α de la cétone permettant ainsi d'éloigner la chaîne perfluorocarbonée de la tête polaire anionique (*cf. Schéma I-3*).

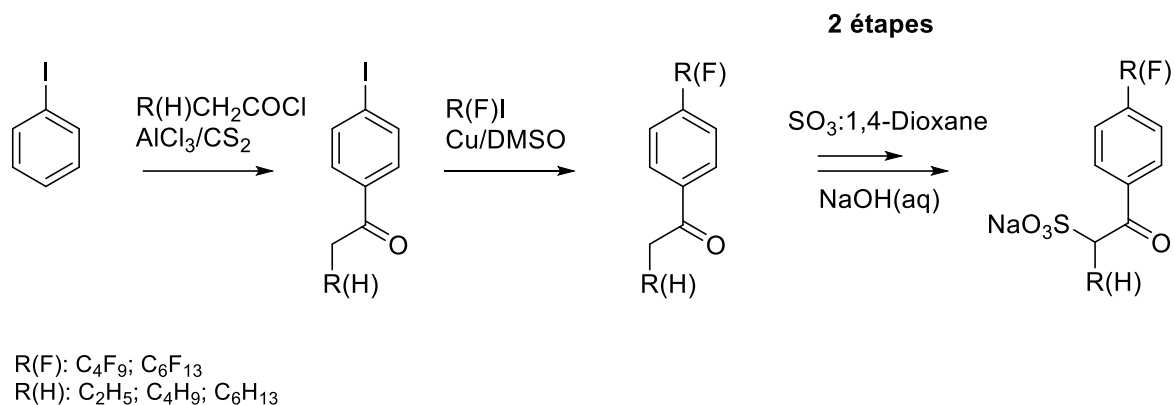


Schéma I-3. Schéma des travaux de synthèse réalisés par Yoshino *et al*⁴⁴.

Les tensioactifs synthétisés ont montré une thermorésistance remarquable jusqu'à environ 200 °C ainsi qu'une grande stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse à 25 °C. Parallèlement, plusieurs propriétés physico-chimiques ont été notées :

- Une haute activité de surface mise en évidence par une tension de surface proche de 20 mN/m à la cmc, valeur similaire à celle de tensioactifs fluorocarbonés. D'autre part, la tension de surface de l'eau n'est pas constante à des concentrations micellaires au-dessus de la cmc ; ce qui d'après les auteurs indiqueraient que la morphologie des micelles change avec la concentration^{44,45}.
- Une cmc très basse (55 μM) pour le tensioactif ayant une chaîne perfluorocarbonée et une chaîne hydrocarbonée à 6 carbones respectivement.

Des études physico-chimiques complémentaires ont révélé des propriétés singulières liées à l'hybridité des tensioactifs hybrides F-H que l'on ne rencontre pas chez leurs analogues hydrocarbonés⁴⁶ telles que :

- Une capacité à émulsifier des systèmes ternaires *n*-octane/perfluoropolyether/eau d'ordinaire immiscibles entre eux. Ceci pourrait se révéler particulièrement intéressante pour la préparation de peintures fluorées hydrosolubles⁴⁴.

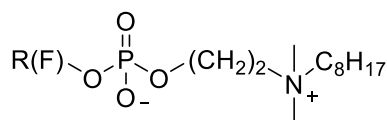
- Une haute viscoélasticité à 37 °C des solutions aqueuses à 10 % massique en tensioactif pour le composé ayant une chaîne perfluorocarbonée à 6 carbones et une chaîne hydrocarbonée à 4 carbones (**FC₆-HC₄**)^{47,48}.
- L'existence d'une phase de ségrégation intra-micellaire entre les chaînes fluorocarbonées et hydrocarbonées conditionnant la forme et taille des agrégats formés⁴⁹.
- La possibilité (notamment pour le tensioactif **FC₆-HC₄**) de solubiliser indépendamment des huiles perfluorocarbonées et hydrocarbonées (comme le perfluorobenzène et le 2-naphtol) mais également de les cosolubiliser. Les travaux de Saeki *et al.* ont également rapporté une solubilisation de perfluorobenzène 10 fois plus importante dans les agrégats hybrides que dans ceux de l'analogie bicaténaire hydrocarboné⁵⁰.

2. Rétrospective de la synthèse de ces composés

À partir des années 2000⁴⁰, la synthèse de tensioactifs hybrides F-H s'est développée considérablement et il est dès lors possible de les classer par famille de composés sur des critères structuraux :

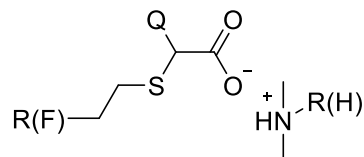
- Les tensioactifs *ioniques* : *anioniques* (chargés négativement) ou *cationiques* (chargés positivement))
- Les tensioactifs *non ioniques*, qui ne possèdent pas de charges électrostatiques et sont donc neutres.
- Les tensioactifs *zwitterioniques* (*cf. Schéma I-4*), qui possèdent à la fois une charge positive et une charge négative. À notre connaissance, nous avons relevé un seul exemple dans la littérature synthétisé par le groupe de Peresykin *et al.* en 2007⁵¹. Enfin, les tensioactifs catanioniques composés de deux parties de structure chimique et de charges différentes avec une chaîne fluorocarbonée et hydrocarbonée sur chaque partie. Les charges opposées permettent la formation d'une liaison

électrostatique aboutissant au tensioactif hybride final. Une structure hybride appartenant à cette classe a été rapportée par le groupe de Diouf *et al.* en 2014⁵².



R(F): (CH₂)₂C₆F₁₃; CH₂C₇F₁₅; CH₂C₄F₈H

Peresypskin *et al.* (2007)



R(F): C₄F₉; C₆F₁₃; C₈H₁₇
R(H): C₆H₁₃; C₈H₁₇; C₁₀H₂₁; C₁₂H₂₅
Q: H ou Cl

Diouf *et al.* (2014)

Schéma I-4. Structures chimiques des tensioactifs zwitterioniques hybrides F–H reportés dans la littérature^{51,52}.

Dans la suite du chapitre, nous nous focaliserons exclusivement sur les tensioactifs ioniques et non ioniques qui constituent la très large majorité des travaux publiés dans la littérature.

2.1 Les tensioactifs ioniques

2.1.1 Généralités

Suite aux travaux de Yoshino *et al.*⁴⁴, les classes de tensioactifs ioniques anioniques^{43,53–58} et cationiques^{59–64} représentent la majeure partie des tensioactifs hybrides F–H décrits dans la littérature. D'une part, les structures générales des tensioactifs anioniques sont présentées dans le *Schéma I-5*.

Tensioactifs hybrides F-H anioniques

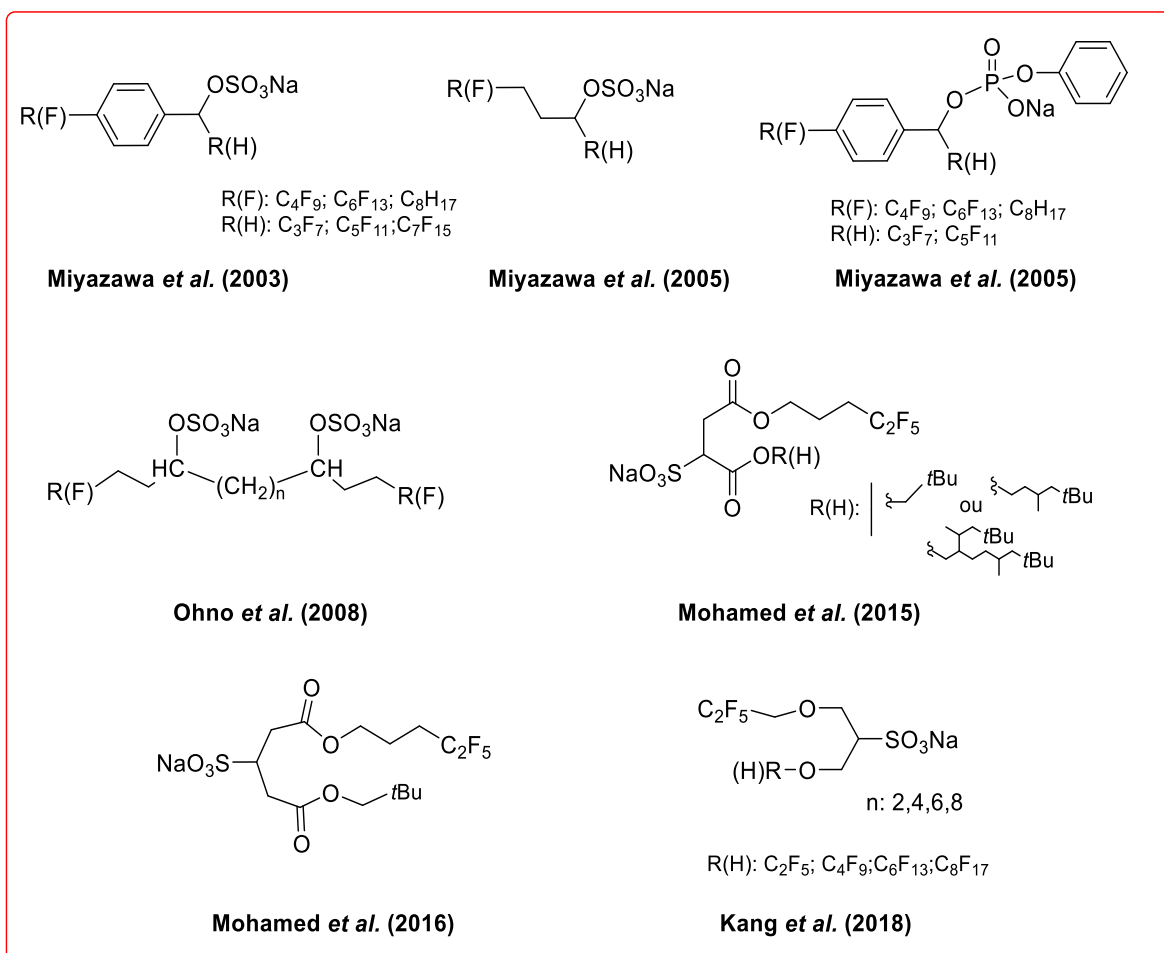


Schéma I-5. Structures chimiques de tensioactifs hybrides F-H ioniques^{43,53-58}.

Les travaux de Miyazawa *et al.*^{43,53,58} qui s'inscrivent dans la continuité des travaux du groupe de Yoshino⁴⁴ sur les tensioactifs anioniques, ont permis d'élargir la famille des tensioactifs sulfonates et phosphonates. Concernant les dérivés sulfonates, l'étude de l'influence de la nature du bras écarteur (*i.e.* lien benzénique ou éthylène) entre la tête polaire et la chaîne perfluorocarbonée a été également conduite. De meilleurs rendements sont obtenus avec un bras écarteur éthylène (70 % contre 30 % pour la fonction benzénique) et les cmc sont 3,5 fois plus hautes que celles constatées sur les tensioactifs contenant une fonction benzénique, ce qui peut s'expliquer par une hydrophobie moins marquée.

D'autre part à notre connaissance, nous avons compté 5 dérivés hybrides F-H cationiques qui sont présentées dans le Schéma I-6.

Tensioactifs hybrides F-H cationiques

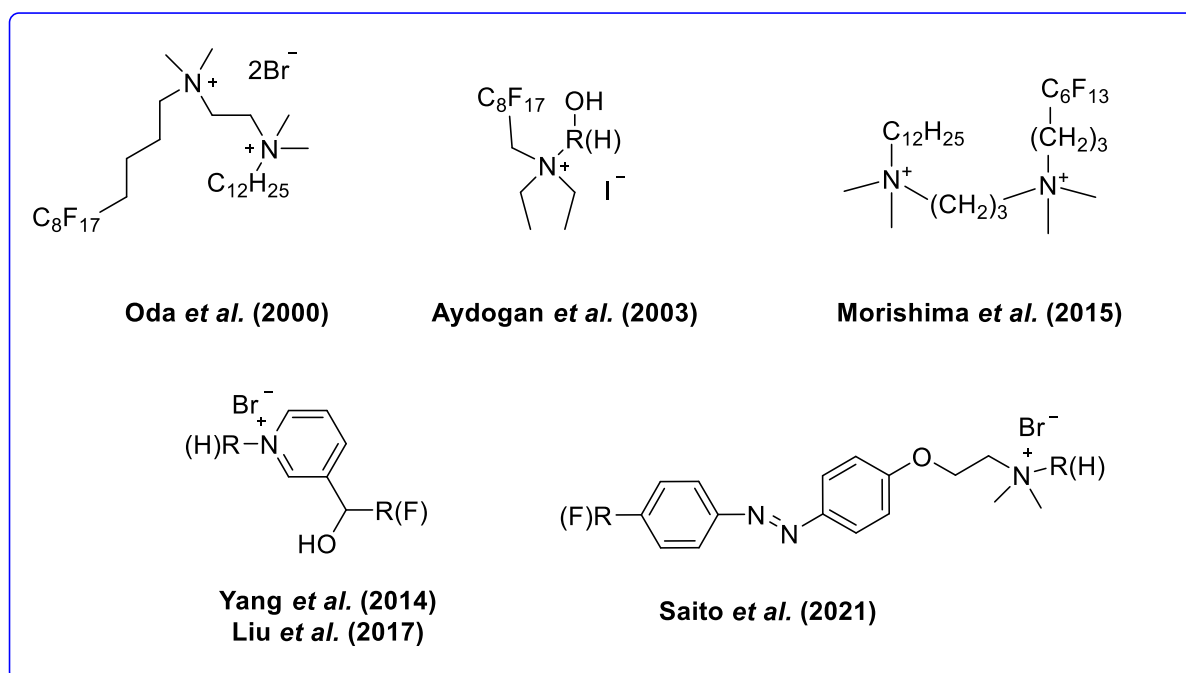


Schéma I-6. Structures chimiques de tensioactifs hybrides F–H cationiques^{59–64}.

Les tensioactifs ioniques ont été beaucoup étudiés pour leurs propriétés physico-chimiques et la morphologie de leurs agrégats. De nombreuses applications découlent de ces structures : par exemple, ils abaissent la tension de surface aux alentours de 20 mN/m, valeurs retrouvées généralement pour les tensioactifs fluorocarbonés^{40,61,62}.

D'un point de vue morphologique, l'augmentation de la longueur des chaînes hydrophobes augmente le diamètre micellaire et favorise la ségrégation intra-micellaire entre les chaînes fluorocarbonées et hydrocarbonées. Ainsi, les chaînes fluorocarbonées pourraient être conditionnées au cœur des micelles et les chaînes hydrocarbonées recouvriraient la structure sous forme de couronne, elles-mêmes enveloppées dans la partie hydrophile au contact des molécules d'eau environnantes^{37,40}. Ce phénomène pourrait réduire la contribution hydrophobe de l'ajout d'un $-CH_2$ sur la chaîne hydrocarbonée du tensioactif hybride comparé à des tensioactifs hydrocarbonés généraux^{45,65}.

En complément de ces informations, certains travaux réalisés sur les tensioactifs hybrides F–H anioniques ont mis en évidence l'influence de la concentration sur le paramètre d'empilement P et donc du type d'agrégat formé, confirmant les observations de Yoshino et

α ^{44,45,66}. En effet, ils relatent la formation de micelles sphériques à concentration diluée avec $P < 1/3$ (disposition conique du tensioactif) avec une ségrégation intra-micellaire entre les chaînes hydrophobes (cf. Figure I-1). Plus la concentration en tensioactif anionique augmente, plus la force ionique augmente avec les interactions intermoléculaires, réduisant la taille du groupement hydrophile et forçant la chaîne hydrocarbonée à pénétrer à l'intérieur du cœur de l'agrégat. On peut ainsi observer en microscopie l'apparition de micelles cylindriques, de vésicules ou encore de phases lamellaires et de gels à plus haute concentration⁴⁵.

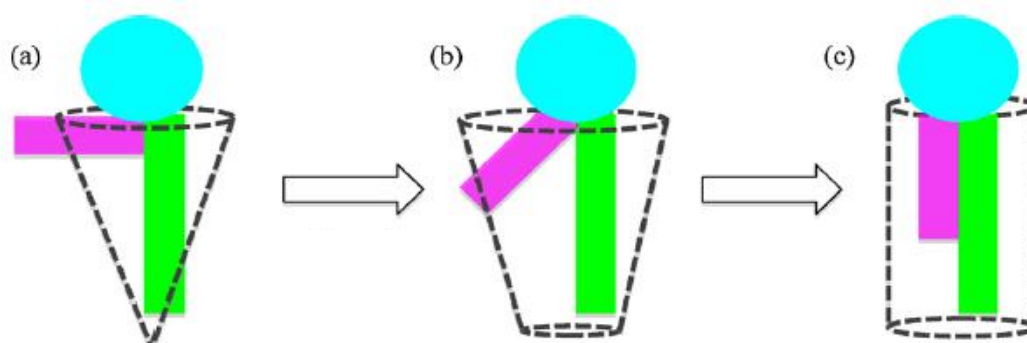


Figure I-1. Possibilité de transition de phase pour les tensioactifs hybrides, exemple avec le tensioactif F_8H_3OS : (a) 16 mM ; (b) 160 mM et (c) 480 mM⁴⁵.

Une autre particularité de ces tensioactifs est la formation de micelles dont les temps de vie sont 100 et 1000 fois plus importants que pour les tensioactifs conventionnels^{14,59}.

L'hybridité apporte d'autres propriétés uniques dans le cas de tensioactifs cationiques. Le modèle de bolaforme hybride asymétrique, rapporté dans les travaux d'Aydogan *et al.* (cf. Schéma I-6)⁶¹, donne des valeurs de cmc à différentes longueurs de chaînes hydrophobes qui sont indépendantes de la concentration en ions électrolytes dans le milieu ; ce qui est l'inverse généralement observé chez les tensioactifs ioniques conventionnels⁴⁰.

2.1.2 Particularité des tensioactifs gemini

Les tensioactifs gemini hybrides sont constitués de deux monomères de tensioactifs liés par un bras écarteur. Leur synthèse et leur potentiel en tant que systèmes amphiphiles est remarquable du fait de leurs cmc très basses, l'abaissement de la tension de surface et leur

haute solubilité dans l'eau⁵⁹ par rapport à leurs analogues monomériques⁵⁴. Plusieurs auteurs ont décrit la synthèse de dérivés ioniques^{54,63} ou zwitterioniques⁵¹.

Généralement ce type de tensioactifs forme spontanément des micelles cylindriques plus longues qui s'enchevêtrent plus que leurs analogues hydrocarbonés, ou donne dans certains cas des vésicules (cf. Figure I-2)^{59,63}. Le groupe de Oda *et al.* a investigué un système gemini hybride (cf. Schéma I-6) avec deux motifs hydrophiles qui conduisent à la formation de vésicules en accord avec une valeur du paramètre d'empilement plus importante, au contraire de l'analogue hydrocarboné qui forme des micelles cylindriques⁵⁹.

Morishima *et al.* ont également décrit un autre dérivé -F-H **12-3-C₃C₆^F** ayant une chaîne hydrocarbonée à 12 carbones et une chaîne semifluorocarbonée -(CH₃)₃C₆F₁₃ qui sont greffées chacune sur un ammonium quaternaire en guise de motif hydrophile, ces derniers reliés par une chaîne à 3 méthylènes. Les agrégats résultant de ce tensioactif ont été comparés à ceux formés par l'analogue hydrocarboné **12-3-12** en Figure I-2⁶³. Le diamètre et l'épaisseur des micelles cylindriques formées par ces gemini hybrides seraient plus bas que pour l'analogue hydrocarboné. Cette tendance est également observée pour le nombre de tensioactif par micelle appelé communément nombre d'agrégation *N*. Tous ces résultats suggèrent de hautes propriétés viscoélastiques à basses concentrations que l'on retrouve généralement chez les tensioactifs hybrides F-H^{47,48,63}.

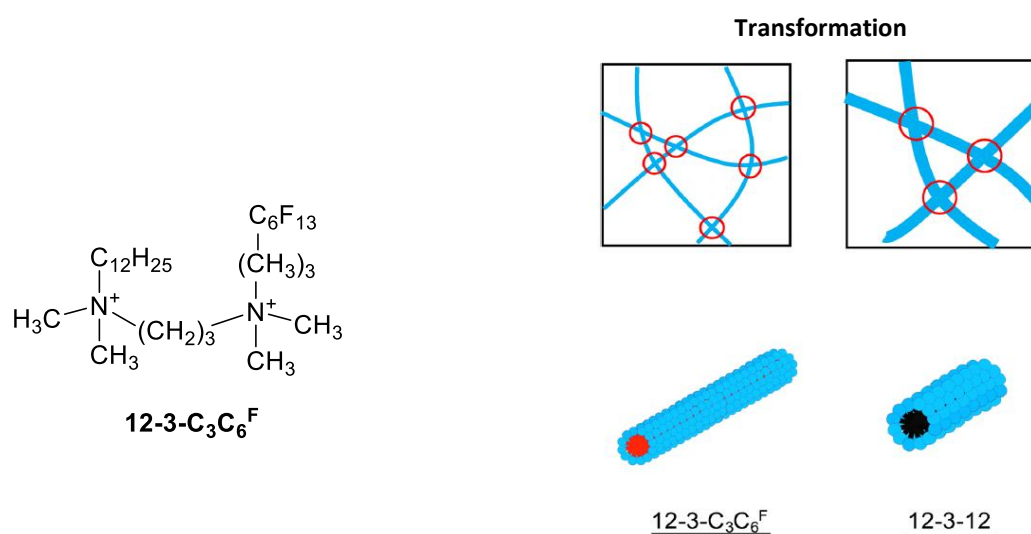


Figure I-2. Comparaison de morphologie d'un dérivé gemini hybride F-H (**12-3-C₃C₆^F**) et de son analogue hydrocarboné (**12-3-12**)⁶³.

2.1.3 Applications

On retrouve une multitude d'applications potentielles de ces tensioactifs anioniques que nous allons détailler ci-dessous. La plupart du temps, ils sont considérés comme substituants idéaux aux tensioactifs fluorocarbonés.

2.1.3.1 *Stabilisants de microémulsions eau dans le fluide supercritique (H₂O/CO₂ supercritique)*

C'est une des applications potentielles majeures relevées pour les tensioactifs anioniques sulfonates. Le fluide CO₂ supercritique est considéré comme un solvant d'extraction prometteur qui est abondant, non toxique et très bon marché⁶⁷. On l'utilise principalement :

- pour l'extraction de composés lipophiles (tels que des lipides⁶⁸) ou composés naturels provenant de matières premières végétale
- comme solvant en chromatographie séparative
- Comme solvant réactionnel pour s'affranchir des solvants usuels.

Tout cela le rend très intéressant pour des applications dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire⁶⁷. Cependant, l'extraction de composés polaires est un facteur limitant à l'utilisation du fluide CO₂ supercritique et bien souvent, l'utilisation de co-solvants doit être préférée (EtOH/MeOH). Plusieurs auteurs ont rapporté l'utilisation de tensioactifs fluorocarbonés pour s'affranchir de l'utilisation de ces co-solvants et pouvoir obtenir des microémulsions stables H₂O/CO₂ supercritique⁶⁹.

Pour garantir une bonne stabilisation des micro-émulsions H₂O/CO₂ supercritique, deux paramètres entrent alors en jeu :

- Le paramètre de pression P_{trans} , qui traduit la pression à une certaine composition et température, permettant l'obtention d'une seule phase.

- La charge en eau effective dans les micro-émulsions qui rend compte de la capacité à solubiliser une certaine quantité en substances polaires⁶⁹.

De ce fait, les tensioactifs fluorocarbonés présentent un certain avantage avec un P_{trans} bas et une haute charge en eau dans les microémulsions^{55,69}. Cependant comme déjà évoqué précédemment, le coût et la bioaccumulation de ces tensioactifs dans l'environnement limitent leur utilisation⁷⁰. En limitant l'apport de fluor dans les structures chimiques tout en conservant les propriétés physico-chimiques de ces tensioactifs, les tensioactifs hybrides F–H représentent ainsi un bon compromis.

La première étude portée à ce sujet sur l'utilisation d'un tensioactif hybride F–H a été faite sur le dérivé à tête sulfonate issu des travaux de Guo *et al.* (cf. Schéma I-2) avec deux chaînes fixes à 7 carbones perfluorés et hydrogénés^{41,71}. Dans cette étude, Harrison *et al.* ont rapporté que les tensioactifs bicaténaires ayant des chaînes ramifiées abaisseraient mieux la tension et l'énergie de surface, augmentant ainsi la compatibilité avec le fluide supercritique et la stabilisation des micro-émulsions⁷². Les travaux de Mohamed *et al.* ont élargi le panel de tensioactifs hybrides F–H, pour cette application, notamment avec la synthèse de dérivés hybrides CO₂-philes succinates hyper-branchés, puis de dérivés de glutarates aussi efficaces voire même plus performants que les analogues perfluorocarbonés (cf. Figure I-3). Ceci serait en partie dû à une hydrophobie plus prononcée qui permettrait d'augmenter l'affinité avec le CO₂ supercritique, une meilleure capacité à abaisser la tension interfaciale H₂O/CO₂ supercritique et une meilleure stabilisation des microémulsions (P_{trans} bas et haute charge en eau)^{55,56 55,56}.

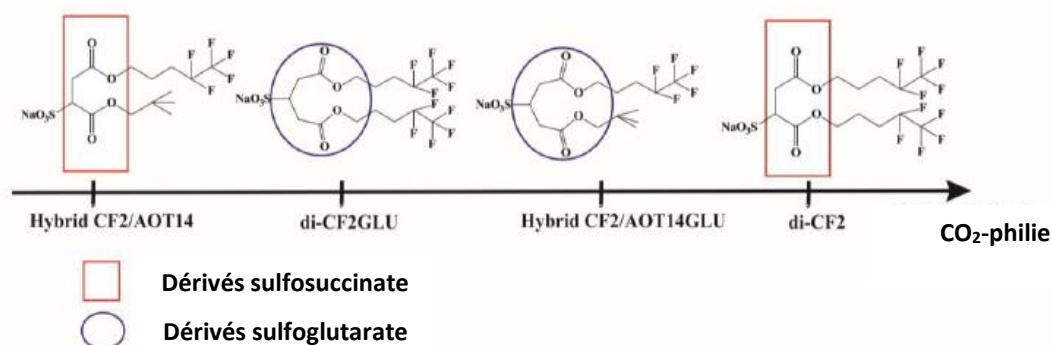


Figure I-3. Comparaison des tensioactifs bicaténaires fluorocarbonés et hybrides F–H mentionnés en terme de compatibilité avec le fluide supercritique⁵⁶.

2.1.3.2 Modificateur de surface dentaire

Une autre application potentielle de ces tensioactifs hybrides F–H a été évoquée dans les travaux de Teranaka *et al.*, qui portent sur la modification et l'étude de la stabilité de la surface de granules d'hydroxyapatite (HAP). Le HAP est un matériau très utilisé comme modèle dentaire, dont la surface a été préalablement modifiée avec certains tensioactifs hybrides F–H à têtes polaires phosphonates synthétisés par Miyazawa *et al.* (cf. Schéma I-5) ayant une chaîne fixe à 8 carbones perfluorés avec une chaîne hydrogénée de 3 ou 5 carbones^{53,73}.

Selon leurs observations, ces tensioactifs ont apporté une haute hydrophobie et lipophobie à ces surfaces, ce qui amène une augmentation de la stabilité jusqu'à plus de 90 jours. Ces résultats pourraient être très intéressants notamment dans le traitement de la plaque dentaire ou encore la prévention de caries⁷⁵.

2.1.3.3 Emulsions pour la polymérisation de fluorure de vinylidène

Le groupe de Kang *et al.* a investigué la possibilité de remplacer le **PFOA** (acide perfluorooctanoïque), par un tensioactif hybride F–H comme stabilisant d'émulsions pour la polymérisation de fluorure de vinylidène (cf. Schéma I-7)⁵⁷.



Schéma I-7. Structures chimiques du PFOA et du PVDF.

En effet, le **PFOA** est un tensioactif controversé dont la fabrication et la commercialisation ont été interdites en Europe depuis le 4 Juillet 2020⁷⁴. Ils ont synthétisé une série de tensioactifs hybrides F–H à tête anionique sulfonate, dont la chaîne

fluorocarbonée est fixée à 2 carbones et ont fait varier la longueur de chaîne hydrocarbonée avec n allant de 2 à 8 atomes de carbone (*i.e.* F_2H_n). La comparaison des performances d'émulsion a été faite avec le pentadecafluorooctanate d'ammonium (**APFO**), un tensioactif déjà utilisé pour les émulsions de **PVDF**.

La synthèse est réalisée dans des conditions douces et donne en deux étapes un rendement supérieur à 80 %. En particulier, le tensioactif F_2H_8 possède une cmc aussi basse que celle de l'analogue bicaténaire fluorocarboné F_2F_2 (0,1 mM) et abaisse fortement la tension de surface à 32 mN/m, valeur comprise entre celle du **APFO** (21 mN/m) et de son analogue bicaténaire F_2F_2 (40 mN/m). L'augmentation de la longueur de chaîne hydrocarbonée augmente l'encombrement stérique et diminue la valeur de l'aire minimale A_{min} occupée par un tensioactif à l'interface. Ils ont également observé une très grande stabilité des émulsions formées avec le tensioactif F_2H_8 dans un système ternaire perfluorohexane/toluène/eau.

La production de particules pures de **PVDF** dans les microémulsions avec le tensioactif F_2H_8 est aussi efficace qu'avec le tensioactif **APFO** (*i.e.* 22 % et 23 % massique respectivement). Il est donc prometteur, comme substituant, pour la formation d'émulsions pour la polymérisation de ces particules, d'autant plus que ce tensioactif permet de diminuer la polydispersité de tailles de particules par rapport à l'utilisation d'**APFO** (*cf.* Figure I-4).

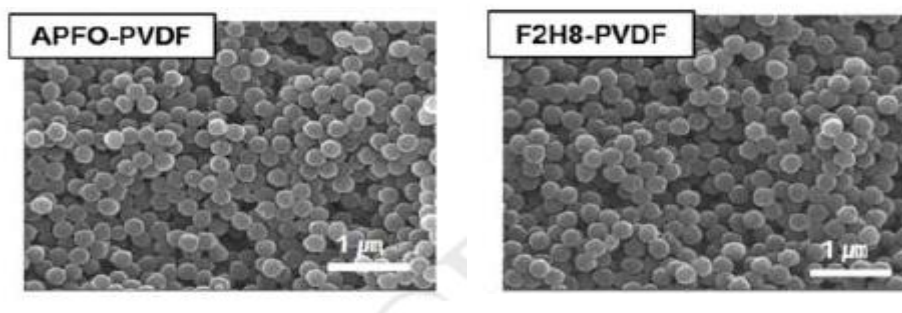


Figure I-4. Images de microscopie électronique à balayage (MEB) des particules de PVDF faites à partir des émulsions d'APFO (à gauche) et du tensioactif hybride F_2H_8 (à droite)⁵⁷.

2.1.3.4 Stabilisants pour la nucléation et de la croissance de nanoparticules d'or

D'autres tensioactifs hybrides F–H cationiques sont utilisés pour contrôler la formation (c'est-à-dire, la nucléation puis la croissance) de nanoparticules d'or en forme de fleur à partir d'une réduction de HAuCl_4 par le couple réducteur AgNO_3 /acide ascorbique (*i.e.* *goldnanoflowers* ou GNFs) (*cf.* Figure I-5). C'est le cas des dérivés de pyridinium synthétisés par le groupe de Yang *et al.* ⁶⁴. Les GNFs ont été ensuite appliqués par exemple à de la catalyse de réactions telle que la réduction de 4-nitroaniline déjà mentionnée par les mêmes auteurs⁶⁰.

Le tensioactif en lui-même, grâce à sa haute activité de surface, influe sur la morphologie des surfaces des GNFs en les stabilisant et en les rendant plus régulières. Les mêmes auteurs ont émis l'hypothèse que cette classe de tensioactifs hybrides F–H pourrait être particulièrement intéressante dans la formation d'autres nanoparticules inorganiques.

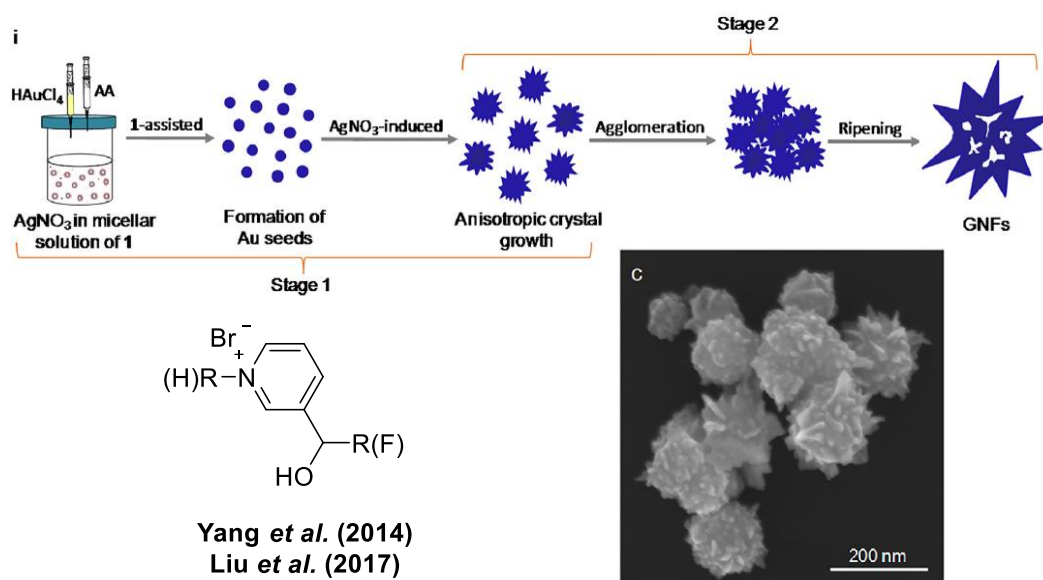


Figure I-5. Schéma du possible mécanisme de formation des particules GNPs tiré des travaux de Liu *et al.* (en haut), structure chimique du dérivé pyridinium hybride F–H utilisé (à gauche) et image MEB des GNPs (à droite)⁶⁰.

2.1.3.5 Agent photo-sensibles

Depuis quelques années^{45,75}, le groupe de Kondo *et al.* explore la synthèse de dérivés d'azobenzène et plus particulièrement associés à une structure hybride F–H (cf. Schéma I-6)⁶². Ces dérivés très stables ont la particularité de changer très rapidement de structure et/ou de propriétés chimiques suite à une irradiation lumineuse de longueur d'onde fixe. Ils peuvent aisément passer d'une configuration *trans*, la plus stable, à une configuration *cis* suite à une exposition à la lumière bleue ($\lambda=365$ nm) et réciproquement par lumière blanche. La variabilité structurale de ces composés se traduit également au niveau physico-chimique avec un changement drastique dans les propriétés interfaciales. En effet, le passage de la conformation *trans* à *cis* aboutit à une diminution de la tension de surface à l'interface air/eau (dans une gamme de 17–34 mN/m, cf. Figure I-6), avec des valeurs proches de 20 mN/m, valeurs observées pour des tensioactifs fluorocarbonés conventionnels^{49,53,76}.

La modulation des propriétés de surface de ces tensioactifs hybrides F–H telles que la mouillabilité⁷⁷, la stabilité des mousses⁷⁸ ou encore les mouvements de fluides⁸¹ par un stimulus lumineux est un atout très intéressant que les mêmes auteurs souhaitent exploiter par exemple dans le contrôle du mouvement de fluides par irradiation lumineuse avec ces tensioactifs.

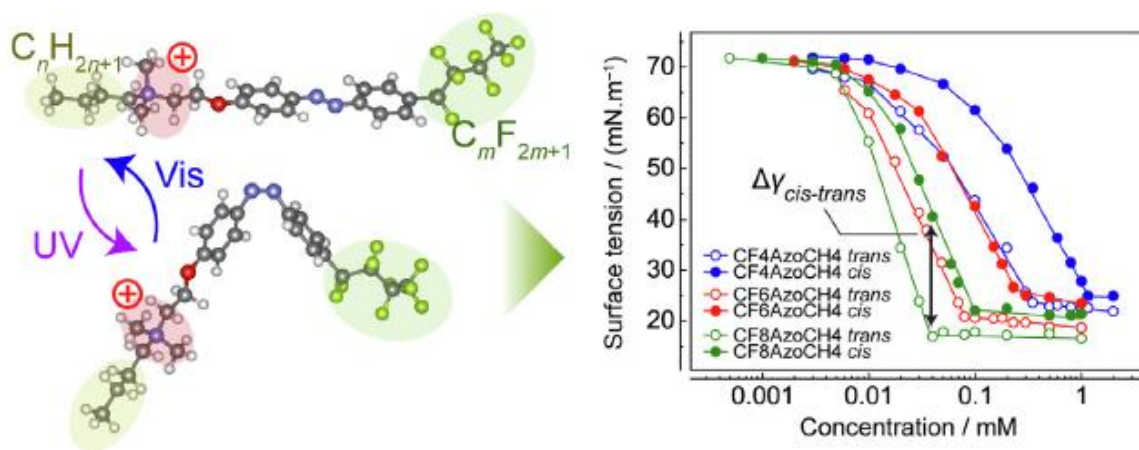


Figure I-6. Représentation des dérivés d'azobenzène hybrides F–H dans leurs conformations *cis* et *trans* et exemple de répercussion du stimulus lumineux sur les propriétés interfaciales de ces tensioactifs⁶².

2.2 Les tensioactifs non ioniques

2.2.1 Généralités

On constate de plus en plus d'études sur la synthèse et le comportement physico-chimique des tensioactifs non ioniques dans la littérature^{76,79-81}. Ces structures chimiques variées sont visibles en *Schéma I-8*.

Tensioactifs hybrides F-H non ioniques

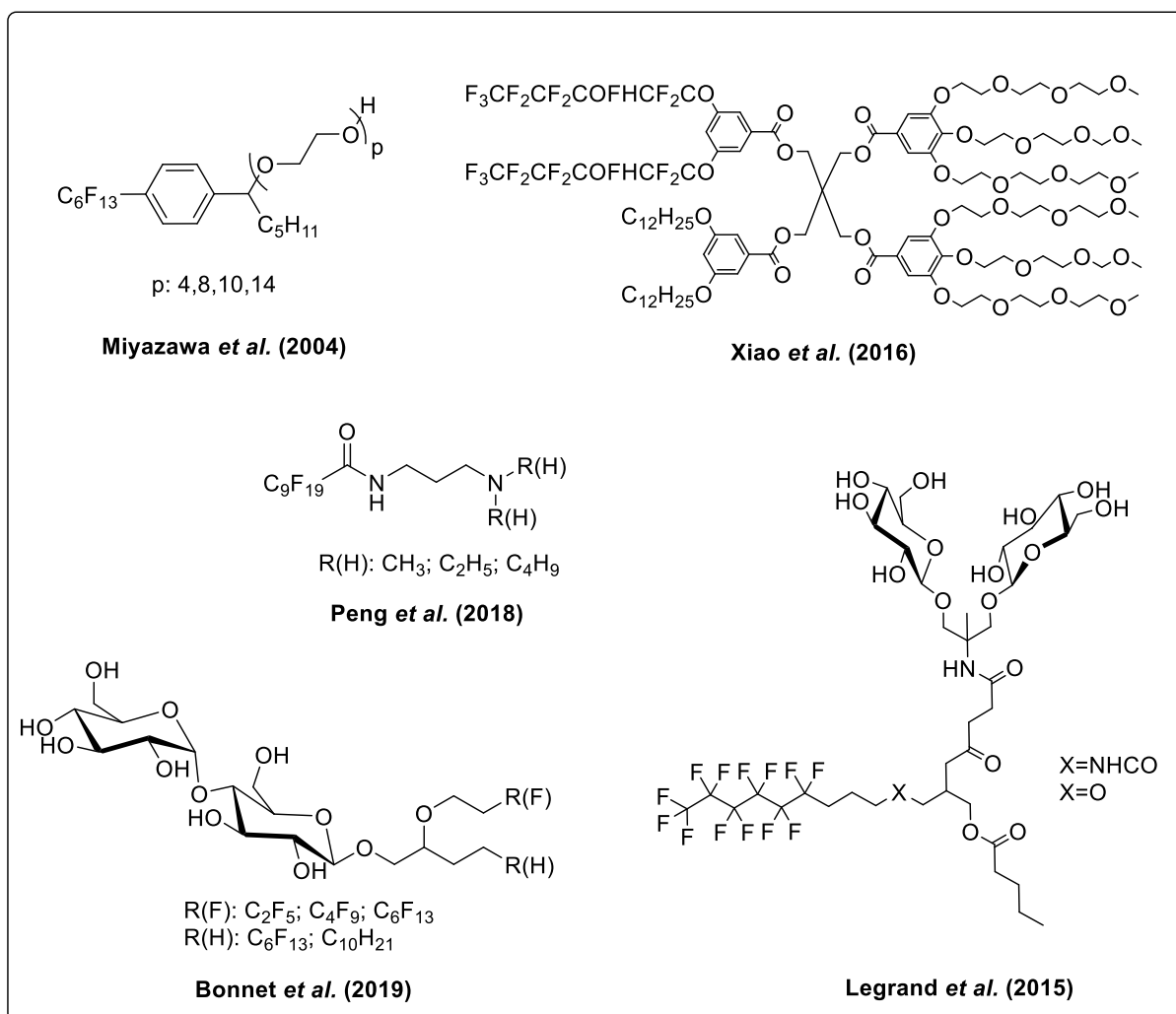


Schéma I-8. Structures chimiques des tensioactifs hybrides F-H non ioniques étudiés.

Les tensioactifs non ioniques sont moins représentés dans la littérature que les tensioactifs anioniques. Après avoir développé la synthèse de tensioactifs hybrides F-H ioniques, Miyazawa *et al.* a développé en 2004 les premiers dérivés non ioniques à base de motifs PEG comme partie hydrophile⁸². Pour ce faire, un dérivé hybride hydroxyle $\text{F}_m\text{PH}_n\text{A}$

commun aux trois séries de tensioactifs^{43,53,82} (avec m le nombre de carbones perfluorés et n le nombre de carbones hydrogénés) est préparé à partir d'iodobenzène.

L'étape suivante consiste à insérer le motif hydrophile, en y greffant une chaîne chlorée d'oxyde d'éthylène *via* une catalyse par transfert de phase dans le mélange $n\text{-Bu}_4\text{N}:\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}_{\text{aq}}$, qui donne un rendement compris entre 70 et 85 % du composé intermédiaire $\text{F}_6\text{PH}_5\text{EO}_k\text{Cl}$. La réaction est favorisée par la présence d'un alcool secondaire avec un groupe encombré comme le benzène. L'introduction de la chaîne PEGylée sur cet intermédiaire est réalisée par une réaction de Williamson donnant des rendements entre 29 % et 40 % pour le tensioactif hybride F–H PEGylé final $\text{F}_6\text{PH}_5\text{EO}_m$ (cf. Schéma I-9).

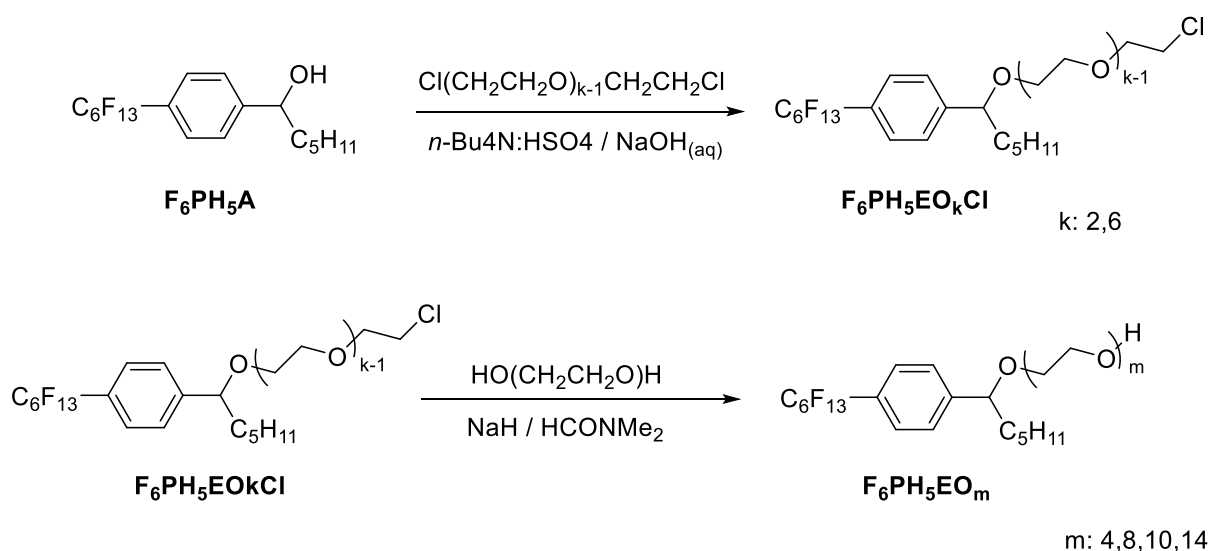


Schéma I-9. Schéma de la réaction multi-étapes⁸².

D'un point de vue physico-chimique, plus le nombre de motifs PEG augmente, plus la cmc augmente (0,63 mM et 5,4 mM pour $\text{F}_6\text{PH}_5\text{EO}_{10}$ et $\text{F}_6\text{PH}_5\text{EO}_{14}$ respectivement). De plus, les auteurs ont comparé ces résultats aux analogues anioniques et ont constaté de plus faibles cmc à mêmes longueurs de chaînes hydrophobes dans le cas de tensioactifs non ioniques (210 mM et 340 mM pour l'analogue phosphonate et l'analogue sulfonate respectivement).

A_{min} augmente avec le nombre de motifs PEG. Ces valeurs sont toutefois plus basses que celles trouvées pour des anioniques. En effet, les répulsions électrostatiques entre les têtes ioniques rendent le compactage des tensioactifs anioniques à l'interface difficile, ce qui augmente la valeur de A_{min} ⁸².

En ce qui concerne la tension de surface à la cmc γ_{cmc} , les valeurs se trouvent à 20 mN/m et leur confèrent une haute activité de surface. Cette propriété semble être partagée quelle que soit la classe de tensioactif hybride F–H visée et rappelle une similarité de comportement avec les tensioactifs fluorocarbonés⁴⁰.

2.2.2 Applications

2.2.2.1 Transport de principes actifs et d'oxygène avec des perfluorocarbures

Une des applications médicales étudiée sur les tensioactifs hybrides F–H est la ventilation liquidienne. Cette technique consiste à remplir les voies respiratoires par un perfluorocarbure qui agit comme transporteur d'oxygène. C'est une méthode plus efficace et moins agressive que les méthodes classiques de ventilation gazeuse, surtout dans le cas de poumons non matures comme chez les nouveau-nés atteints du syndrome de détresse respiratoire (SDR)^{23,82}.

Le groupe de Williams *et al.* en 1998 a investigué la possibilité d'utiliser des tensioactifs hybrides F–H comme transporteurs de principes actifs dans des microémulsions inverses stables H₂O/perfluorocarbure comme le bromure de perfluorooctyle (**PFOB**). en utilisant un dérivé de cétone hybride F–H, le 1-(4-Perfluorobutylphenyl)-1-hexanone synthétisé par le groupe de Yoshino *et al.*^{44,83}. Miyazawa *et al.* ont suggéré l'utilisation de leurs dérivés hybrides F–H PEGylés comme transporteurs de principes actifs dans des émulsions eau/perfluorocarbure en précisant que les chaînes PEG sont généralement biocompatibles, ce qui est un point crucial pour une application médicale.

2.2.2.2 Glycolipides dans l'extraction et la stabilisation de protéines membranaires

Les protéines membranaires représentent environ 60 % des cibles thérapeutiques dont il convient de connaître la structure pour concevoir des médicaments efficaces. Cependant,

ces études requièrent de cristalliser ces cibles thérapeutiques en les maintenant en solution aqueuse dans une conformation native. Les détergents classiques peuvent aider en ce sens pour extraire ces cibles de leur environnement lipidique, mais peuvent avoir un pouvoir déstabilisant et dénaturant ; si bien que les protéines se retrouvent dénaturées. Les tensioactifs hybrides F–H peuvent grâce à leur chaîne perfluorocarbonée, être considérés comme des détergents « doux » et ainsi être utilisés comme additifs pour extraire et stabiliser ces protéines membranaires dans leur conformation native^{12,81}.

Ainsi dans notre laboratoire, plusieurs séries de tensioactifs hybrides F–H avec des têtes diglucosylées et maltosylées ont vu le jour (*cf. Schéma I-10*).

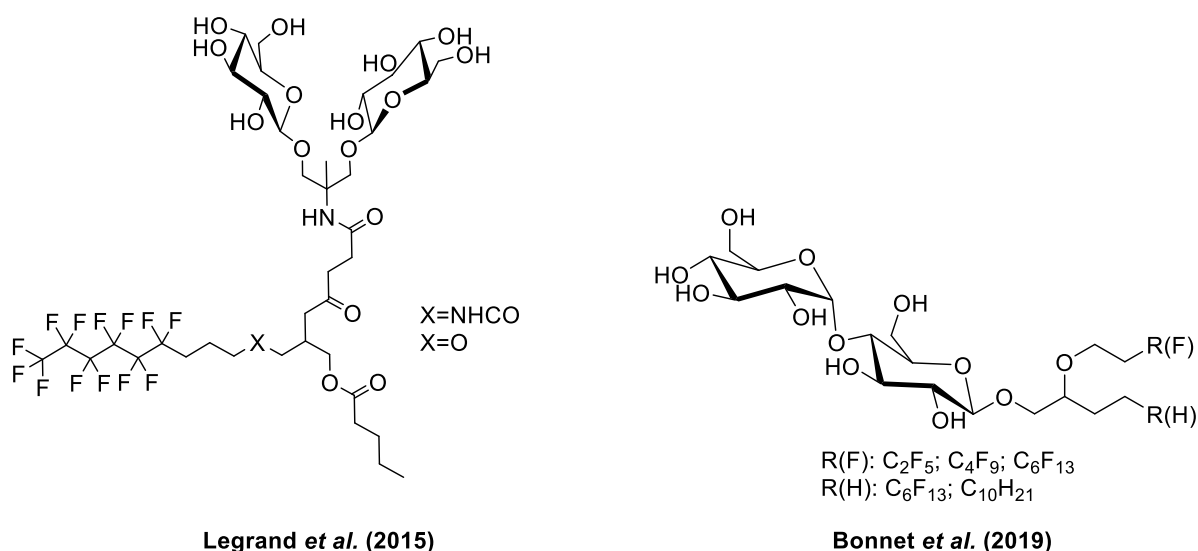


Schéma I-10. Structures chimiques de tensioactifs hybrides F–H diglucosylés (à gauche) et maltosylés (à droite) synthétisés au laboratoire ces dernières années^{79,81}.

Tout le challenge consiste à assurer une bonne aptitude à maintenir les protéines stables et solubles par interaction entre les domaines hydrophobes de la protéine et la chaîne hydrogénée, tout en maintenant le caractère doux des tensioactifs perfluorés. De plus, garder des longueurs de chaînes F–H relativement courtes tout en augmentant le caractère hydrophobe du tensioactif serait un moyen d'obtenir des agrégats de relativement petite taille de type micelles pour les dérivés glucosylés (entre 7–11 nm)⁷⁹.

Ces tensioactifs abaissent la tension de surface à la cmc jusqu'à ~24 mN/m en accord avec des valeurs associées aux tensioactifs hybrides F–H vus dans ce chapitre. Les cmc sont également plus faibles (79 μM et 11 μM) que dans le cas de leurs analogues perfluorocarbonés ou hemifluorés **F₆DigluM**⁸⁴ et **F₆H₃DigluM**⁸⁵ (0,38 et 0,79 mM respectivement).

Leur utilisation sur la protéine membranaire bactériorhodopsine montre une stabilité du complexe avec le dérivé hybride F–H d'éther jusqu'à 1 mois⁷⁹. En raison du volume plus faible de la tête maltose, la deuxième série nous a conduit à de plus larges agrégats (15–100 nm)⁸¹ et ces composés se sont révélés peu solubles dans l'eau. Cependant en association avec le *N*-dodécylmaltoside (DDM), ces derniers ont conduit à de bons rendements d'extraction de deux protéines modèles (A_{2A}R et AcrB) et une bonne thermostabilité de la protéine A_{2A}R, des critères prometteurs pour cette application biomédicale⁸¹.

2.2.2.3 Les dendrimères de Janus hybrides F–H comme potentiels agents de contraste

Les dendrimères de Janus amphiphiles sont des structures chimiques hyperbranchées contenant des parties hydrophobes et dendrons hydrophiles qui s'auto-assemblent sous la forme de dendrimersomes (DSs), des vésicules à l'échelle nanométrique, formés une fois leur solution éthanolique en dendrimères injectée dans l'eau⁸⁰.

Ils sont largement étudiés pour leur architecture complexe et leurs applications thérapeutiques ou de diagnostic (délivrance de principes actifs⁸⁶, agents de contraste ou sondes fluorescentes⁸⁷, catalyse⁸⁸).

Il y a quelques années, le groupe de Xiao *et al.*⁸⁰ a décrit la synthèse d'un dendrimère de Janus hybride F–H et a étudié la morphologie des dendrimersomes formés. Ils ont ainsi comparé la taille et la forme de dendrimersomes issue de 3 types de dendrimères de Janus : un analogue hydrocarboné (**R_H**), un analogue hybride (**R_{HF}**) et un analogue fluorocarboné (**R_F**). Le chaînon fluorocarboné en question est le perfluoropropyl vinyl éther (**PPVE**) (*cf. Figure 1-7*). La comparaison des tailles de dendrimersomes, déterminées par diffusion de la lumière a

mis en évidence une tendance similaire pour tous les analogues à augmenter la taille des agrégats avec l'augmentation de la concentration⁸⁹.

Les auteurs ont remarqué que les dendrimersomes R_{HF} ont des tailles supérieures (142 nm) à leurs analogues R_H (120 nm) ou R_F (121 nm). Ils forment des vésicules multi-lamellaires (VML) de 2 à 11 bicouches comparables aux tensioactifs fluorocarbonés en cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-ME).

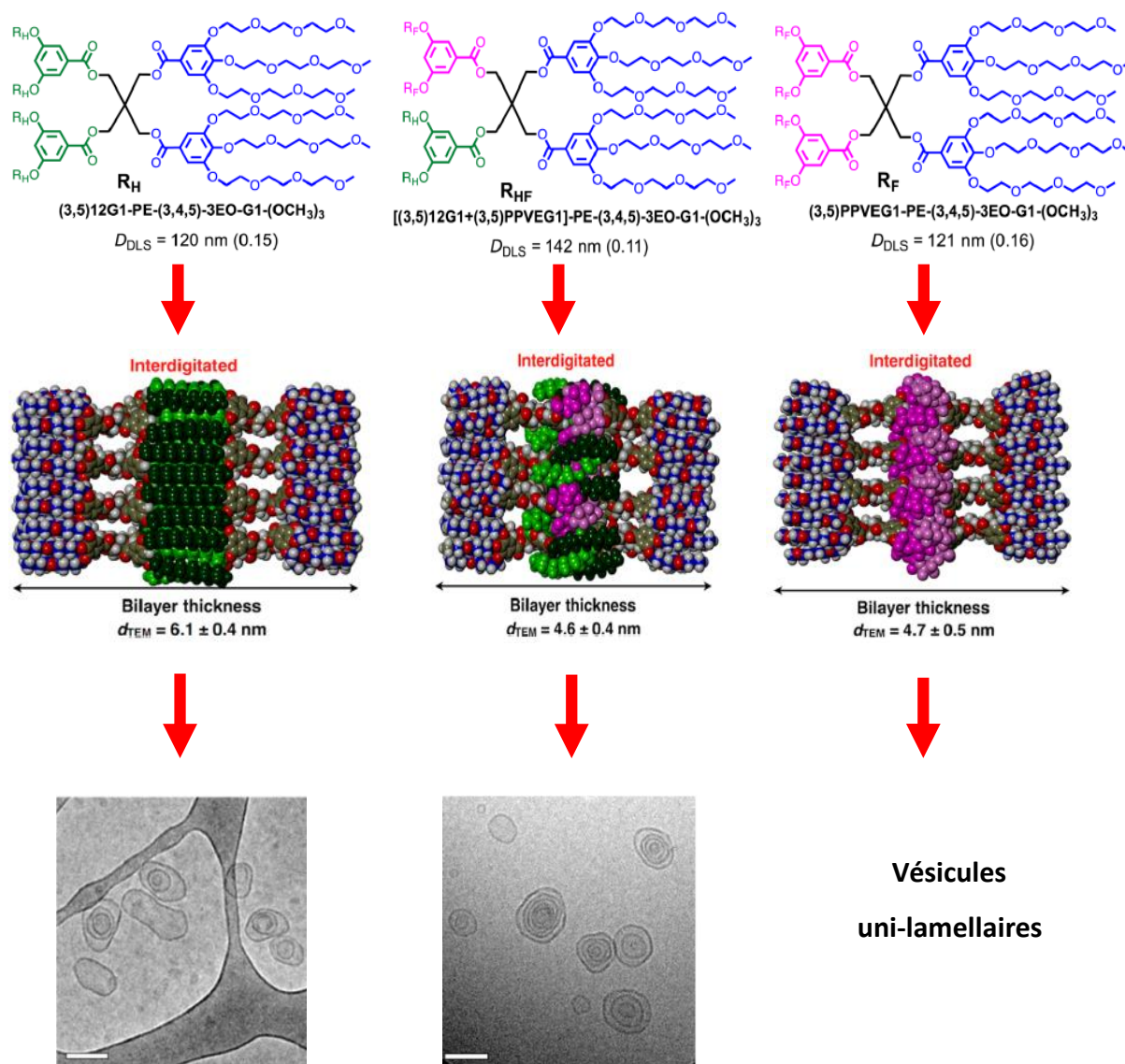


Figure I-7. Morphologie des dendrimersomes en fonction des dendrimères (a) R_H (b) R_{HF} et (c) R_F , tirée des travaux de Xiao et al⁸⁰.

Dans le cas des analogues R_H , des vésicules uni-lamellaires (VUL) sont uniquement constatées⁹⁰ et ont une épaisseur de bicouche comparable aux bicouches membranaires

biologiques (~4nm) due à l'interdigitation des chaînes fluorocarbonées et hydrocarbonées. Cette découverte pourrait permettre d'incorporer des composés de la bicouche membranaire (protéines, lipides) à l'intérieur des dendrimersomes pour de futures applications biomédicales⁸⁰.

De plus, les auteurs ont rapporté que les DSs de dendrimères R_{HF} émettent un signal important en RMN ^{19}F , suggérant de les appliquer comme agents de contraste ^{19}F en imagerie à résonance magnétique (IRM). Parallèlement, les auteurs ont rapporté la capacité pour les dendrimères R_{HF} de former des DSs mixtes avec les analogues R_H ou R_F . Cette miscibilité a été montré par microscopie par fluorescence où des agents fluorescents ont été greffés sur chaque dendrimère (émission de lumière rouge R_H et émission de lumière verte pour R_F). Ces dendrimères suscitent donc de l'intérêt comme potentiel outil biomédical.

2.2.2.4 Additif pour les mousses extinctives formant un film flottant

Les mousses extinctives, formant un film flottant, sont utilisées pour lutter contre les incendies de solvants⁹¹. Elles sont composées d'eau additionnée d'un tensioactif et de 80 % d'air⁹². Ainsi, les tensioactifs fluorocarbonés tels que le PFOA ont présenté des propriétés adaptées à cette application et conduisent à une extinction beaucoup plus rapide des feux en limitant des rejets importants de combustion⁹².

Les tensioactifs hybrides F–H pourraient constituer une alternative aux analogues fluorocarbonés, en limitant la longueur de chaîne perfluorocarbonée tout en conservant les propriétés des mousses extinctives.

Les travaux de Peng *et al.*⁷⁶ en 2018 ont été conduits en ce sens et ont abouti à la synthèse d'un dérivé hybride F–H non ionique ayant une fonction amide en α de la chaîne perfluorocarbonée, une chaîne ramifiée hydrocarbonée liée à une amine tertiaire et une fonction amide agissant comme partie hydrophile qui forme des interactions faibles avec les molécules d'eau environnantes (*cf. Figure I-8*)⁹³. Les 3 composés $C_9F_{19}AM$, $C_9F_{19}AE$ et $C_9F_{19}AB$ (respectivement $R(H) = CH_3$; C_2H_5 et C_4H_9) présentent des tensions de surface à la cmc de 15 mN/m ce qui montre de hautes propriétés interfaciales.

Parmi ces 3 composés, **C₉F₁₉AE** présente la cmc la plus basse à 0,12 mM contre 0,23 et 2,58 mM pour **C₉F₁₉AM** et **C₉F₁₉AB** respectivement. **C₉F₁₉AE** est chimiquement stable jusqu'à une température de 173 °C et possède un haut pouvoir moussant, comme on peut le voir en *Figure I-8*. Son utilisation pourrait être prometteuse dans ce domaine.

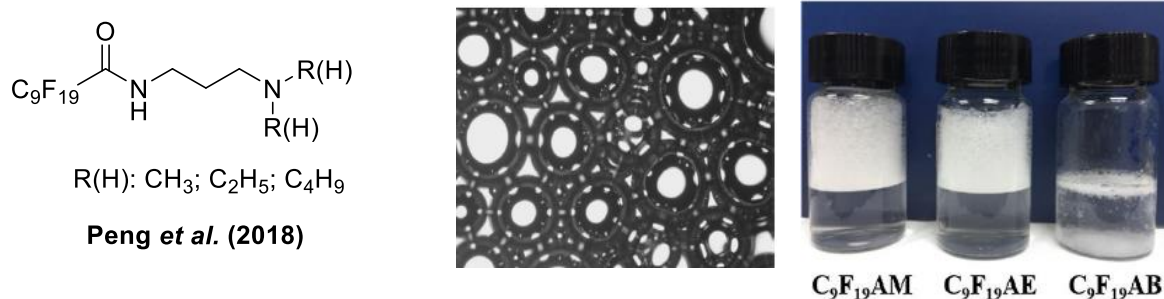


Figure I-8. Structure chimique des tensioactifs hybrides F–H non ioniques C₉F₁₉AM, C₉F₁₉AE et C₉F₁₉AB. Structure des bulles de C₉F₁₉AE dans l'eau et comparatif du pouvoir moussant des tensioactifs⁷⁶.

3. Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre un certain nombre de tensioactifs hybrides F–H synthétisés et rapportés dans la littérature au cours de ces dernières années.

De ces tensioactifs découlent de nombreuses applications potentielles, essentiellement comme alternative aux tensioactifs fluorocarbonés du fait de contraintes environnementales, industrielles ou liées à la nature de la chaîne perfluorocarbonée (*cf. Tableau I-1*).

Il est intéressant de noter que peu d'applications dans la délivrance de médicaments sont décrites. Il conviendrait alors d'imaginer de nouveaux vecteurs capables d'encapsuler des principes actifs hydrophobes (micelles) ou hydrophiles (vésicules) et dont l'application thérapeutique différerait de l'utilisation des perfluorocarbures pour la ventilation liquidienne.

Tensioactifs ioniques	Applications potentielles	Références
Dérivés sulfonates	Stabilisants de microémulsions H ₂ O/CO ₂ supercritique	[71]
Dérivés hybrides succinates		[55]
Dérivés hybrides glutarates		[56]
Dérivés de phosphonates	Modificateurs de surface dentaire	[73]
Dérivés de sulfonates	Emulsions pour la polymérisation de polyfluorure de vinylidene (PVDF)	[57]
Dérivés cationiques de pyridinium	Agents stabilisants pour le contrôle de la nucléation et de la croissance de nanoparticules d'or (GNFs)	[60,64]
Dérivés cationiques d'azobenzène	Agents photo-sensibles	[62]
Tensioactifs non ioniques	Applications potentielles	Références
Dérivé de cétone	Transport de principes actifs dans les perfluorocarbures	[85]
Dérivés azotés	Additif pour les mousses extinctives formant un film flottant	[76]
Dérivés hybrides diglucosylés	Extraction et stabilisation de protéines membranaires	[79]
Dérivés hybrides maltosylés		[81]
Dendrimères hybrides de Janus	Agents de contraste	[80]

Tableau I-1. Synthèse des applications potentielles de tensioactifs hybrides F–H mentionnées au cours de ce chapitre.

Les travaux préliminaires de Miyazawa *et al.*⁸² sur l'élaboration de tensioactifs hybrides F–H avec des motifs PEG comme tête hydrophile, nous ont inspirés sur l'utilisation de ces motifs déjà connus, comme protection vis-à-vis de l'adsorption des opsonines à la périphérie des nanovecteurs dans le corps humain; ce qui faciliterait le transport du principe actif en évitant la reconnaissance et la destruction du nanovecteur par le système immunitaire (*cf. Figure I-9*)⁹⁴.

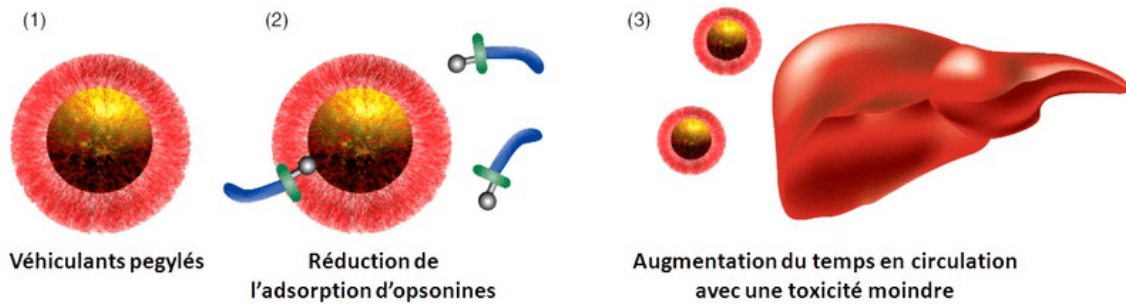


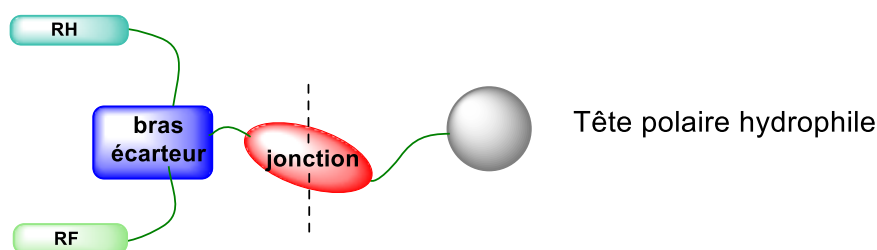
Figure I-9. Schéma de la protection du vecteur couronné de motifs PEG limitant sa reconnaissance par le système immunitaire dans l'ordre (1), (2) et (3). Illustration tirée des travaux de thèse du Dr. F. Levedec⁹⁴.

Ainsi, un nouveau modèle de synthèse de ces tensioactifs hybrides F-H non ioniques a été élaboré et est décrit au chapitre suivant.

CHAPITRE II. SYNTHÈSE DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS HYBRIDES F–H

Introduction

Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse de nouveaux tensioactifs « tensioactifs hybrides F–H ». Dans ce chapitre, nous avons construit un modèle de structure de tensioactifs hybrides F–H à partir de la configuration ci-dessous en *Schéma II-1*.



Structure hybride F-H apolaire hydrophobe

Schéma II-1. Représentation du modèle de tensioactif hybride F–H adopté.

La partie apolaire (*à gauche*) est synthétisée dans un premier temps. Cette partie apolaire comporte les deux chaînes hydrophobes fluorocarbonée et hydrocarbonée (F–H) de longueur variable désirée, qui sont séparées par une fonction chimique modulable appelée « bras écarteur ».

Elle comprend également une fonction azoture $-N_3$ pour procéder ensuite au couplage avec une tête polaire propargylée de type PEG ou glucose, motifs déjà largement utilisés dans le *drug delivery*^{95–98}, via une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre (I) de « *chimie click* » et aboutit à une jonction chimique de type cycle triazole que nous étudierons dans ce chapitre.

1. Voies rétrosynthétiques engagées

Plusieurs modèles de fragments moléculaires hybrides F–H (*cf. Schéma II-2*) ont été conçus à partir de dérivés de sérine bi- ou tri- fonctionnalisés.

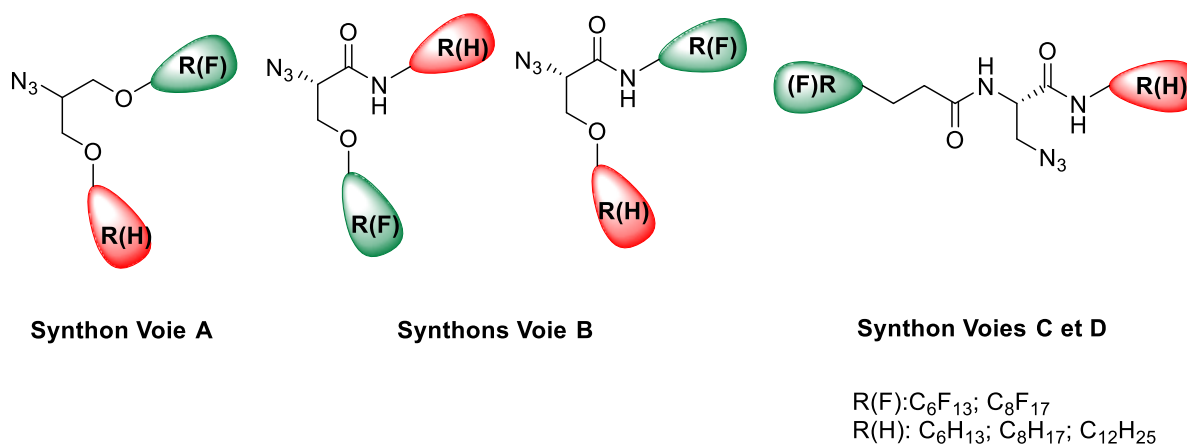


Schéma II-2. Schéma des fragments moléculaires hybrides F–H synthétisés durant ce projet de thèse. *R(H)* et *R(F)* représentent respectivement les chaînes hydrocarbonées et fluorocarbonées de longueur variable.

Nous avons souhaité au départ partir du glycérol qui est un composé biocompatible très utilisé en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique⁹⁹. Il présente une structure symétrique avec 3 fonctions alcools primaires. Néanmoins, pour faciliter la fonctionnalisation et notamment introduire une fonction azoture –N₃ en position centrale, la structure d'un acide aminé, la sérine, nous a semblé être un bon candidat analogue du glycérol (*cf. Schéma II-3*).

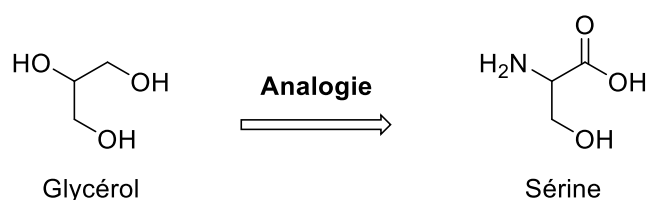


Schéma II-3. Structures chimiques du glycérol (à gauche) et de son analogue acide-aminé, la sérine (à droite).

En effet, cet acide-aminé présente une amine primaire en position *N*-terminale, un acide carboxylique en position *C*-terminale et un groupement hydroxyle primaire sur sa chaîne

latérale. Ces positions peuvent être facilement protégées par des groupements protecteurs orthogonaux.

Pour les chaînes apolaires, nous avons décidé de fixer deux longueurs de chaînes fluorocarbonées R(F) avec 6 ou 8 carbones perfluorés, espacées de deux carbones hydrogénés entre la fonction réactive et le segment perfluorocarboné. Les chaînes hydrocarbonées R(H), quant à elles, ont été choisies avec 6, 8 et 12 carbones hydrogénés. Ces variations de longueurs de chaînes ont permis de construire une série de fragments moléculaires hybrides F–H différents.

Les différentes propositions de synthèse des fragments moléculaires hybrides F–H ont été imaginées selon les arbres rétrosynthétiques représentés ci-dessous (*cf. Schéma II-4*).

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'influence des jonctions homologues sur le bras écarteur (ici, deux jonctions de type éther pour la voie A et deux jonctions de type amide pour les voies C et D) et différentes (une jonction éther et amide sur la voie B) sur les propriétés physico-chimiques des agrégats. En effet, les travaux de Legrand *et al.* sur un tensioactif hybride F–H dérivé du glycérol, ont indiqué que la modification chimique de ce bras écarteur (éther ou amide) a entraîné une modification au niveau de la cmc du tensioactif et de la taille de ses agrégats.

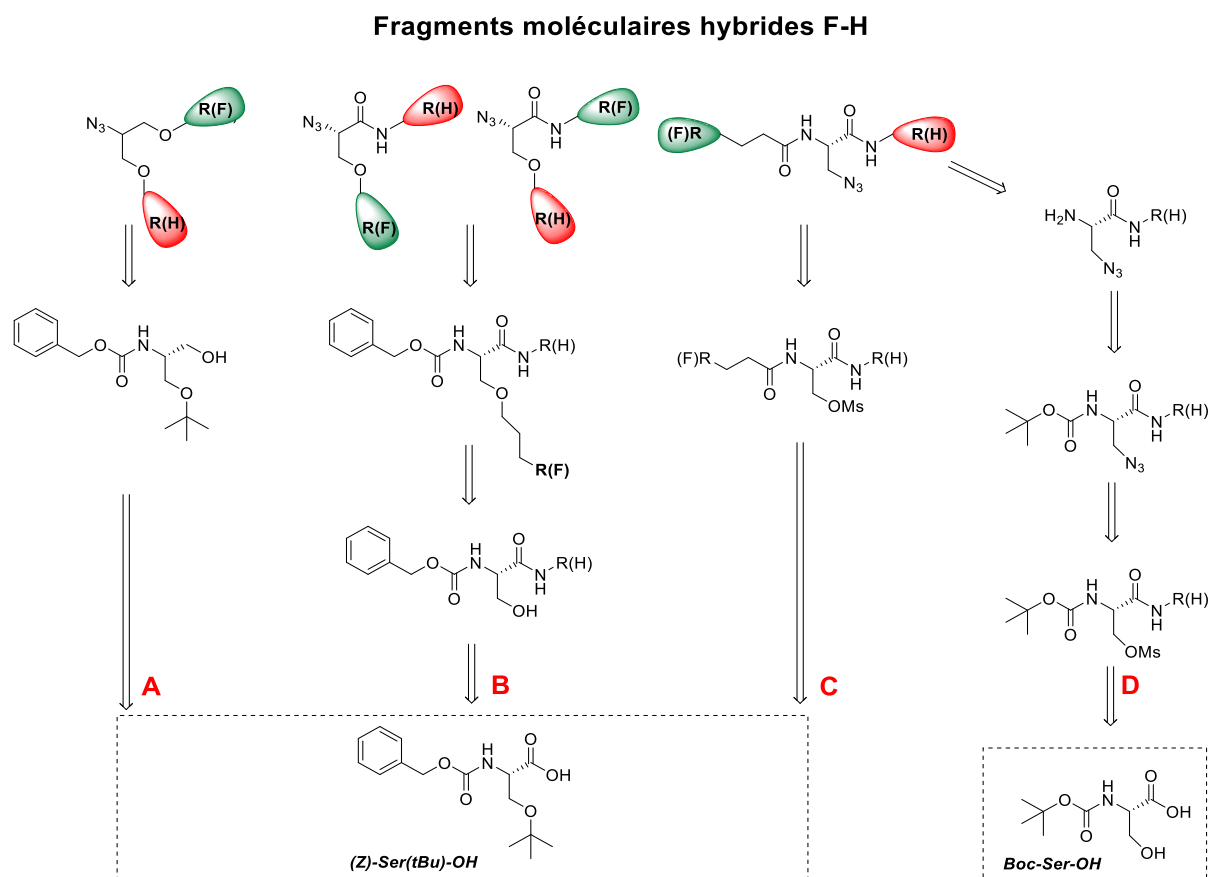


Schéma II-4. Rétrosynthèse pour la construction des différents fragments moléculaires hybrides F–H.

La cmc est jusqu'à 8 fois plus basse lorsque la fonction amide est remplacée par la fonction éther, ce qui accroît la contribution hydrophobe, qui a pour effet d'augmenter de 1,5 fois le diamètre hydrodynamique D_H de la micelle⁷⁹. Ces possibilités sont visibles en voies rétrosynthétiques A, B et C/D.

Nous voulions ensuite étudié l'influence de la modification du positionnement des chaînes apolaires au niveau des fragments moléculaires hybrides F–H en voies B et C. En parallèle, la modification du positionnement de la fonction azoture $-N_3$ entre la position N -terminale de la sérine et le groupe hydroxyle $-OH$ sur sa chaîne latérale, pourrait être également intéressante à étudier ultérieurement en étude physico-chimique.

Nous allons maintenant nous intéresser de plus près aux différentes voies de synthèse étudiées pour chaque fragment moléculaire hybride F–H.

2. Synthèse des fragments moléculaires hybrides F–H

2.1 Etude de la voie de synthèse A

La voie de synthèse pour le fragment moléculaire hybride F–H possédant des jonctions éther symétriques a été imaginée en *Schéma II-5*. Pour fonctionnaliser correctement chaque terminaison de la sérine, nous avons opté pour une stratégie de synthèse orthogonale. Le composé de départ utilisé est le composé commercial Z-Ser(*t*Bu)-OH, un dérivé de sérine bi-protégé en position *N*-terminale par un groupe carboxybenzyle (CBz ou Z) et par un groupement *tert*-butyle (*t*Bu) sur le groupe hydroxyle –OH. Celui-ci représenterait le candidat idéal pour une synthèse stratégique de protection/déprotection de la sérine dans notre cas.

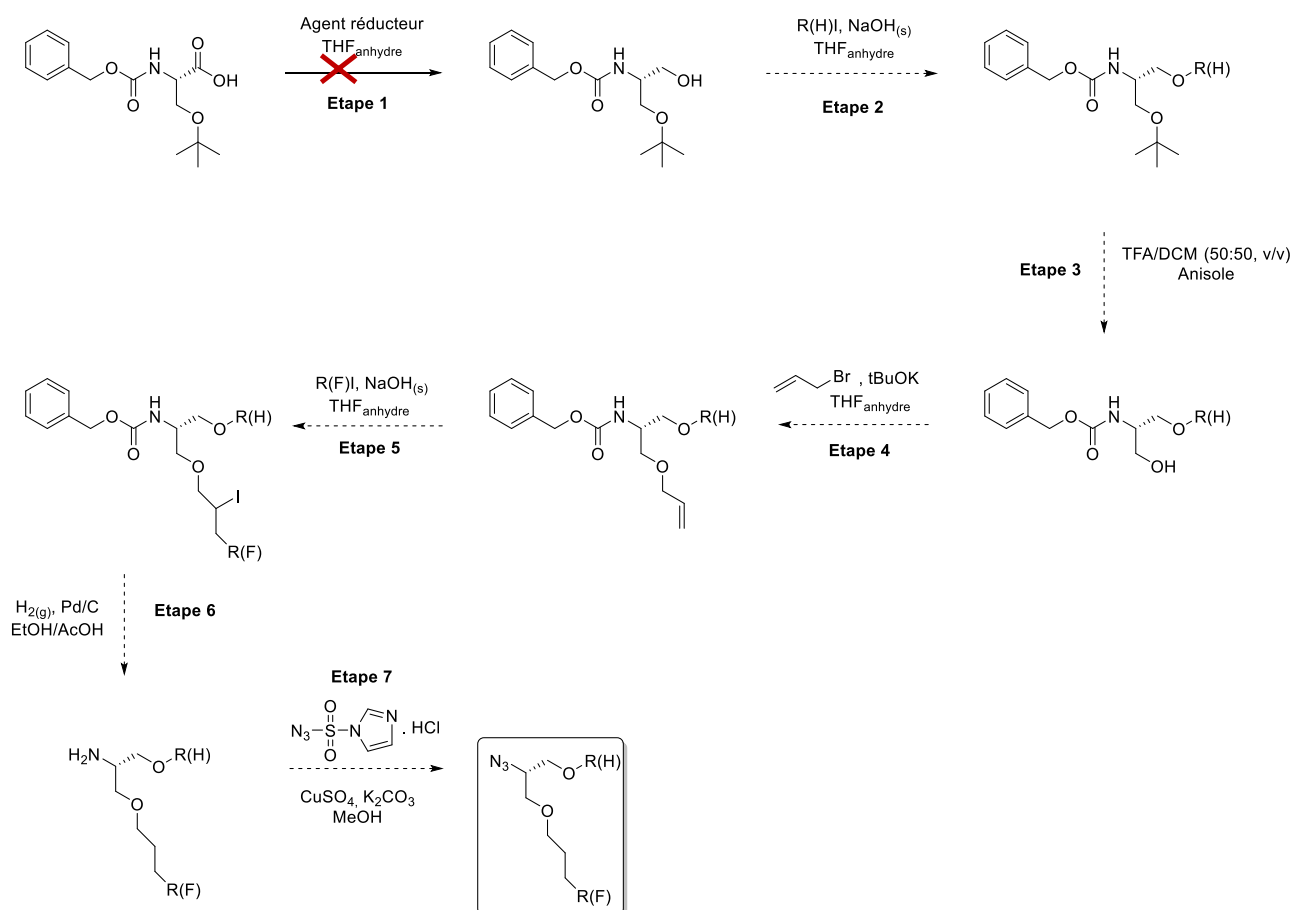


Schéma II-5. Synthèse multi-étapes imaginée pour l'obtention du vecteur hybride F–H par la voie A.

La première étape de construction du vecteur reposerait sur la réduction totale en alcool primaire de l'acide carboxylique libre en position C-terminale du composé Z-Ser(*t*Bu)-OH. Une fois le dérivé hydroxyle obtenu, celui-ci attaquerait l'alkyle halogéné choisi R(H)I *via* une réaction d'étherification (réaction de Williamson) pour introduire sélectivement en C-terminale la chaîne hydrocarbonée de longueur variable.

Les étapes 3 et 4 de déprotection du groupement *-t*Bu en milieu acide, puis d'addition d'un dérivé allylique sur le groupe hydroxyle *-OH* de la chaîne latérale par une seconde réaction de substitution nucléophile, permettraient d'introduire une double liaison sur laquelle la chaîne fluorocarbonée pourrait être introduite par la suite *via* une réaction radicalaire.

L'hydrogénation catalysée au palladium sous atmosphère H_{2(g)} serait ensuite utilisée pour réduire l'iodure en alcane et simultanément interviendrait une hydrogénolyse qui déprotégerait le groupe carboxybenzyle en position *N*-terminale de la sérine. Enfin, l'étape finale pour obtenir le fragment moléculaire hybride F–H désiré consisterait en une conversion de l'amine en azoture, par l'utilisation d'un réactif de transfert de diazote (N₂), l'azoture d'imidazole-1-sulfonyl¹⁰⁰.

Compte tenu des nombreuses difficultés rencontrées à cette étape de réduction de la voie de synthèse A, nous n'avons pas réussi à fonctionnaliser au-delà de cette 1^{ère} étape. Seule l'étude de la réduction de l'acide carboxylique en position C-terminale sera discutée ci-dessous.

❖ Etude de la réduction de l'acide carboxylique libre en position C-terminale du composé Z-Ser(*t*Bu)-OH.

Pour réduire l'acide C-terminal en dérivé intermédiaire hydroxyle (*cf.* Schéma II-6), plusieurs conditions de réaction ont été testées et reportées dans le Tableau II-1, en s'inspirant de conditions de réactions déjà décrites dans la littérature.

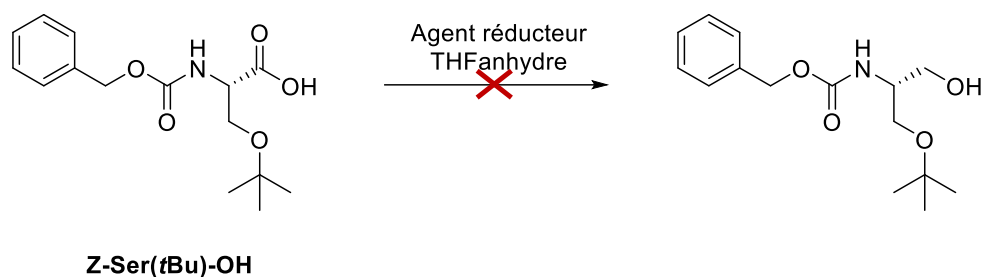


Schéma II-6. 1^{ère} étape de réduction de l'acide carboxylique libre sur la position C-terminale de la sérine pour obtenir le dérivé intermédiaire hydroxyle.

Dans un premier temps, nous avons testé l'utilisation du réducteur fort $\text{LiAlH}_4(s)$ (EG101, EG103 et EG106) pour réduire la fonction acide en alcool primaire à température ambiante pendant 24 h (cf. Tableau II-1).

Entrées	Réactifs	Température	Temps de réaction	Conversion
EG101	$\text{LiAlH}_4(s)$ (1,2 équiv.)		24 h	
EG103	$\text{LiAlH}_4(s)$ (2 équiv.)	t.a.	24 h	non
EG106	$\text{LiAlH}_4(s)$ (2,2 équiv.)		29 h	
EG105	1) DCC, NHS 2) NaBH_4	1) 0 °C 2) t.a.	1) 1 h 2) 20 min	non
EG113 ¹⁰¹			1) 1 h, 2) 24 h	
EG115A ¹⁰¹	$\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (2 équiv.)	1) 0 °C, 2) t.a.	1) 2 h, 2) 24 h	non
EG115C ¹⁰¹			1) 1h30, 2) 24 h	
EG115B ¹⁰¹	$\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (3 équiv.)	1) 0 °C, 2) t.a.	1) 2h, 2) 24 h	non
EG115D ¹⁰¹			1) 1h30, 2) 24 h	
EG120 ¹⁰²	$\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (2 équiv.)	1) 0 °C, 2) 50 °C	1) 1h, 2) 72 h	non
EG122 ¹⁰³	1) isoBCF (1,1 équiv.), Et_3N (1 équiv.) 2) $\text{NaBH}_4(s)$	1) 0 °C, 2) t.a.	1) 30 min 2) 20 min	non
EG136	1) isoBCF (1,1 équiv.), NMO (1 équiv.) 2) $\text{NaBH}_4(s)$	1) 0 °C, 2) t.a.	1) 30 min 2) 20 min	non
EG126 ¹⁰⁴	1) $\text{NaBH}_4(s)$ 2) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	70 °C	48 h	non

Tableau II-1. Liste des conditions expérimentales engagées pour l'étape 1 de réduction de l'acide carboxylique libre en position C-terminale de la sérine.

L'addition de $\text{HCl}_{(aq)}$ 1M glacé permet ensuite d'arrêter la réaction pour générer le dérivé hydroxyle attendu. Cependant, malgré les ajouts supplémentaires de réactifs jusqu'à 2,2 équivalents, le suivi en chromatographie sur couche mince (ccm) indique la présence

majoritaire du réactif de départ. Nous avons utilisé dans un second temps les agents de couplage *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide et *N*-hydroxysuccinimide (DCC/NHS, **EG105**) pour obtenir l'ester actif succinimide correspondant, permettant de réduire plus facilement celui-ci en dérivé hydroxyle cible à température ambiante (t.a.) avec un réducteur doux, le $\text{NaBH}_{4(s)}$. Le réactif de départ a été converti partiellement en une très faible fraction plus apolaire. Celle-ci, isolée et analysée en RMN ^1H , présentait un mélange de pics non identifiables ne correspondant pas au produit attendu.

Nous avons tenté par la suite de mimer les conditions de réduction (**EG113**) décrites par les travaux de Jung *et al.* en utilisant le réactif préformé $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, qui a été utilisé par les auteurs sur l'analogue Boc-Ser(OBn)-OH, protégé avec un groupement benzyle sur sa chaîne latérale et un groupement *tert*-butoxycarbone (Boc) sur la position C-terminale. Le composé finale hydroxyle a été obtenu avec un rendement de 91 %¹⁰¹. Le réactif $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (2 équiv.) est ajouté, goutte à goutte à, 0 °C dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre contenant le réactif de départ préalablement solubilisé, puis le milieu est laissé revenir à température ambiante pendant 3 h. Le milieu est ensuite refroidi à 0 °C avant d'être dilué dans le méthanol (MeOH) pour stopper la réaction et ainsi générer le dérivé hydroxyle cible. Nous avons également rencontré des problèmes de conversion du réactif de départ, et avons essayé de jouer sur les paramètres de temps de réaction à basse température à l'issue de l'ajout $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (**EG115A&B**) et sur le nombre d'équivalents (**EG115 A&C** et **EG115B&D**), sans succès. Nous obtenons au terme des réactions un solide blanc qui en analyse RMN ^1H présente les signaux appartenant exclusivement au Z-Ser(*t*Bu)OH.

Nous avons également essayé d'augmenter la température (**EG120**) jusqu'à 50 °C pour mieux activer le réactif préformé $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, en diminuant les interactions stériques qui pourraient empêcher la conversion du réactif de départ à basse température¹⁰². Cette fois-ci, nous avons fait un suivi ccm sur 72 h. Celui-ci a une nouvelle fois indiqué l'absence de conversion du dérivé, malgré des conditions de réaction plus drastiques.

Une des hypothèses avancées a été qu'il pourrait y avoir une différence significative entre l'introduction du réactif préformé $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ et la formation *in situ* de celui-ci par l'utilisation de $\text{NaBH}_{4(s)}$ et de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$. Nous nous sommes inspirés de la procédure de Cho *et*

*al.*¹⁰⁴ pour l'expérience **EG126** en ajoutant dans le milieu réactionnel contenant le réactif de départ et NaBH₄ (1,5 équiv.), une solution de BF₃.Et₂O dans le THF (6,5 équiv.). Le tout est placé sous atmosphère inerte, puis chauffé à reflux. Malheureusement, nous avons observé une multitude de taches apolaires en plus de la persistance du réactif de départ, malgré l'addition supplémentaire de 0,5 équivalent de NaBH_{4(s)} et de BF₃.Et₂O.

La conversion de l'acide carboxylique libre en anhydride mixte a également été étudiée (**EG122**), par l'utilisation des réactifs *i*-butyl chloroformate (isoBCF) et d'une base triéthylamine (Et₃N), suivi d'une réduction douce avec NaBH_{4(s)} dans le MeOH. Le groupe de Jeon *et al.* a rapporté cette réaction sur l'analogue Boc-Ser(OBn)-OH avec un rendement final de 92 % en deux étapes¹⁰³. Ces autres conditions réactionnelles n'ont pas fonctionné, puisque nous retrouvons le réactif de départ en suivi ccm et en RMN ¹H du brut réactionnel. Le changement de base pour la *N*-méthylmorpholine (NMO) n'a pas non plus eu une incidence positive sur la conversion du réactif de départ (**EG136**).

Au vu des difficultés de conversion et de dégradation pour toutes les réactions, nous avons décidé de nous focaliser sur le fragment moléculaire hybride F–H asymétrique construit à partir de la voie B.

2.2 Etude de la voie de synthèse B

Cette fois-ci, nous aborderons la synthèse multi-étapes du fragment moléculaire hybride F–H asymétrique, possédant 1 jonction éther en position latérale, et 1 jonction amide en position C-terminale du dérivé de la sérine. Comme précédemment, la rétrosynthèse à partir de ce dérivé, nous amène également au réactif de départ Z-Ser(*t*Bu)-OH. La stratégie de synthèse imaginée est également orthogonale comme pour la voie A. Dans un premier temps, nous avons décidé d'introduire la chaîne hydrocarbonée en position C-terminale de la molécule Z-Ser(*t*Bu)-OH *via* un couplage peptidique en présence de benzotriazol-1-

yl oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), de Et₃N et d'une amine aliphatique (*cf. Schéma II-7*).

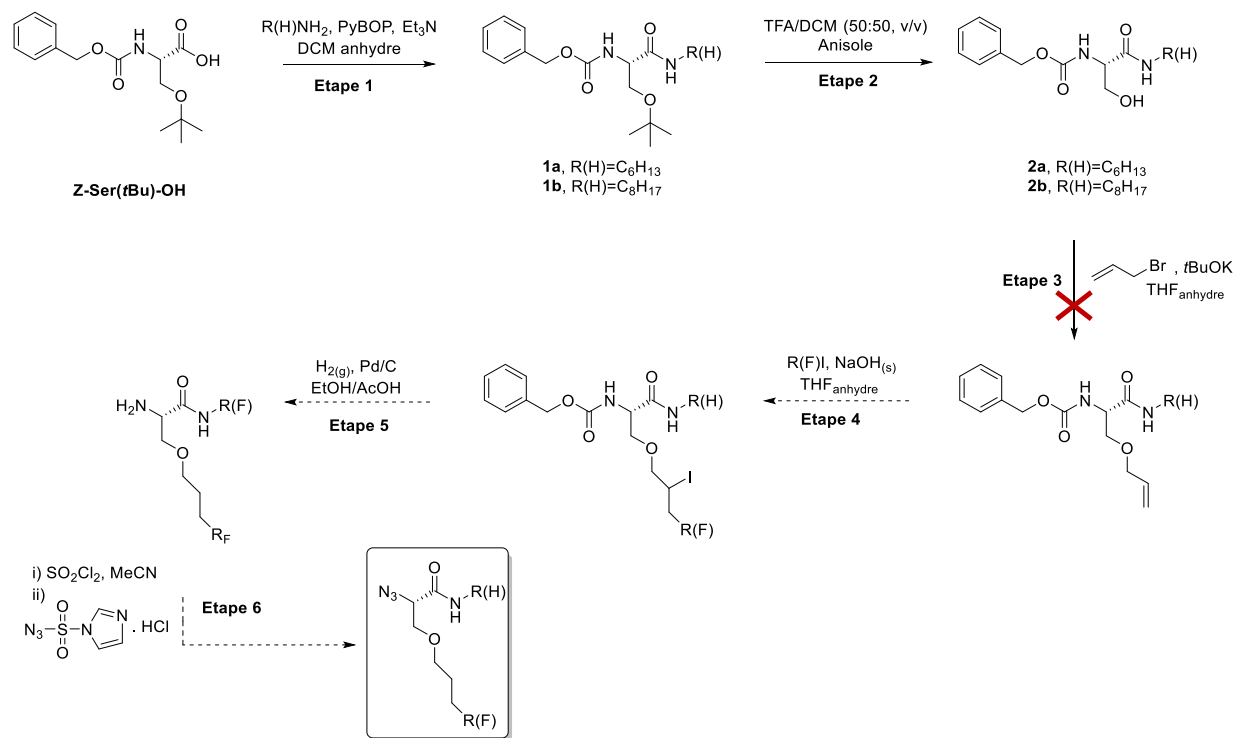


Schéma II-7. Synthèse multi-étapes imaginée du vecteur hybride F–H par la voie B.

Au cours de cette première étape, deux couples de réactifs différents ont été testés. Les étapes imaginées de la voie de synthèse A ont été reprises à partir de l'étape 2.

Compte tenu des nombreuses difficultés rencontrées par la suite, à l'étape 3 d'introduction d'un chaînon allylique sur la chaîne latérale du dérivé de départ, nous n'avons pas réussi à fonctionnaliser au-delà de cette 3^{ème} étape. Seules les étapes 1, 2 et 3 seront discutées ci-dessous.

❖ Etude des deux couples de réactifs utilisés pour le couplage peptidique à l'étape 1.

Nous avons utilisé dans un premier temps les agents de couplage classiques tels que 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC ; 1,1 équiv.) et le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT ; 1,2 équiv.) avec une base *N,N'*-diisopropyléthylamine (DIPEA ; 2,5 équiv.) qui vient

déprotonner l'acide carboxylique libre en position C-terminale du composé de départ. Elle permet d'accroître simultanément la nucléophilie de l'amine alliphatique de longueur modulable pour l'introduire sur le dérivé d'acide-aminé par une fonction amide.

Malheureusement, malgré la conversion complète du réactif de départ, nous avons obtenu de faibles rendements pour les composés intermédiaires amides **1a** et **1b** (respectivement 38 % pour une chaîne C₆H₁₃ et 52 % pour une chaîne C₈H₁₇). Ces résultats n'ont pas pu être expliqués puisque nous n'avons pas constaté la présence de sous-produits à l'issue de la purification chromatographique.

Notre second choix s'est donc porté sur l'utilisation du couple PyBOP/ Et₃N, après étude de la littérature¹⁰⁵. Celui-ci s'est révélé prometteur puisque nous avons obtenu, cette fois-ci, des rendements respectivement de 85 % et 90 % pour les composés **1a** et **1b**. Les composés ont pu être caractérisés complètement par RMN ¹H et ¹³C ainsi que par spectrométrie de masse.

Suite à cela, la déprotection du groupement *t*Bu avec l'acide trichloroacétique dans le dichlorométhane (TFA/DCM, 50:50, v/v) a pu être engagée pour régénérer le groupe hydroxyle sur la chaîne latérale des composés **1a** et **1b** au bout de 4 h de réaction à température ambiante. Les rendements de déprotection restent compris entre 60 % et 66 % pour les composés **2a** et **2b**. Compte tenu de la présence d'un groupe –OH libre, ces rendements relativement moyens peuvent être expliqués par une aptitude des composés à « traîner » sur la colonne de silice lors de la purification chromatographique. L'étape suivante consiste en une allylation sur les composés **2a** et **2b** avec l'utilisation d'un dérivé de bromure d'allyle couplé à une base forte, ici l'hydruide de sodium NaH_(s) (cf. Schéma II-8).

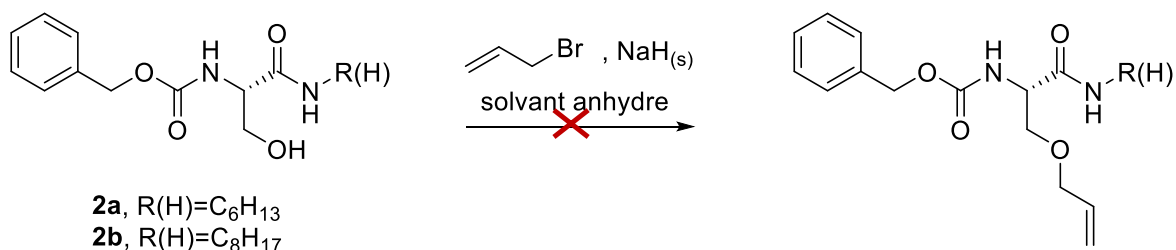


Schéma II-8. Allylation des composés **2a** et **2b**.

Dans un premier temps, NaH_(s) est ajouté par petites portions dans le solvant THF ou diméthylformamide (DMF) anhydre, à 0 °C avec l'intermédiaire **2b**. Au bout de 30 minutes, le bromure d'allyle est ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel, puis le système est laissé revenir à température ambiante et la réaction se déroule selon les temps indiqués dans le *Tableau II-2*.

Entrées	Réactifs	Solvants	Température	Temps de réaction	Conversion
EG123	1) 2b (1 équiv.), Bromure d'allyle (2,5 équiv.)	THF	0 °C	1) 1 h, 2) 5 h	non
EG128	2) NaH _(s) (2 équiv.)	anhydre	t.a.	1) 1 h, 2) 24 h	
EG132	1) 2b (1 équiv.), Bromure d'allyle (2,5 équiv.)	DMF	0 °C	1) 1 h	non
	2) NaH _(s) (2 équiv.)	anhydre	t.a.	2) 24 h	

Tableau II-2. Réactions engagées pour l'étape 3 d'allylation du composé 2b.

Les trois réactions du tableau n'ont pas pu mettre en évidence la présence du produit désiré par RMN ¹H. En effet, nous avons constaté dans un premier temps la présence persistante du réactif de départ malgré les ajouts de 0,5 équivalent supplémentaire du couple NaH_(s)/Bromure d'allyle au cours du temps. De plus, plusieurs produits secondaires apolaires ont été observés par suivi chromatographique et RMN après purification de chaque fraction. Celles-ci ont indiqué un clivage du groupe protecteur CBz avec la disparition à ~7,32 ppm des signaux des carbones du cycle aromatique. Également, une absence des signaux RMN ¹H des groupements –CH et –CH₂ du squelette central du composé attendu a été constatée, laissant supposer une dégradation du composé initial **2b**.

En parallèle, une tentative de propargylation a été réalisée sur le composé **2b** par addition de petites fractions de bromure de propargyle (1,5 équivalents) à 0 °C dans le DMF (*cf. Schéma II-9*). Ceci a été fait dans le but de pouvoir greffer sur cette position, un dérivé azoturé d'un composé polaire pour construire le tensioactif final.

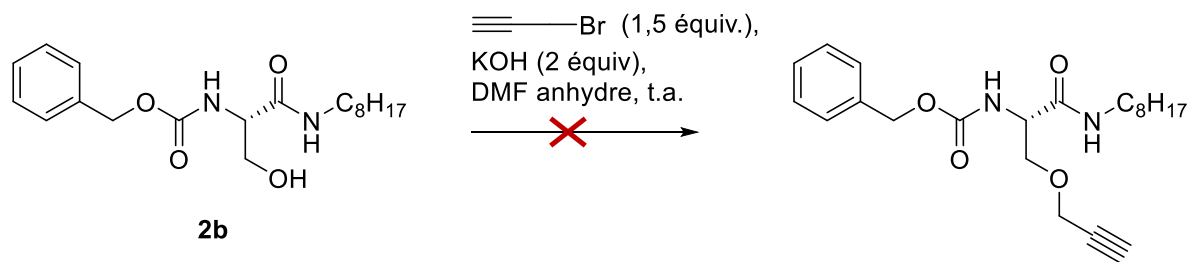


Schéma II-9. Propargylation du composé intermédiaire **2b**.

Après traitement, nous constatons en suivi chromatographique la présence du composé de départ **2b**, et de plusieurs sous-produits apolaires ayant des rapports frontaux proches. Ceci s'est révélé délicat lors de la purification sur gel de silice, puisque la plupart des fractions étudiées en RMN ^1H ont indiqué la présence de mélanges d'espèces inconnues. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'utilisation de bases fortes ou d'agents réducteurs tels que $\text{KOH}_{(s)}$ ou $\text{NaH}_{(s)}$ représenteraient un risque de dégradation de la structure initiale de l'acide aminé.

Nous avons donc utilisé une base faible comme $\text{K}_2\text{CO}_{3(s)}$ couplé à un dérivé de perfluoroiodoalcane $\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$, pour voir si la réactivité serait plus favorable tout en limitant les produits de dégradation résultants (*cf. Schéma II-10*).

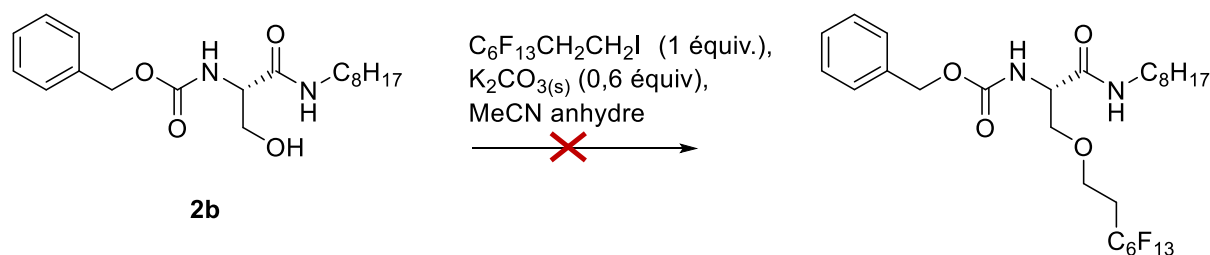


Schéma II-10. Fonctionnalisation du composé intermédiaire **2b** avec un dérivé perfluoroiodoalcane.

Dans cette optique nous avons comparé deux conditions de températures, figurant dans le *Tableau II-3*.

Entrées	Réactifs	Température	Temps de réaction	Conversion
EG142	2b (1 équiv.), $\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ (1 équiv.) $\text{K}_2\text{CO}_{3(s)}$ (0,6 équiv.)	t.a.	24 h	non
EG143	2b (1 équiv.), $\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ (1 équiv.) $\text{K}_2\text{CO}_{3(s)}$ (0,6 équiv.)	70 °C	24 h	non

Tableau II-3. Réactions engagées pour la substitution nucléophile sur le composé **2b**.

Le dérivé d'alcane halogéné a tout d'abord été introduit dans l'acétonitrile anhydre (MeCN) en présence de $K_2CO_{3(s)}$, le tout à 0 °C. Puis le composé **2b** est introduit par petites portions dans le milieu, et l'ensemble est laissé sous agitation pendant 24 h. À température ambiante, nous constatons par suivi ccm qu'il n'y a aucune conversion du composé **2b** de départ. Lorsque nous chauffons cette fois-ci le milieu à 70 °C, nous avons la présence d'un mélange entre le substrat de départ et un composé inconnu que nous n'avons pas pu caractériser, semblant provenir de sous-produits de dégradations visibles en RMN 1H .

Pour remédier à ces problèmes de dégradation de la structure amino-acide, nous avons décidé d'éviter l'utilisation de base/réducteur en activant initialement le groupe hydroxyle de la chaîne latérale, ici du composé **2a**, par un groupe partant mésylate –OMs tel que décrit dans le Schéma II-11.

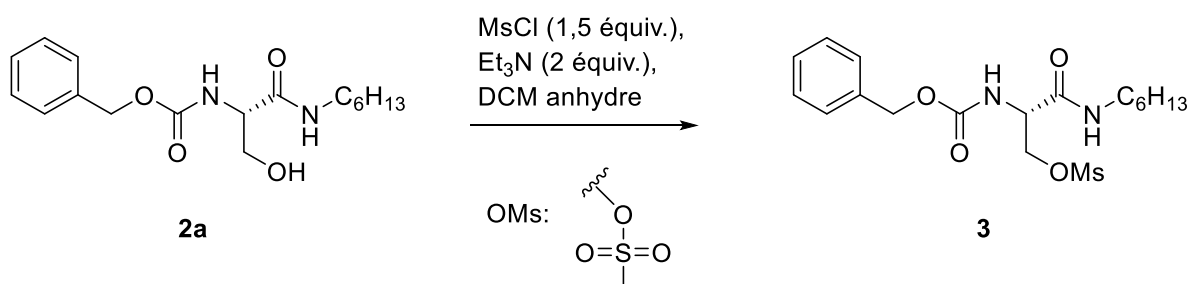


Schéma II-11. Métylation du composé **2a** pour l'activation de l'alcool libre.

Le composé **2a** est mis en contact dans le DCM anhydre avec la base Et₃N, puis le chlorure de mésylate MsCl est ajouté goutte à goutte sous atmosphère d'argon à 0 °C et le milieu est laissé revenir à température ambiante pendant 4 h. Après purification, un composé **3** plus apolaire que le composé **2a** a pu être isolé et caractérisé par RMN 1H . La présence du signal singulet du méthyl correspondant au groupement mésylate, est visible à 2.99 ppm. Nous avons obtenu pour le composé **3** un rendement final de 80 %.

Une fois le composé mésylé **3** obtenu, nous avons décidé d'introduire la chaîne fluorée soit *via* un alcool allylique en excès (*cf. Schéma II-12-A*), soit *via* un réactif commercial d'alcool fluoré, ici le 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-perfluorohexan-1-ol en excès (*cf. Schéma II-12-B*).

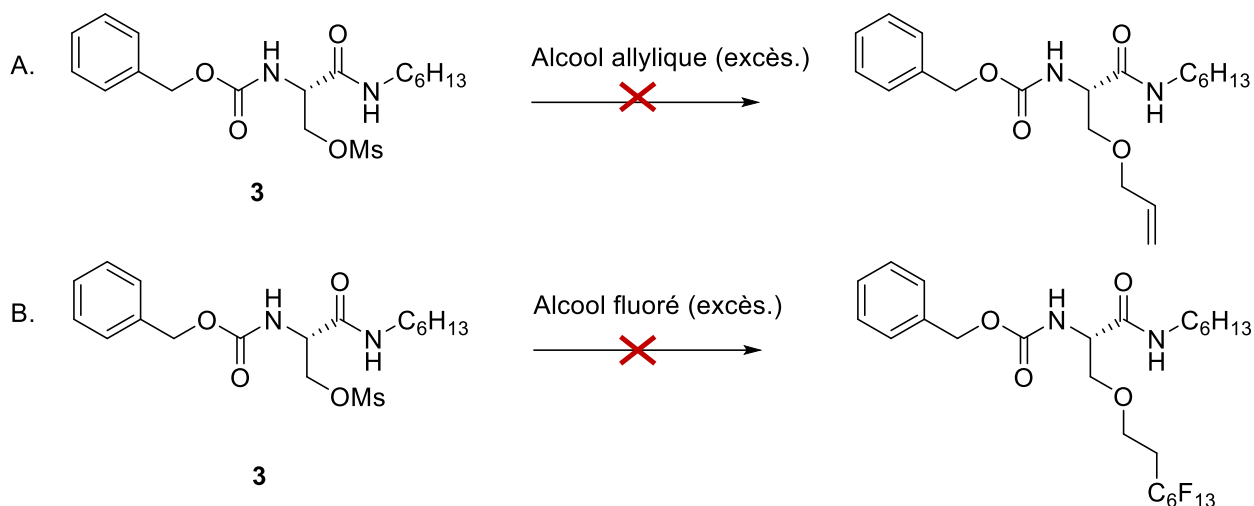


Schéma II-12. Fonctionnalisation du dérivé mésylé **3** avec (A) un alcool allylique en excès, (B) un alcool perfluoré.

Les conditions réactionnelles pour les deux réactions sont listées ci-dessous en *Tableau II-4* :

Entrées	Réactifs	Température	Temps de réaction	Conversion
EG138	3 (1 équiv.),	t.a.	1) 24 h	non
	2-propèn-1-ol (excès.)	50 °C	2) 2 h	
EG137	3 (1 équiv.),	t.a.	1) 24 h	non
	C ₆ F ₁₃ CH ₂ CH ₂ -OH (excès.)	50 °C	2) 2 h	

Tableau II-4. Réactions engagées pour l'étape d'éthérisation du groupement hydroxyle du composé **3**.

Concernant la fonctionnalisation en dérivé allylique (**EG138**), après l'ajout du composé mésylé **3** dans le 2-propèn-1-ol utilisé également en tant que solvant, le milieu est agité 4 h à température ambiante. Le suivi chromatographique a indiqué que rien ne se passait durant les premières 24 h de réaction.

Nous avons alors procédé au chauffage consécutif pendant 2 h à 50 °C, pour voir si le chauffage pouvait entraîner un effet favorable sur la conversion de **3** en produit attendu. Après traitement de la réaction avec HCl_(aq) 1M, nous observons encore par suivi ccm la présence du réactif de départ avec quelques composés apolaires de structure inconnue. Le

spectre RMN ^1H fait sur le produit brut obtenu a identifié le composé **3** de départ avec quelques impuretés.

En parallèle, nous avons souhaité insérer directement le fragment apolaire perfluorocarboné en utilisant cette fois-ci un alcool fluoré, le *1H,1H,2H,2H*-perfluorohexan-1-ol (cf. *Schéma 2-11-B*). Les mêmes conditions de réaction et de traitement de la réaction figurant en *Schéma 2-11-A* ont été appliquées, et des résultats similaires ont été observés par suivi chromatographique et en RMN ^1H du produit brut obtenu par l'expérience **EG137**.

En résumé, nous avons rencontré quelques obstacles dans nos essais de synthèse liés notamment à l'introduction secondaire de la chaîne perfluorocarbonée. Nous avons donc décidé de mettre de côté cette stratégie de synthèse. Toutefois, la possibilité de fonctionnaliser le groupe hydroxyle de la molécule **2a** en intermédiaire mésylé stable et facilement caractérisable **3** est une belle opportunité que nous avons exploitée lors d'une troisième voie de synthèse abordée en *section 2.3*.

2.3 Etude de la voie de synthèse C

Dans cette troisième voie de synthèse, nous avons cherché cette fois-ci à obtenir un fragment moléculaire hybride F–H symétrique à jonctions amides.

Au contraire des deux précédentes voies de synthèse (*i.e.* voie A et voie B), ces jonctions amides se situent en positions *N*-terminale et *C*-terminale de la sérine. La fonction réactive azoture $-\text{N}_3$ est située maintenant en α du méthylène de la chaîne latérale du dérivé de sérine.

La proposition de la synthèse multi-étapes a été construite selon le *Schéma II-13*.

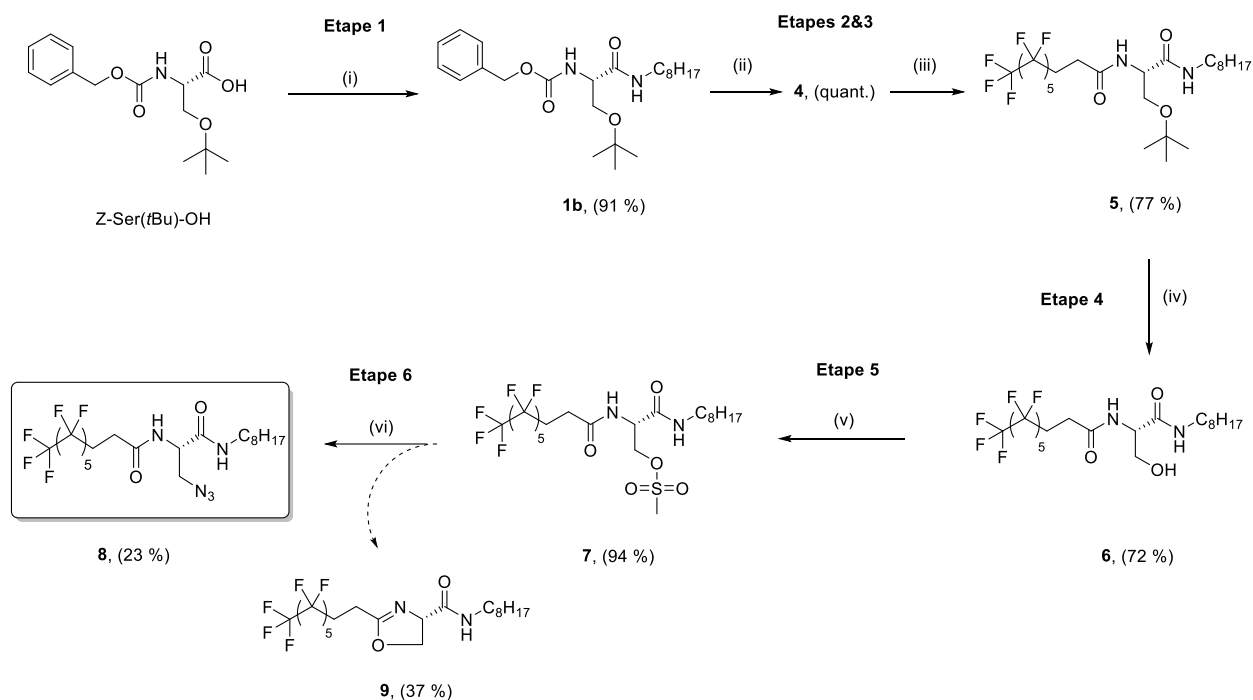


Schéma II-13. Synthèse multi-étapes imaginée pour l'obtention du vecteur hybride F–H par la voie C^a.

^a Conditions de réaction: (i) PyBOP, Et₃N, 1-octylamine, THF anh., 0 °C à t.a. , 21 h; (ii) H_{2(g)}/Pd-C (8 %_{mass.}), 6,6 bar, MeOH, t.a. ,19 h; (iii) PyBOP, Et₃N, acide 2H,2H,3H,3H-perfluorononanoïque, THF anh., 0 °C à t.a. , 12 h; (iv) TFA / DCM (1:6 v/v), anisole, t.a. ,32 h; (v) MsCl, Et₃N, DCM anh., -10 °C, 1 h; (vi) NaN_{3(s)}, DMF anh., 70 °C, 24 h.

L'étape 1 est similaire à celle de la voie B avec l'introduction de la chaîne hydrocarbonnée en C₈H₁₇ *via* un couplage peptidique PyBOP/Et₃N. Le composé **1b** obtenu avec un rendement très satisfaisant (91 %) subit par la suite une hydrogénolyse en présence de Pd/C pour conduire à l'amine primaire en position N-terminale de la sérine (rendement quantitatif).

Ensuite, la chaîne fluorocarbonnée est introduite *via* un second couplage peptidique PyBOP/Et₃N de l'acide 2H,2H,3H,3H-perfluorononanoïque avec l'amine primaire **4**, donnant le composé **5** avec un rendement de 77 %. L'insertion de la chaîne fluorocarbonnée a pu être confirmée par RMN ¹⁹F et RMN ¹H avec l'apparition d'un multiplet à 2,57–2,44 ppm qui correspond aux méthylènes en positions α- et β- de la chaîne perfluorocarbonnée. La disparition du groupement CBz aux alentours de 7 ppm a également été constatée (*cf. Schéma II-14*).

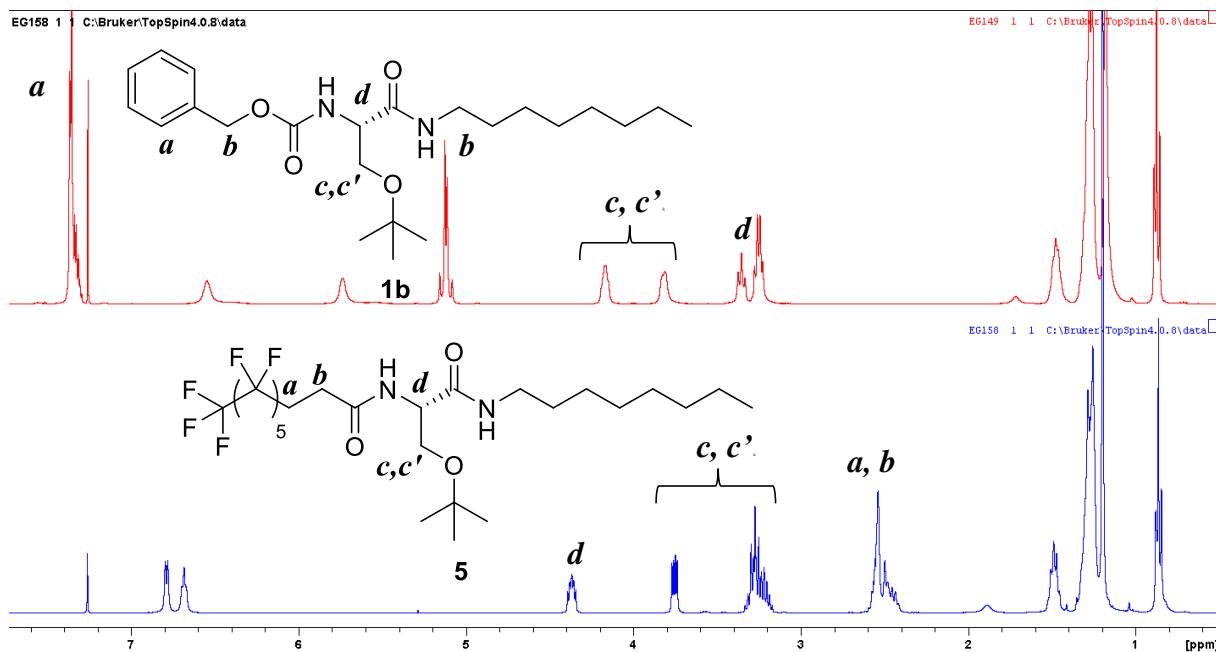


Schéma II-14. Insertion de la chaîne perfluorocarbonée et comparaison des spectres RMN ^1H des composés **1b** et **5**.

Puis on procède à la fonctionnalisation de la chaîne latérale de la sérine, en déprotégeant le groupement *t*Bu en conditions acides. L'intermédiaire hydroxyle **6** obtenu (72 % de rendement), est converti en forme mésylée dans le DCM à -10°C pendant 1 h sans purification ultérieure. Enfin, le composé mésylé **7** est à son tour converti en dérivé azoture **8** *via* une substitution nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ en présence d'azoture de sodium $\text{NaN}_{3(\text{s})}$ dans le DMF pendant 24 h à 70°C .

Cependant, de faibles rendements de formation du composé **8** sont observés pour cette réaction (*i.e.* 23 %) et en parallèle, la présence d'un composé plus polaire majoritaire **9** est observée avec un rendement moyen de 40 %. La caractérisation par RMN ^1H du sous-produit majoritaire **9** a démontré la disparition du proton de l'amide en α du carbone portant le proton H_{d} (*cf.* Schéma II-15).

La formation d'un multiplet à 4,55–4,44 ppm est également observée, correspondant au méthylène de la chaîne latérale cyclisée. Celui-ci est plus déblindé que celui du composé **8** sous la forme de doublets dédoublés à 3,74–3,70 ppm et 3,54–3,49 ppm, laissant supposer la présence d'un groupement électroattracteur dans l'environnement du méthylène. L'analyse par spectrométrie de masse, nous a confirmé la formation d'un sous-produit de type oxazoline, attestant la survenue d'une cyclisation intramoléculaire du côté *N*-latéral de la molécule.

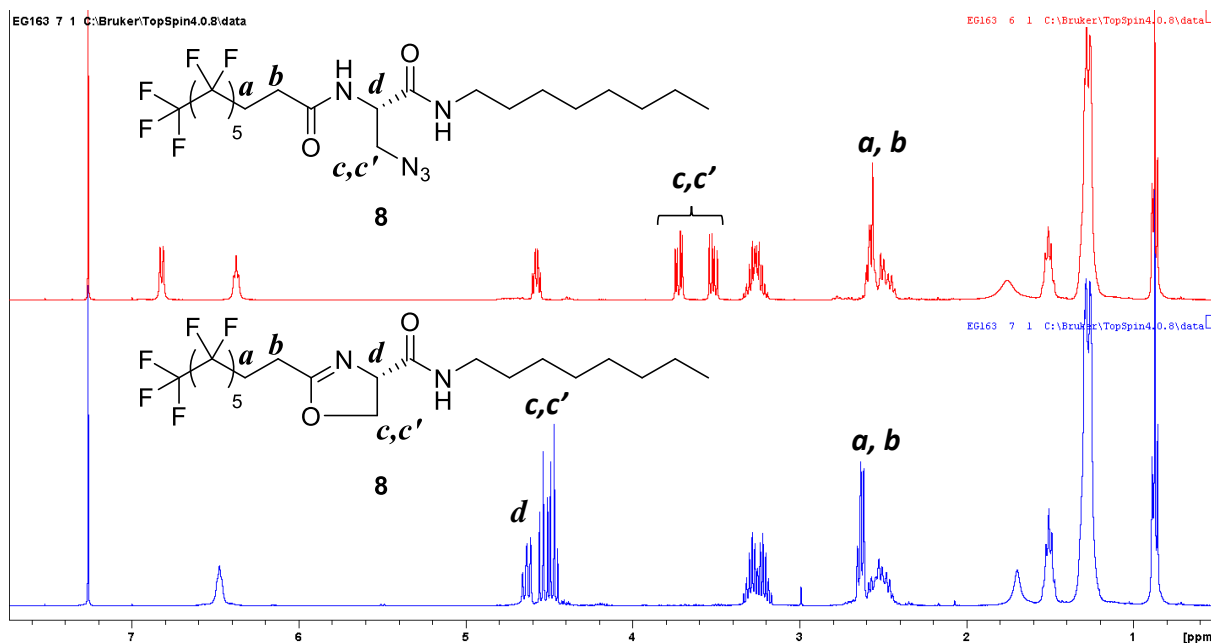


Schéma II-15. Comparaison des spectres RMN ^1H des composés 8 et 9.

Cette dernière a déjà été rapportée dans la littérature par attaque nucléophile de l'oxygène du carbonyle en position *N*-terminale sur le méthylène en α - du groupement partant mésylé (cf. Schéma II-16). Le groupe de Ginsburg *et al.*¹⁰⁶ a notamment rapporté dans la littérature la possibilité de garder cette position *N*-terminale protégée par un dérivé CBz, pour apporter suffisamment d'encombrement stérique et prévenir la formation d'oxazoline.

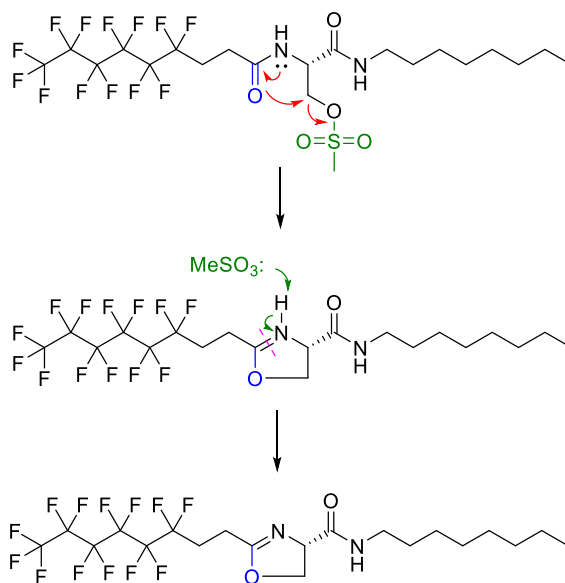


Schéma II-16. Mécanisme de cyclisation intramoléculaire possible en dérivé d'oxazoline via le composé mésylé¹⁰⁶.

C'est dans cette optique que nous avons souhaité, dans un premier temps, conserver le groupement protecteur benzyloxycarbonyle (Z) du substrat de départ (Z)-Ser(tBu)-OH. Mais, au vu de ce résultat, il aurait été compliqué de conserver la stratégie orthogonale utilisée dans cette voie de synthèse C jusqu'au fragment moléculaire hybride F–H final. Nous avons donc établi une alternative de synthèse que nous allons présenter en *section 2.4*.

2.4 Etude de la voie de synthèse D : alternative à la voie C

L'alternative de synthèse à la voie C que nous proposons se trouve sur le schéma rétrosynthétique suivant (*cf. Schéma II-17*), où nous avons décidé de partir d'un autre dérivé de sérine mono-protégé par un groupe protecteur tert-butoxycarbonyle (Boc), la Boc-L-sérine.

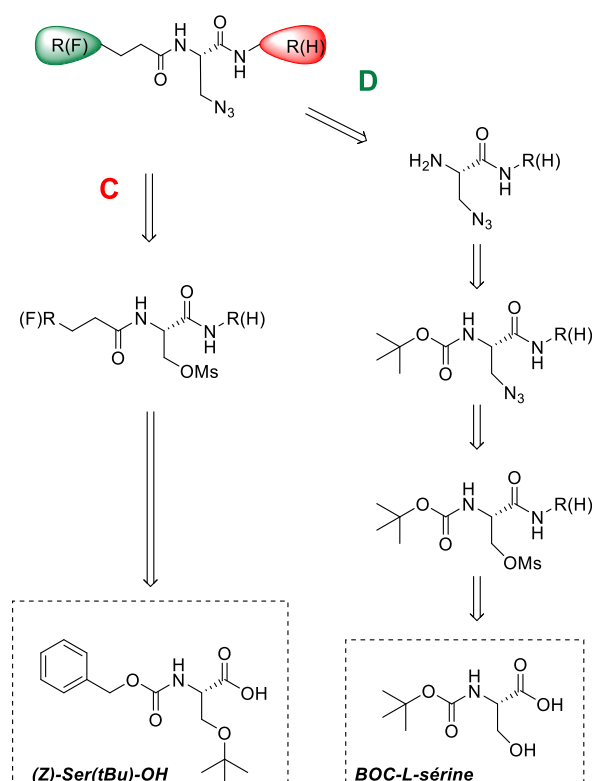


Schéma II-17. Comparaison des rétrosyntheses en voie C et voie D du fragment moléculaire hybride F–H symétrique par ses jonctions amides en position N/C-terminale de la sérine.

Comme pour la voie C, nous avons fonctionnalisé d’abord la position C–terminale de la Boc-L-sérine en introduisant la chaîne hydrocarbonée de longueur modulable. Puis nous avons fonctionnalisé ensuite la chaîne latérale jusqu’au dérivé azoture –N₃ en conservant la position N-terminale protégée par le groupement Boc pendant toutes ces étapes.

Après déprotection de l’amine primaire en position N-terminale, nous avons introduit la chaîne fluorocarbonnée en étape finale pour retrouver le fragment moléculaire hybride F–H obtenu à l’issue de la voie de synthèse C. À l’étape 1, nous avons appliqué les mêmes conditions de couplage peptidique PyBOP/Et₃N dans le THF anhydre pour voir si le changement du substrat avait une incidence sur le rendement de la réaction (*cf. Schéma II-18*).

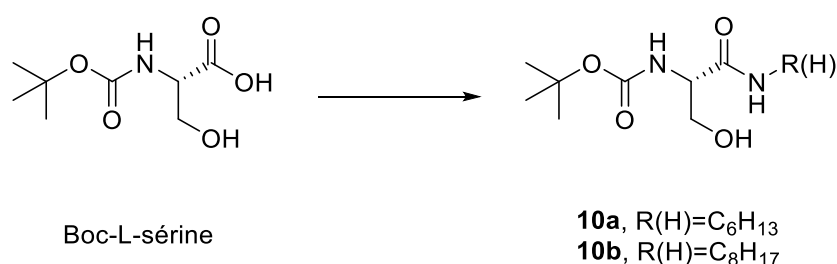


Schéma II-18. 1^{ère} étape de couplage peptidique entre Boc-L-sérine et la chaîne hydrocarbonée.

Pour la chaîne hydrocarbonée en C₆H₁₃, PyBOP/Et₃N se révèle être un couple de réactifs de choix, puisque nous obtenons après purification un rendement très satisfaisant de 93 % pour le composé **10a** (*cf. Tableau II-5*).

Entrées	Réactifs	Température	Temps de réaction	Rendement
EG183	Hexylamine (1,1 équiv.)	0 °C	1 h	93 % 10a (2,61 g)
	PyBOP (1,2 équiv.)	t.a.	18 h	
	Et ₃ N (2 équiv.)			
EG167	Octylamine (1,1 équiv.)	0 °C	1 h	43 % 10b (696 mg)
	PyBOP (1,2 équiv.)	t.a.	16 h	
	Et ₃ N (2 équiv.)			
EG171	Octylamine (1,1 équiv.)	0 °C	1 h	80 % 10b (2,45 g)
	DCC (1,2 équiv.)	t.a.	22 h	
	HOBt (2 équiv.) NMO (2 équiv.)			

Tableau II-5. Comparaison des deux conditions de couplage peptidique DCC/HOBt et PyBOP/ Et₃N pour l’introduction des chaînes hydrocarbonées en C₆H₁₃ et C₈H₁₇ à l’étape 1 de la voie D.

Par contre, en allongeant la chaîne de deux carbones, le rendement chute à 43 %. Les hypothèses de ce plus faible rendement peuvent être une perte non expliquée au cours du traitement **10b** ou bien une réaction secondaire en parallèle de la réaction de couplage. Nous avons donc utilisé un autre couple de réactif pour améliorer le rendement (DCC / HOBT). Nous sommes ainsi passés d'un rendement de 43 % à 80 % pour le composé **10b**. Aucun sous-produit n'a été détecté après purification chromatographique sur gel de silice. Les deux composés **10a** et **10b** ont pu être caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C et par spectrométrie de masse. Cependant, l'étape de purification a été difficile pour les deux composés, puisque ces deux intermédiaires ont « traîné » sur la colonne de silice.

Pour s'affranchir de cette étape de purification, nous avons décidé d'optimiser la synthèse en engageant directement le résidu brut obtenu **10a** ou **10b** pour l'étape de méthylation (cf. Schéma II-19).

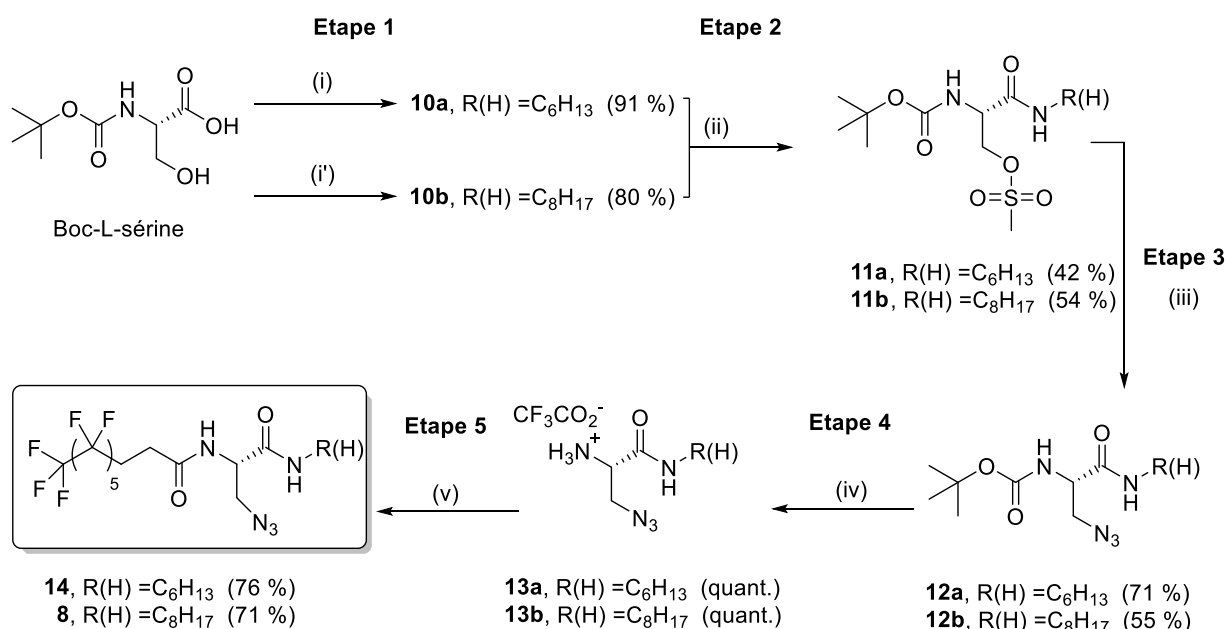


Schéma II-19. Synthèse multi-étapes pour l'obtention du vecteur hybride F–H symétrique aux jonctions amides par la voie D^a.

^a Conditions de réaction: (i) PyBOP/Et₃N, hexylamine, THF anh., 0 °C à t.a., 18 h; (i') DCC/HOBT, octylamine, N-méthylmorpholine, THF anh., 0 °C à t.a., 17 h; (ii) MsCl, Et₃N, DCM anh., -10 °C, 2 h; (iii) NaN_{3(s)}, DMF anh., 80 °C, 6 h; (iv) TFA/DCM (1:1 v/v), t.a., 3 h; (v) PyBOP, Et₃N, 2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-acide perfluorononanoïque, 0 °C à t.a., 8 h.

Les composés **11a** et **11b** résultants, ont été obtenus avec des rendements respectifs de 42 % et 54 % sur les deux étapes. Par la suite, la conversion en dérivés azotures **12a** et **12b** a pu se faire avec 55 % et 71 % de rendement. En effet, aucune trace de dérivés d'oxazoline n'a été révélée à l'issue de la purification de ces deux composés. Comme nous l'avons expliqué en *section 2.3*, la présence du groupement protecteur Boc en position *N*-terminale tout au long de la réaction a permis de conserver un encombrement stérique significatif, défavorisant ainsi la réaction de cyclisation intramoléculaire.

Enfin, la déprotection du groupement Boc en conditions acides puis l'addition finale de la chaîne perfluorocarbonée par un couplage peptidique PyBOP/Et₃N nous a permis d'obtenir les composés hybrides F–H finaux **14** et **8** avec des rendements après purification de 76 % et 71 % respectivement (*cf. Schéma II-20*). Ces deux composés, que nous appellerons **F₆H₆N₃** et **F₆H₈N₃** pour la suite de l'étude, ont été totalement caractérisés. Les rendements globaux de la synthèse multi-étapes pour ces deux fragments moléculaires hybrides F–H sont respectivement de 22 % et 21 %.

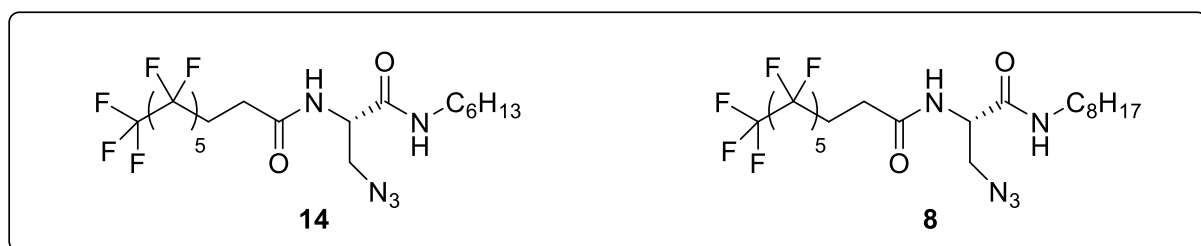


Schéma II-20. Structure des composés hybrides F₆H₆N₃ (à gauche) et F₆H₈N₃ (à droite).

Pour conclure, différentes stratégies de synthèses (A, B, C et D) ont été imaginées et ont été testées pour synthétiser les fragments moléculaires hybrides F–H. Le *Schéma II-21* récapitule toutes les voies explorées avec les obstacles et succès rencontrés. Pour l'élaboration de nouvelles molécules analogues, la voie D a été privilégiée.

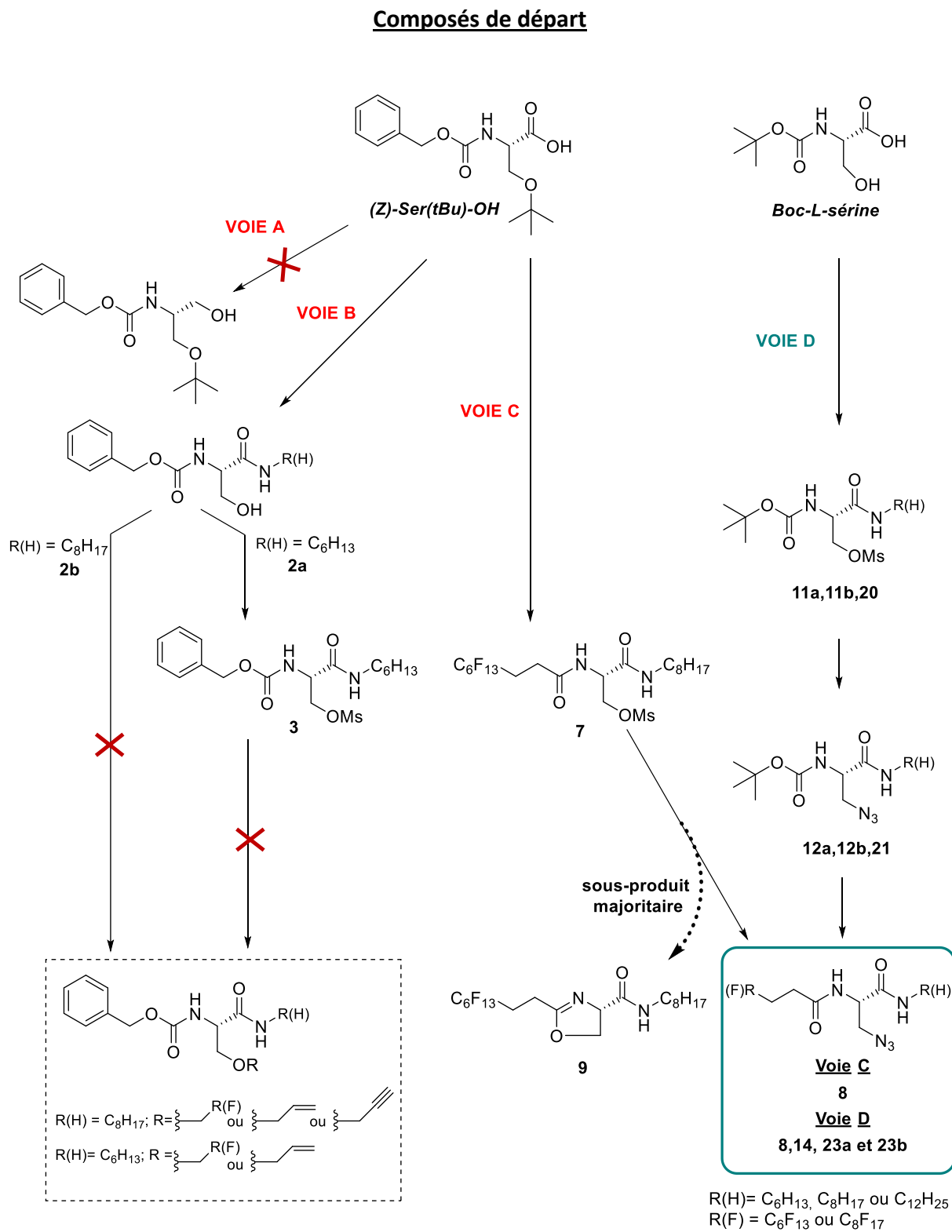


Schéma II-21. Résumé des voies de synthèse engagées (A, B, C et D).

3. Synthèse des tensioactifs hybrides F–H

3.1 Construction de la série de tensioactifs PEGylés

3.1.1 Tensioactifs à chaîne fluorée F_6

Pour construire nos tensioactifs hybrides F–H finaux (*cf. Schéma II-22*), nous avons choisi dans un premier temps de greffer des réactifs commerciaux PEG propargylés sur nos blocs hybrides azotures $F_6H_6N_3$ et $F_6H_8N_3$ obtenus en *section 2.4*. Deux longueurs différentes de chaînes PEG ont été utilisées pour le greffage afin d'évaluer l'influence sur les propriétés physico-chimiques des agrégats formés par ces tensioactifs. Ceci fera l'objet d'une étude complète en Chapitre III.

Ces réactifs PEGylés clickables ont une masse molaire moyenne entre 750 et 2000 g/mol, un nombre d'unités PEG (p), égal à 17 et 42. Ils ont été greffés sur les blocs hybrides $F_6H_6N_3$ et $F_6H_8N_3$ *via* une réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I), variante de la réaction de cycloaddition de Huisgen en 1,3-dipolaire. Cette réaction de *chimie click* catalysée au cuivre (I) a été rapportée pour la première fois par les travaux de Meldal *et al.* et Sharpless *et al.* au début des années 2000^{107–109}. Elle offre de multiples possibilités de fonctionalisation, permettant de construire aisément des architectures moléculaires complexes à partir de fragments moléculaires d'une grande diversité (polymères, sucres, peptides)¹¹⁰. Elle est d'autant plus intéressante qu'elle est facile à mettre en œuvre dans des conditions douces et des solvants variés comme le DMF, THF, *t*BuOH ou encore l'eau.

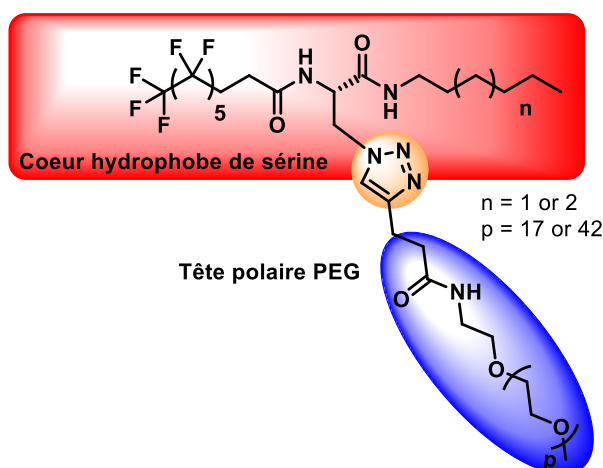


Schéma II-22. Tensioactifs envisagés en chaîne perfluorocarbonée F_6 .

La chimie click permet également d'obtenir de meilleurs rendements de divers analogues macromoléculaires, *via* la formation d'une jonction chimiosélective 1,4-triazole entre les blocs azoture et propargyle, contrairement à la version classique de cycloaddition de Huisgen qui apporte une racémisation en 1,2,3-triazole 1,4 et 1,5-disubstitués, en plus d'être réalisable seulement à des hautes températures (*cf. Schéma II-23*)^{109,111,112}.

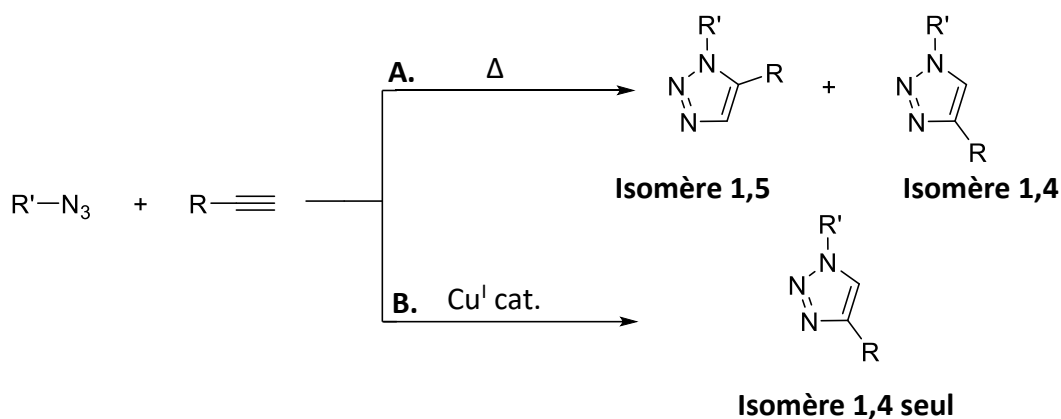


Schéma II-23. Comparaison des méthodes et régiosélectivité des cycloadditions : (A) cycloaddition classique de Huisgen en 1,3-dipolaire ; (B) cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I). R et R' sont des fonctions chimiques.

La jonction 1,4-triazole est une fonction plébiscitée dans de nombreuses applications biomédicales et pharmacologiques, notamment en tant que bioisostère de liens peptidiques (*i.e.* mimant l'activité d'une autre entité chimique), ou encore d'outil de synthèse pour l'élaboration de nouvelles classes de pharmacophores en chimie médicinale¹¹³.

En ce qui concerne le mécanisme de la réaction catalytique (*cf. Schéma II-24*), le catalyseur au cuivre utilisé peut être généré à partir de sels de cuivre (I) préformés ou *in situ* à partir de sels de cuivre (II) avec un agent réducteur comme l'ascorbate de sodium qui est le plus commun.

Le cycle catalytique peut être défini selon les étapes suivantes¹¹⁴ :

- (i) la formation *in situ* d'une liaison σ entre le cuivre et l'alcyne ;
- (ii) l'intervention d'un second atome de cuivre, qui se coordine par une liaison π au dérivé d'alcyne de cuivre formé, formant un complexe catalytique intermédiaire
- (iii) l'introduction du dérivé d'azoture qui vient se coordiner de manière réversible sur le précédent complexe catalytique

- (iv) l'élimination des atomes de cuivre qui seront ré-impliqués dans le cycle suivant et la formation du dérivé de triazole régiosélectif

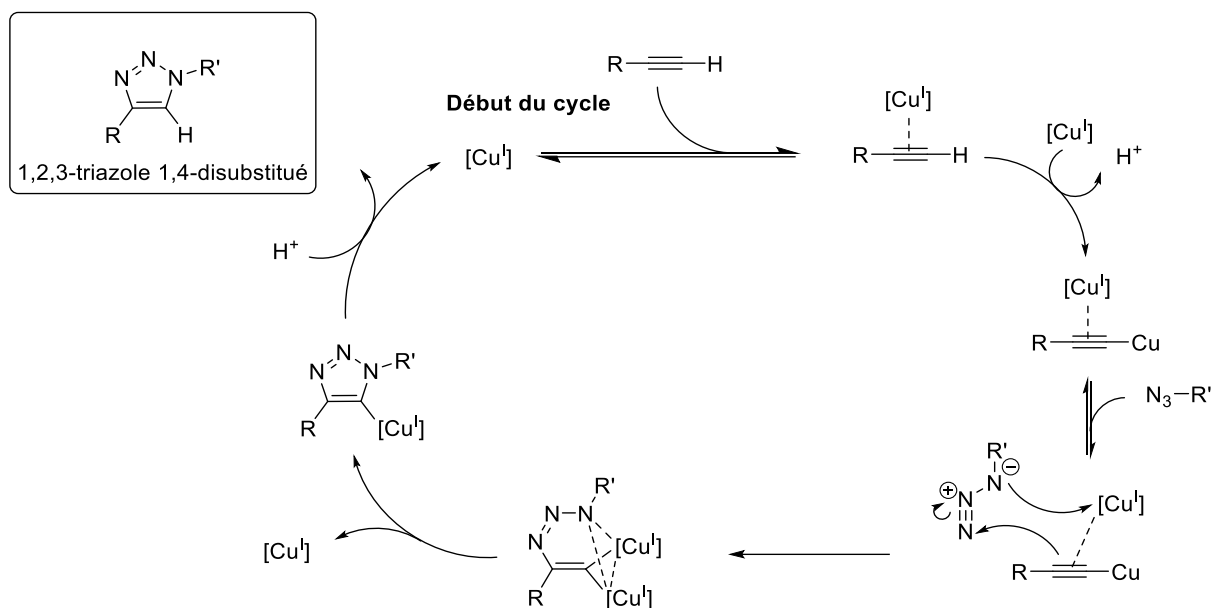


Schéma II-24. Cycle catalytique de formation du 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué. R et R' sont des fonctions chimiques. Ce schéma est inspiré des travaux de Worell *et al*¹¹⁴.

Toutefois, pour s'affranchir des risques possibles de dégradation oxydative pendant le cycle catalytique de la réaction, nous avons préféré utiliser le sulfate de cuivre (II), plus stable, plutôt que le cuivre (I) préformé comme catalyseur de la réaction, couplé au réducteur d'ascorbate de sodium (*cf. Schéma II-25*)¹¹⁵.

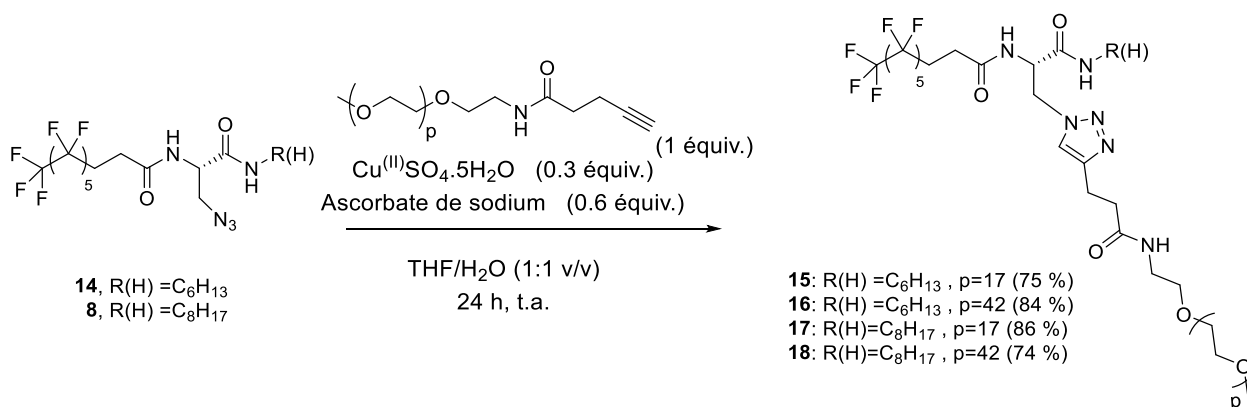


Schéma II-25. Formation 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué entre les blocs hybrides F–H F₆H₆N₃ et F₆H₈N₃ et le réactif propargyl PEG-OME commercial.

Les composés hybrides **14** ou **8** sont ainsi mis en contact dans un mélange THF/eau (1:1, v/v) avec le propargyl PEG-OMe commercial de taille désirée (1 équiv.) et le sulfate de cuivre pentahydraté $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en quantité catalytique (0,3 équiv.). La réaction est conduite sous atmosphère d'argon pour s'affranchir de possibles réactions secondaires oxydatives. En parallèle, l'ascorbate de sodium est ajouté au mélange pour réduire le cuivre (II) en cuivre (I). La cycloaddition est ensuite conduite à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 h.

Nous obtenons ainsi 4 tensioactifs hybrides F–H différents **15–18** appelés dans l'ordre **F₆H₆PEG750**, **F₆H₆PEG2000**, **F₆H₈PEG750** et **F₆H₈PEG2000**. Ceux-ci ont des rendements de synthèse très satisfaisants entre 73 % et 84 % après purification sur chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex[®] LH-20, 100 % MeOH) et lyophilisation des échantillons.

La formation sélective de l'hétérocycle disubstitué 1,4-triazole est confirmée par RMN ¹H et RMN 2D (HSQC 2D), puisque nous observons un singulet à 7,67 ppm correspondant au proton du triazole. Le greffage du PEG commercial est confirmé, puisque nous observons les signaux des motifs éthylène glycol sur le spectre RMN ¹H des molécules finales (*cf. Schéma II-26*).

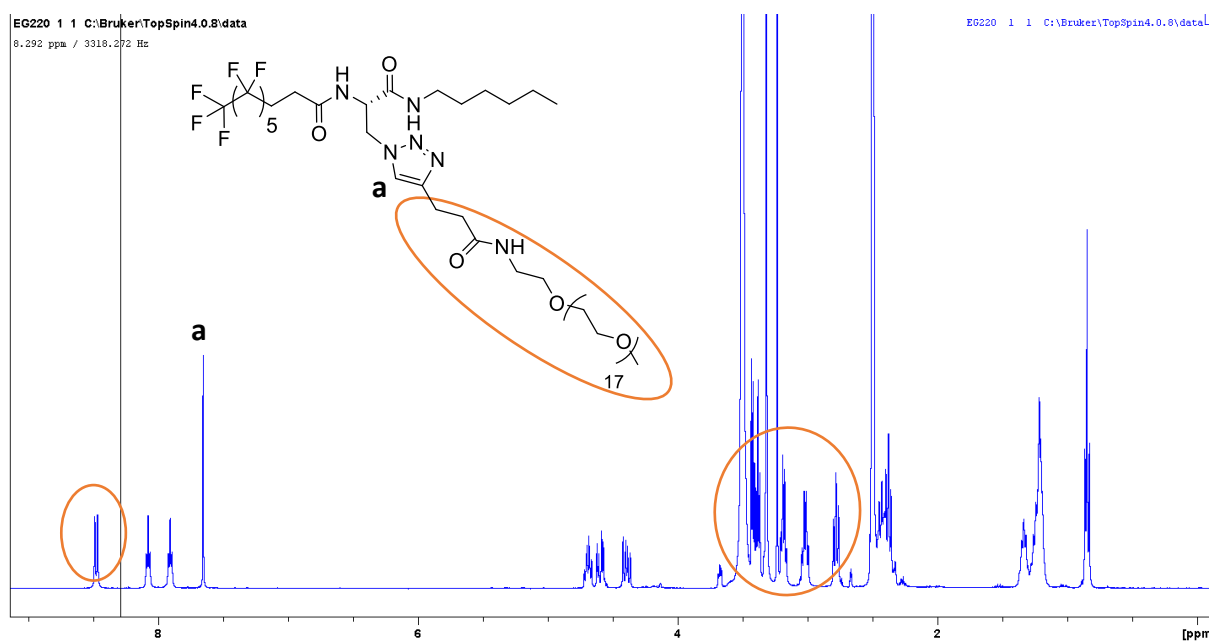


Schéma II-26. Spectre RMN ¹H de F₆H₆PEG750. En orange, les signaux relatifs au greffage du PEG commercial.

Les masses molaires moyennes en nombre \overline{M}_n et en poids \overline{M}_w de chaque tensioactif hybride F–H ont pu être déterminées *via* la spectrométrie Maldi-TOF/SM. Un exemple est donné en *Figure II-1*. L'indice de polydispersité (PDI), rendant compte de la distribution des longueurs de chaînes PEG a également été déterminé pour chaque tensioactif PEGylé (*cf. Matériel et Méthodes*).

Leur PDI étant très proche de 1, cela signifie que la distribution des longueurs de chaînes PEG pour chaque molécule est uniforme (17 motifs d'oxyde d'éthylène pour la série PEG750 et 42 motifs pour la série PEG2000). En corroborant la RMN ^1H avec le nombre total de protons contenu dans un motif éthylène glycol, le nombre de motifs PEG moyen a pu être confirmé pour chaque tensioactif hybride F–H.

EB204.0_H6\1
SA

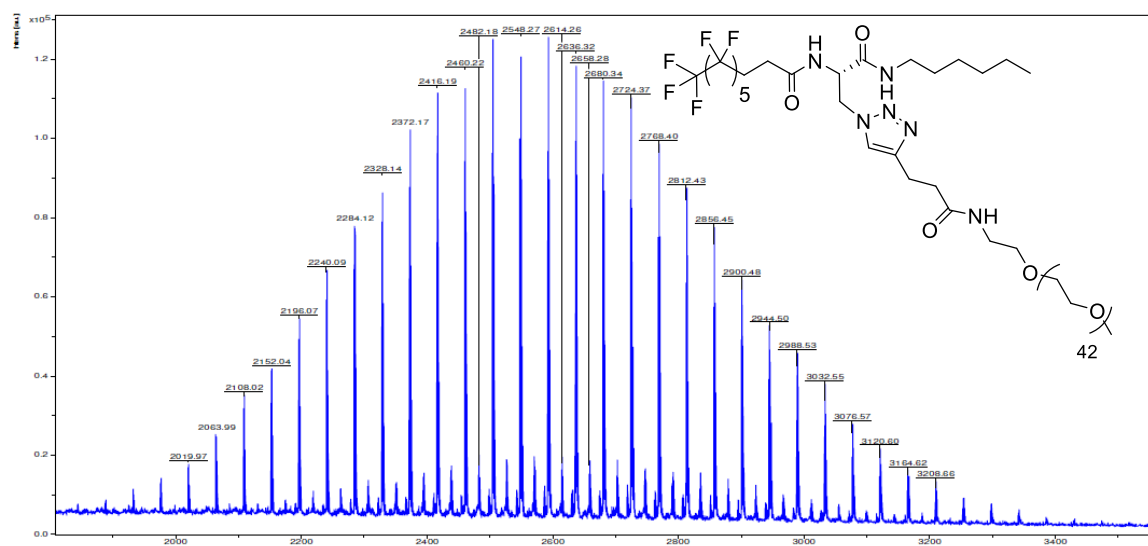


Figure II-1. Spectre Maldi-TOF/M du tensioactif hybride F–H F₆H₆PEG2000. Chaque pic est espacé de 44 g/mol correspondant à une unité d'éthylène glycol.

Ainsi, nous obtenons pour la série F₆ des rendements globaux raisonnables en partant de la Boc-L-sérine entre 17 % et 20 %, mettant également en évidence la bonne reproductibilité et modularité de cette synthèse multi-étapes.

La solubilité des molécules dans l'eau a également été vérifiée pour la suite des analyses physico-chimiques. Celle-ci a été délimitée en test préliminaire en diluant

graduellement une concentration initiale en tensioactif à 100 g/L exagérément haute. Les échantillons sont rapidement agités à la main et observés à l'œil nu pour détecter un excès de précipité. On constate qu'en dessous de 100 g/L, on observe des solutions translucides instantanément où aucun précipité pour la série F₆ n'est détecté au cours du temps. Il se forme une mousse épaisse et stable pendant quelques heures.

3.1.2 Tensioactifs à chaîne fluorée F₈

Nous avons ensuite souhaité évaluer l'influence de la longueur de chaîne fluorocarbonée des tensioactifs hybrides F–H sur les propriétés physico-chimiques des agrégats résultants. Pour ce faire, nous avons synthétisé deux nouveaux blocs hybrides F–H *via* la voie D comportant une chaîne fluorocarbonée en F₈, avec une chaîne hydrocarbonée variant de 8 à 12 carbones. La synthèse multi-étapes présentée en Schéma II-27 se poursuit ainsi de la même façon que pour la série F₆.

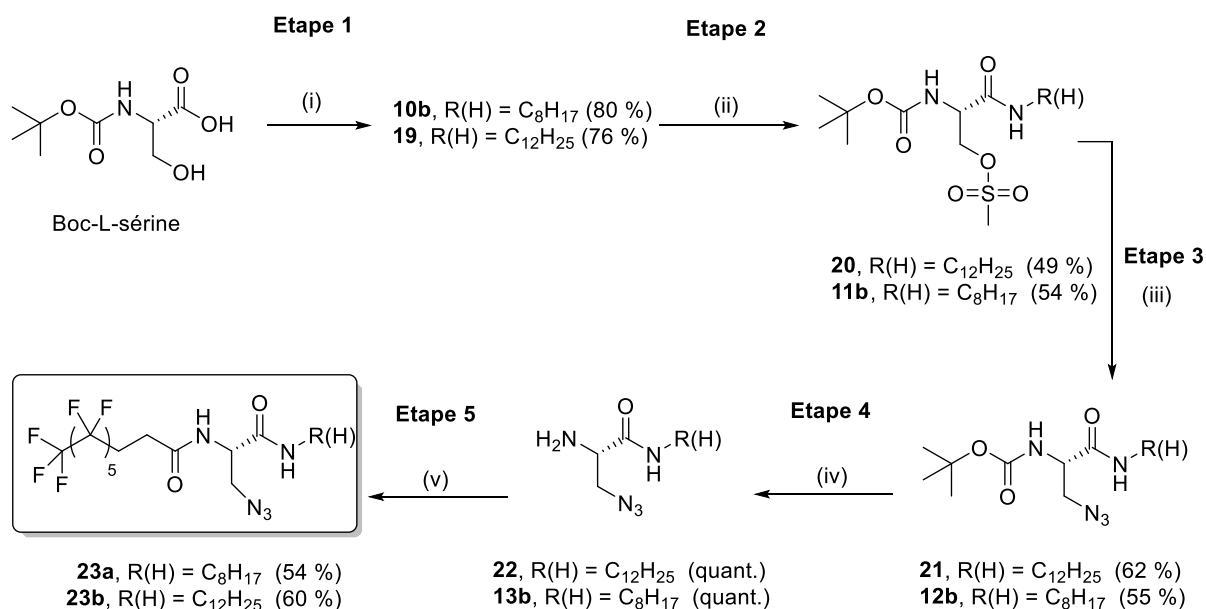


Schéma II-27. Synthèse multi-étapes pour la série F₈ PEGylée par la voie de synthèse D^a.

^a Conditions de réaction: (i) DCC/HOBt, octylamine, *N*-méthylmorpholine, THF anh., 0 °C à t.a.; (ii) MsCl, Et₃N, DCM anh., -10 °C; (iii) NaN_{3(s)}, DMF anh., 80 °C; (iv) TFA/DCM (1:1 v/v), t.a; (v) PyBOP, Et₃N, 2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-acide perfluorononanoïque, 0 °C à t.a.

L'étape 1 du couplage peptidique a d'abord conduit à la formation des composés **10b** et **19** avec 80 % et 76 % de rendement après purification par chromatographie flash. Tout comme pour la série F₆, nous avons simplifié le protocole en passant directement les composés **10b** et **19** bruts en réaction de mésylation (Etape 1, condition ii). Ces blocs hybrides F–H **23a** et **23b**, que nous appellerons **F₈H₈N₃** et **F₈H₁₂N₃** respectivement, sont obtenus avec un rendement global de 18 % et 16 % au terme de la synthèse multi-étapes (cf. Schéma II-28).

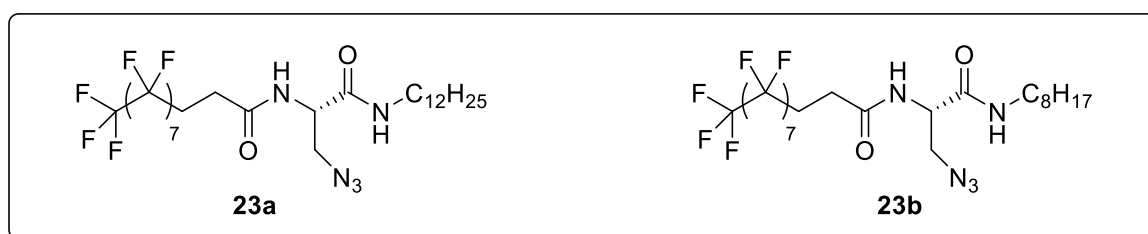


Schéma II-28. Structure des vecteurs hybrides F–H, ici **F₈H₁₂N₃** (à gauche) et **F₈H₈N₃** (à droite).

Par la suite, comme pour la série F₆, **F₈H₈N₃** et **F₈H₁₂N₃** sont mis en contact dans un mélange THF/eau (1:1, v/v) avec le propargyl PEG-OMe commercial de longueur désirée (1 équiv.) pour réaliser la réaction de *chimie click* (cf. Schéma II-29).

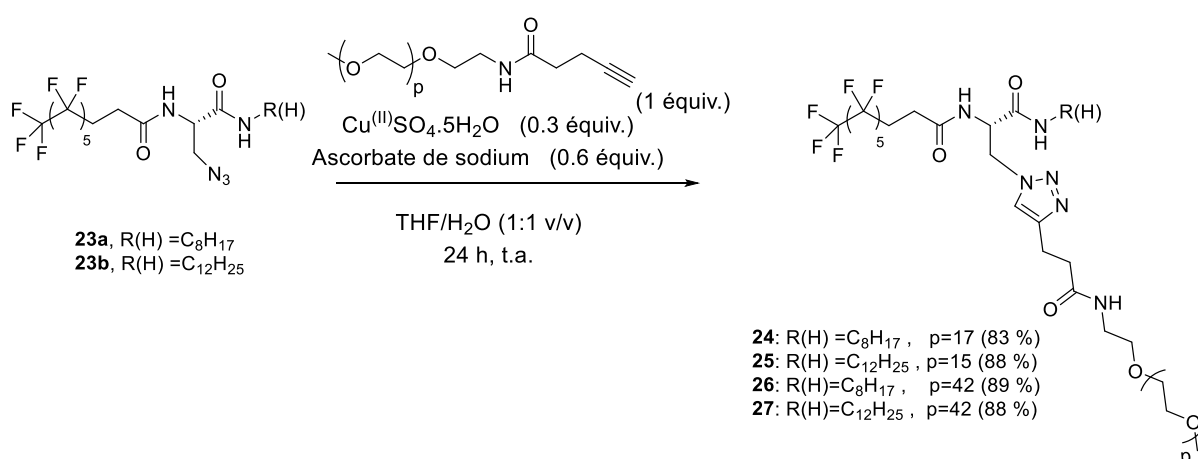


Schéma II-29. Formation 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué les blocs hybrides F–H **F₈H₈N₃** et **F₈H₁₂N₃** et le réactif propargyl PEG-OMe commercial.

En comparant avec les rendements de la série F₆ pour cette réaction, ceux-ci sont légèrement plus élevés. Nous avons donc conservé ce protocole optimisé pour les synthèses

futures. Les rendements globaux depuis le réactif commercial Boc-L-sérine, ceux-ci sont situés entre 14 % et 16 %, légèrement en-dessous de ceux trouvés pour la série F₆. Les analyses Maldi-TOF/MS pour le calcul des \overline{M}_n et \overline{M}_w , ainsi que le PDI de chaque molécule ont pu être déterminés également, proche de 1 (*cf. Matériel et Méthodes*). Le nombre de motifs PEG moyen pour chaque tensioactif et de 15, 16 et 42 motifs d'oxyde d'éthylène pour **F₈H₈PEG750**, **F₈H₁₂PEG750** et les dérivés PEG2000 respectivement. Cette différence pour les PEG750 pourrait provenir de la purification des lots sur Sephadex[®] LH-20.

En reprenant le même protocole de solubilité que pour la série F₆, on observe également des solutions translucides instantanément à une concentration inférieure ou égale à 100 g/L où aucun précipité n'est détecté au cours du temps. Il se forme une mousse épaisse et stable pendant quelques heures

3.2 Construction de la série de tensioactifs glycosylés

3.2.1 Synthèse de F₆H₆_Glucose et F₆H₈_Glucose

En parallèle des deux séries de molécules PEGylées, nous avons souhaité utiliser une autre tête polaire glucosylée pour construire une série de tensioactifs hybrides F–H et étudier leurs propriétés physico-chimiques ultérieurement. Pour ce faire, nous sommes repartis des blocs **F₆H₆N₃** et **F₆H₈N₃** en utilisant la même réaction de *chimie click* utilisée pour les deux précédentes séries de tensioactifs synthétisés (*cf. Schéma II-30*).

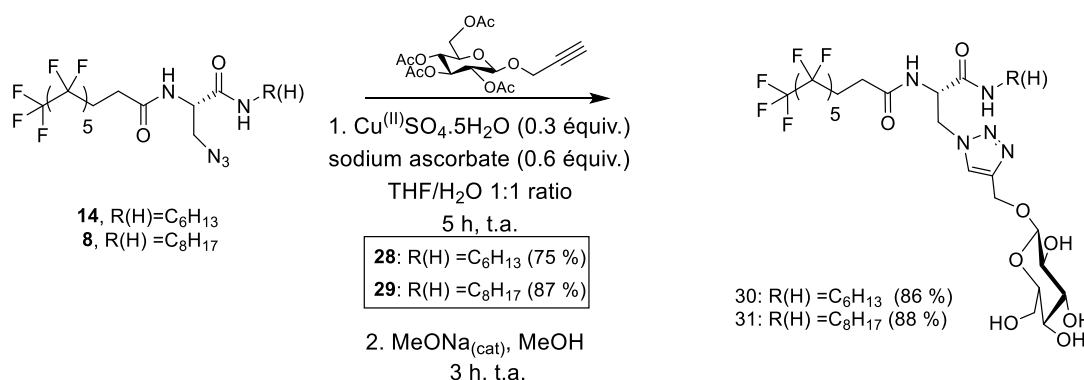


Schéma II-30. Réaction de cycloaddition de Huisgen entraînant la formation d'un lien 1,4-triazole entre les blocs moléculaires hybrides F–H et le réactif glucosyl O-tétraacétylé.

Le motif hydrophile propargylé ici est le 2-Propynyl-2,3,4,6-*tetra*-O-acetyl- β -D-glucopyranoside, réactif déjà disponible dans la chimiothèque du laboratoire. Celui-ci est mis en réaction (1,1 équiv.) avec les blocs hybrides F–H **8** et **14** (1 équiv.) et le couple catalyseur Cu(II)SO₄.5H₂O (0,3 équiv.) / ascorbate de sodium (0,6 équiv.), pendant 5 h sous agitation à température ambiante et à l’abri de la lumière.

Les deux composés **28** et **29** respectivement dénommés **F₆H₆Glu(OAc)₄** et **F₆H₈Glu(OAc)₄**, ont été obtenus avec des rendements de 75 % et 87 % après purification sur chromatographie d’exclusion stérique (Sephadex® LH-20, 100 % MeOH) et lyophilisation des échantillons. La RMN ¹H a confirmé l’insertion du motif glucosylé par la présence des signaux relatifs aux –CH du sucre entre 5,5–4 ppm. Le signal du multiplet à 3,7 ppm fait référence sur la RMN COSY 2D au –CH en position *e* sur le cycle glucosylé, lié au CH₂ en position *f* (2 doublets dédoublés) entre 4,16–4,28 ppm (*cf.* Schéma II-31).

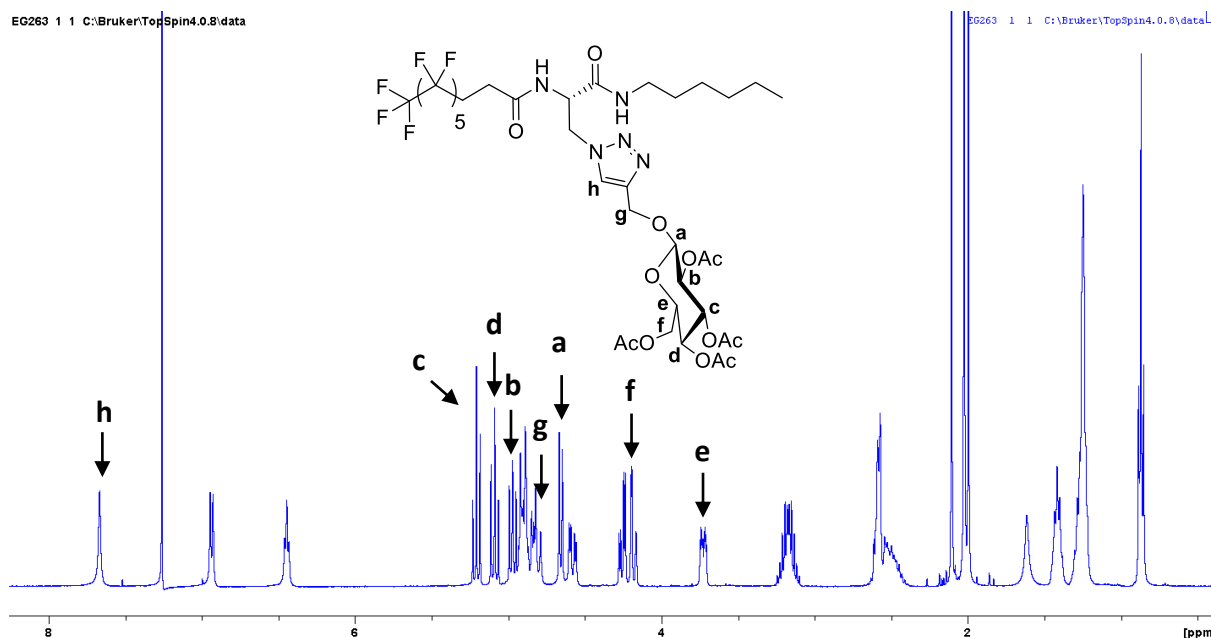


Schéma II-31. Spectre RMN ¹H du composé **28** après réaction de cycloaddition.

Nous obtenons les composés glycosylés tétraacétylés en configuration anomérique β avec une constante de couplage vicinale ³J_{a,b} de 7,9 Hz pour le signal du doublet du proton H_a à 4,66 ppm (contrairement à ³J_{a,b} < 4 Hz pour l’isomère α). Cette configuration est également

confirmée avec un pic unique à ~ 101 ppm du carbone anomère. La réaction de click confère en effet une rétention de la configuration anomérique β ^{116,117}.

Enfin, la déprotection des composés **28** et **29** a pu être menée par ajout catalytique de méthanolate de sodium (MeONa) en solution dans le MeOH pendant 3 h à température ambiante. On ajoute ensuite de la résine IRC50 pour acidifier le milieu à un pH ~ 4 . Ceci permet d'obtenir, après purification sur résine Sephadex® LH-20 (100%) et lyophilisation des fractions pures éluées, les composés finaux **30** et **31** avec des rendements de réaction de 86 % et 93 % respectivement. Ces composés ont été appelés **F₆H₆_Glucose** (composé **30**) et **F₆H₈_Glucose** (composé **31**) pour la suite. Ils ont été totalement caractérisés par RMN ¹H, ¹³C et ¹⁹F ainsi que par spectrométrie de masse. La limite de solubilité dans l'eau a également été estimée. Cette fois-ci nous sommes partis d'une concentration de 1 g/L pour chacun et avons fait des dilutions successives dans l'eau et avons observé leur état après passage au vortex pendant 2 min.

Ainsi nous avons grossièrement délimité la limite de solubilité à 1 g/L pour **F₆H₆_Glucose** et 0,75 g/L pour **F₆H₈_Glucose**. Etant donné leur plus faible hydrosolubilité comparée aux tensioactifs hybrides F–H PEGylés, nous avons tenté de les valoriser en tant que vésicules. Pour ce faire, nous les avons solubilisés dans un solvant organique pour faire un film lipidique sec, qui a été réhydraté à chaud pour apporter de l'énergie au système et favoriser leur auto-assemblage dans l'eau. Cette approche fera l'objet d'une discussion approfondie dans le Chapitre III.

3.2.2 Essai de synthèse en tétraglycosylation

En parallèle, nous avons souhaité rendre les tensioactifs hybrides F–H glycosylés **F₆H₆_Glucose** et **F₆H₈_Glucose** plus hydrosolubles pour une possible organisation micellaire dans l'eau, en essayant de greffer un motif glucose sur chaque groupe hydroxyle –OH libre du glucose initial, comme proposé dans le *Schéma II-32*.

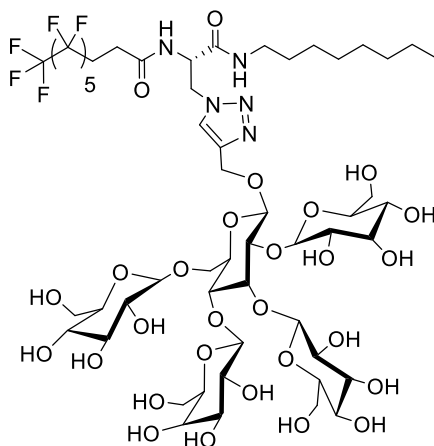


Schéma II-32. Arborescence visée du dérivé pentaglycosylé de tensioactif hybride F–H en chaîne C₈H₁₇.

Dans un premier temps, nous sommes partis du composé **F₆H₈_Glucose** sur lequel nous avons effectué une réaction de *tétraglycosylation* catalysée au triflate d'argent AgOTf_(aq) inspiré du protocole du groupe de Pil Sheek Chae *et al*¹¹⁸.

Le composé **F₆H₈_Glucose** est ainsi mis en solution dans le DCM anhydre refroidi à -45°C sous atmosphère inerte. On ajoute ensuite le donneur de glycosyle, l'acétobromoglucose (4,8 équiv.) préalablement dilué dans du DCM, qui sera ajouté goutte à goutte sur une période de 30 min à -45 °C. Le milieu est ensuite laissé agiter pendant 30 min et laissé revenir à 0 °C sur 1 h (*cf. Schéma II-33*).

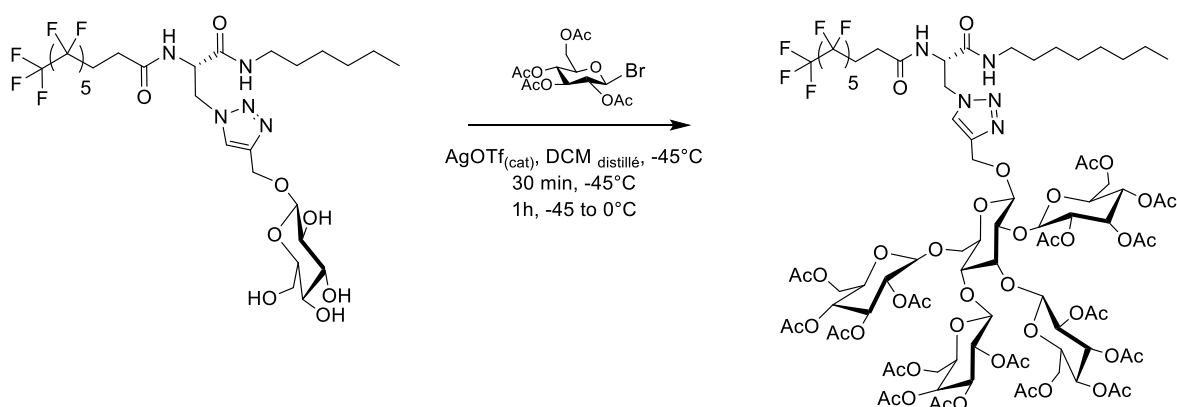


Schéma II-33. Réaction de tétraglycosylation à partir du composé **F₆H₈_Glucose**.

Le suivi chromatographique indique une disparition du composé de départ et l'apparition de produits apolaires très proches en termes de rapports frontaux. Après

traitement avec $\text{Na}_2\text{SO}_{3(\text{aq})}$ 1M, $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 1M et lavages successifs avec une solution de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ saturée suivie d'une purification sur Sephadex[®] LH-20 en DCM/MeOH (50:50, v/v), nous avons isolé une fraction que nous avons analysé en RMN. Nous nous sommes aperçus que nous obtenions un mélange de composés secondaires à différents états de glycosylation partielles sur le motif **F₆H₈_Glucose** central. Malheureusement, nous n'avons ni pu déterminer à quel degré sont ces états de glycosylation partielle en mélange (*i.e.* Mono- ; Di- ; Tri- ; ou tétraglycosylé), ni leur proportion dans le mélange, compte tenu de leurs déplacements chimiques identiques en RMN ¹H.

3.2.3 Essai de synthèse d'une tête polaire tétraglycosylée

Pour éviter ces états de glycosylation partielle, nous avons tenté de synthétiser premièrement une tête polaire propargylée *tétraglycosylée*, puis de l'insérer *via* une réaction de *chimie click* sur le fragment moléculaire hybride **F₆H₈N₃** (*cf.* Schéma II-34).

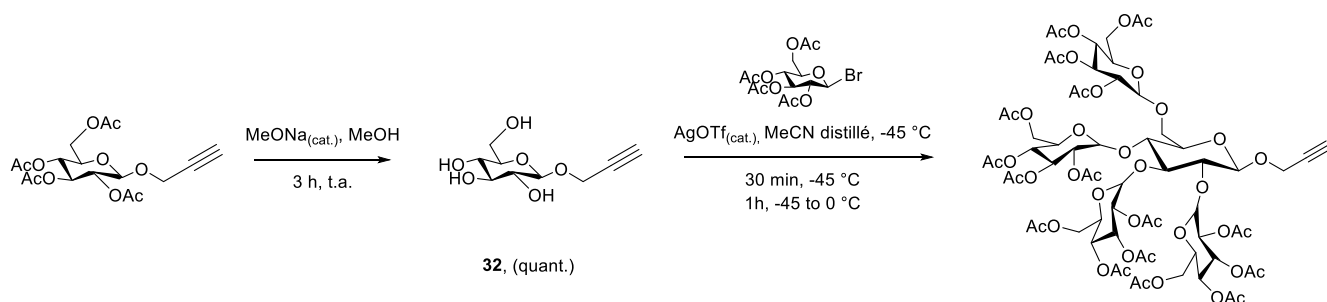


Schéma II-34. Synthèse de la nouvelle tête polaire tétraglycosylée à partir du 2-Propynyl 2,3,4,6-*tetra*-O-acetyl-β-D-glucopyranoside.

Le 2-Propynyl-2,3,4,6-*tetra*-O-acetyl-β-D-glucopyranoside a été utilisé ici comme réactif de départ, que nous avons déprotégé par $\text{MeONa}_{(\text{cat.})}/\text{MeOH}$. Une fois le composé déprotégé **32** obtenu quantitativement, une tétraglycosylation a été faite en présence de 4,4 équivalents d'acétobromoglucose dans le mélange de solvants MeCN/dioxane (5:1, v/v). Les solvants ont été choisis en raison de la faible solubilité du fragment moléculaire **32** déprotégé dans le DCM. Nous avons également passé le milieu réactionnel de départ sous ultrasons pour aider à la solubilisation du composé de départ.

Malgré ces précautions, le composé **32** n'a été que partiellement solubilisé. Par manque de temps, cet essai préliminaire n'a pu être exploré plus en détails mais cette voie de synthèse pourrait être une perspective intéressante quant à la synthèse de futurs dérivés pentaglycosylés appartenant à la famille des tensioactifs hybrides F–H.

Conclusion

Pour clore ce chapitre consacré à la synthèse de nouveaux tensioactifs hybrides F–H non ioniques, nous avons dans un premier temps exploré les possibilités de synthèse multi-étapes de différents blocs hybrides F–H. Malheureusement, suite aux obstacles rencontrés au cours des voies A et B, les molécules cibles ayant des bras écarteurs symétriques (jonction éther) et asymétriques (jonction éther/amide) n'ont pu être obtenues. L'étude que nous devons mener sur l'influence de la nature et de la position de ces bras écarteurs sur les propriétés d'auto-assemblage des molécules cibles n'a pu se faire, mais serait un axe intéressant à explorer en perspective.

Toutefois, nous avons réussi à synthétiser le fragment moléculaire hybride F–H **F₆H₈N₃** obtenu dans un premier temps par la voie C, puis à optimiser la stratégie orthogonale démarrant la synthèse avec la Boc-L-sérine (voie D). Par cette dernière voie de synthèse, 4 blocs hybrides F–H ont pu être obtenus avec une chaîne fluorocarbonée à 6 et 8 carbones, et une chaîne hydrocarbonée de 6 à 12 carbones.

Ces mêmes blocs hybrides F–H ont par la suite été engagés dans une réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3-dipolaire. Cette cycloaddition a permis de greffer sur leur fonction azoture différentes têtes polaires propargylés PEGylés ou glycosylés dans des conditions douces, sans formation de co-produits et avec des rendements très satisfaisants (entre 74% et 89%). Suite à cela, 10 tensioactifs hybrides F–H ont pu être synthétisés et totalement caractérisés (*cf. Schéma II-35*). Ils feront l'objet d'une étude physico-chimique de leurs agrégats et d'une discussion au prochain chapitre.

La faible solubilité dans l'eau des tensioactifs glycosylés **F₆H₆_Glucose** et **F₆H₈_Glucose** (i.e. 1g/L et 0,75 g/L respectivement) nous a amenés à les imaginer en tant que mimes de

lipides, favorisant la formation de systèmes tels que les bicouches membranaires ou liposomes.

Nous avons en parallèle tenté de tétraglycosyler chaque groupe hydroxyle –OH de la tête glucose de **F₆H₈_Glucose**, avec un motif glucose pour ainsi accroître leur hydrosolubilité. Malheureusement, nous avons été confrontés à des problèmes de glycosylation partielle et de réactivité, notamment pour la stratégie de synthèse d'une nouvelle tête polaire propargylé *pentaglycosylé*. Il serait intéressant en perspective de se pencher sur la réactivité de cette tétraglycosylation sur ces tensioactifs hybride F–H glycosylés, et aboutir à la fonctionnalisation totale de leurs groupes hydroxyles –OH.

Cette potentielle nouvelle série de tensioactifs hydrosolubles, possédant une arborescence structurale originale, pourrait aboutir à des applications micellaires futures très intéressantes notamment dans le domaine biomédical.

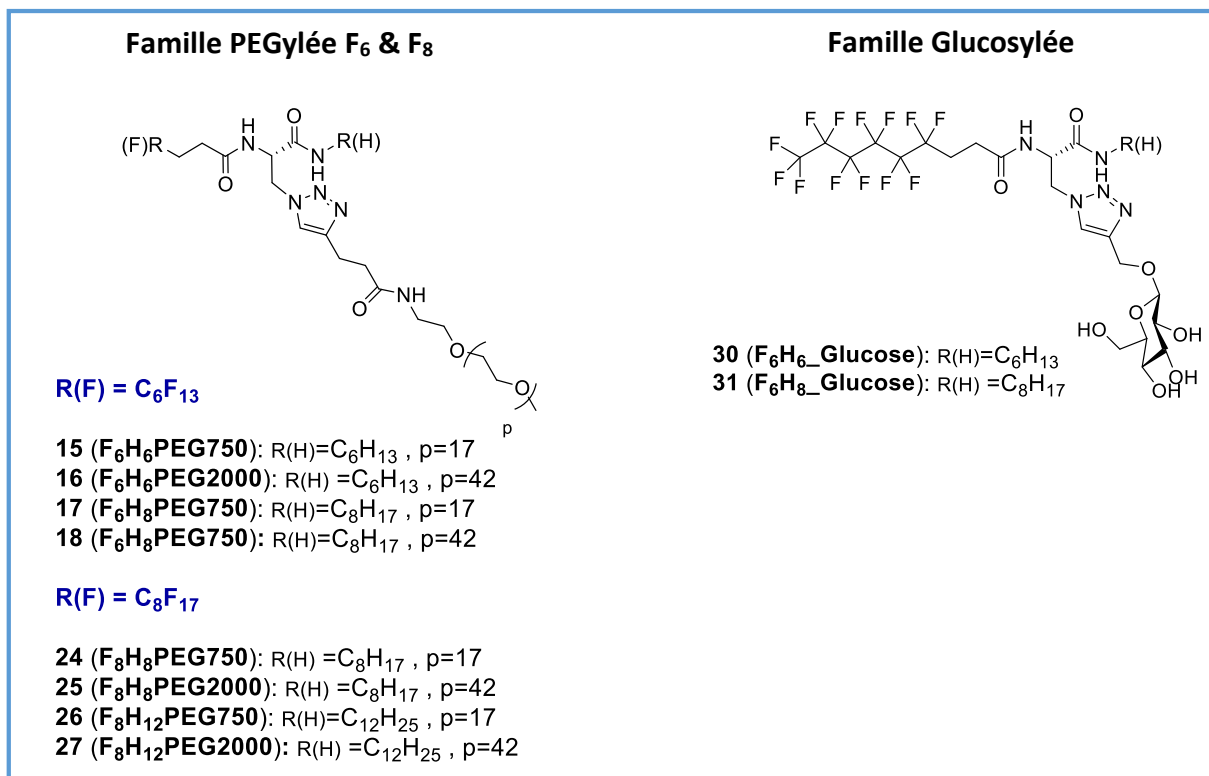


Schéma II-35. Structure chimique des 10 tensioactifs hybrides F–H finaux synthétisés.

CHAPITRE III. CARACTÉRISATION DES AGRÉGATS DE TENSIOACTIFS HYBRIDES F-H

Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude des propriétés d'auto-association des tensioactifs hybrides F–H synthétisés.

Dans un premier temps, nous avons étudié les deux séries de molécules à têtes polaires PEGylées à chaînes F_6 et F_8 . Ces composés possèdent une très bonne solubilité dans l'eau (jusqu'à 100 g/L). (*cf. Chapitre II*)

Différents paramètres d'auto-association ont été déterminés comme la concentration micellaire critique (cmc), la tension interfaciale à la cmc (γ_{cmc}) ou encore les paramètres thermodynamiques régissant la micellisation (ΔH°_{mic} , ΔG°_{mic} , $-T\Delta S^\circ_{mic}$). Ces données permettront de mieux comprendre l'impact de la longueur des chaînes hydrocarbonées et fluorocarbonées ainsi que l'impact de la nature de la tête polaire sur la dynamique d'auto-assemblage de ces tensioactifs.

Ces données seront également complétées par l'étude de la taille de ces agrégats à l'aide de techniques de diffusion statique (SLS) et dynamique (DLS) de la lumière. Ces informations ont apporté une représentation de la distribution des populations d'agrégats, et ont été corroborées avec des clichés obtenus par microscopie électronique à transmission (MET) et cryo-microscopie électronique (Cryo-ME), afin d'avoir une idée de leur forme.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur la famille de tensioactifs glucosylés. Ceux-ci ont été valorisés sous forme de vésicules, dont leurs tailles et formes ont été étudiées par DLS, MET et Cryo-ME. Afin d'entrevoir une application en systèmes de délivrance de principes actifs, une étude de stabilisation de ces vésicules dans différentes conditions de température et milieux sera explicitée à la fin de ce chapitre.

1. Etude de l'agrégation des tensioactifs hybrides F–H PEGylés

1.1 Détermination de la cmc et des paramètres thermodynamiques associés à la micellisation

Les cmc et paramètres thermodynamiques associés à la micellisation pour les séries F₆ et F₈ PEGylés ont été déterminées par trois techniques physico-chimiques à haute sensibilité (tensiométrie de surface (TS), titration calorimétrique isotherme (TCI) et spectrofluorimétrie) qui seront décrites dans ce chapitre.

1.1.1 Etude de la série F₆ PEGylée

Nous allons dans un premier temps nous focaliser sur la série F₆ des tensioactifs PEGylés.

1.1.1.1 La tensiométrie de surface (TS)

La tensiométrie de surface (TS) a été la première technique choisie pour déterminer les cmc dans l'eau des 4 tensioactifs non ioniques de la série F₆ PEGylée. La technique de mesure communément utilisée est la méthode de Wilhelmy qui permet de déterminer la force exercée sur une lame verticale de platine qui vient s'immerger à la surface de la solution étudiée. Le principe de la méthode est représenté en *Figure III-1*.

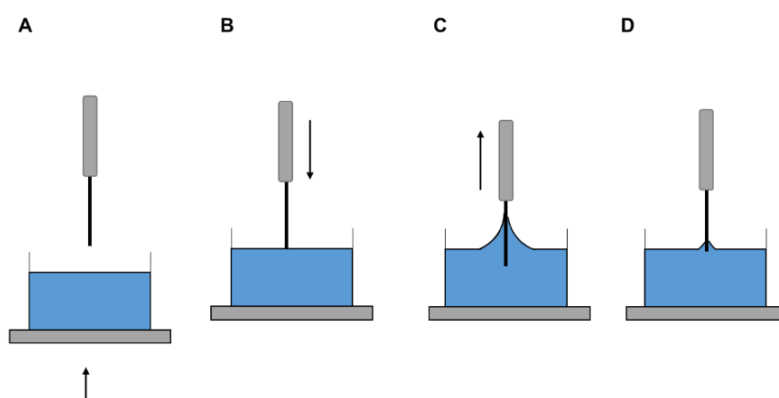


Figure III-1. Principe de la méthode de Wilhelmy.

Le support est monté jusqu'à atteindre le bas de la lame en platine (A), puis lorsque la lame de platine entre en contact avec la solution, une force exercée par la solution pousse la lame vers le haut (C) pour que la lame puisse revenir à sa position initiale (D).

Cette force exercée est proportionnelle à la tension de surface γ et au périmètre de la lame de platine selon l'équation suivante (III.1) :

$$\gamma = \frac{F}{L \cos \theta} \quad (\text{III.1})$$

Avec γ la tension superficielle en mN/m, F la force de Wilhelmy mesurée par le tensiomètre en mN, L la longueur de la surface de la lame de platine immergée en mm et θ l'angle de contact entre la surface de la lame et la tangente au plan d'immersion de la solution étudiée. L'illustration de ces grandeurs est montrée en *Figure III-2* :

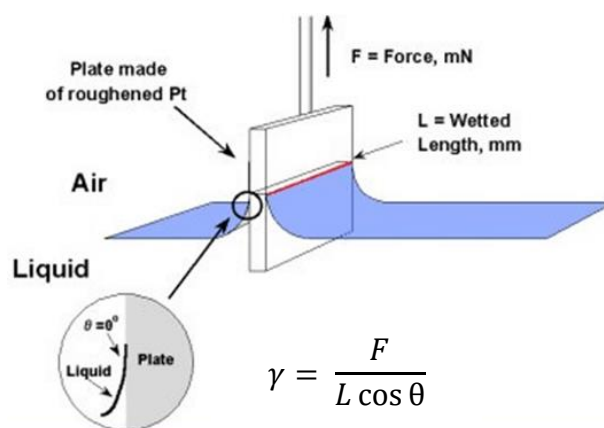


Figure III-2. Représentation de la lame de platine à l'interface air/eau en tensiométrie¹¹⁹.

Cet angle de contact doit être nul avec $\cos \theta = 1$ pour pouvoir mesurer γ . Ceci est généralement valable pour la plupart des solutions étudiées avec une lame de platine dont la surface a été préalablement préparée pour améliorer sa mouillabilité et obtenir cette condition de calcul.

Dans notre étude, γ a été mesurée pour différentes concentrations prises au-dessus et en dessous de la cmc estimée pour chaque tensioactif à 25 °C avec un tensiomètre Krüss K100. Ceci a pu être possible en partant d'un volume de solution connue à une concentration

environ $3 \times$ la cmc, où des volumes de solutions définies automatiquement sont aspirés à l'aide de dosimètres puis remplacés par les mêmes volumes d'eau pour atteindre les concentrations diluées désirées.

Les points d'acquisition sont ensuite représentés graphiquement selon l'équation d'adsorption de Gibbs¹²⁰, sous sa forme simplifiée $\gamma = f(\ln c)$. La rupture de pente observée pour chaque isotherme de γ permet de déterminer aisément la cmc du tensioactif étudié (cf. Figure III-3).

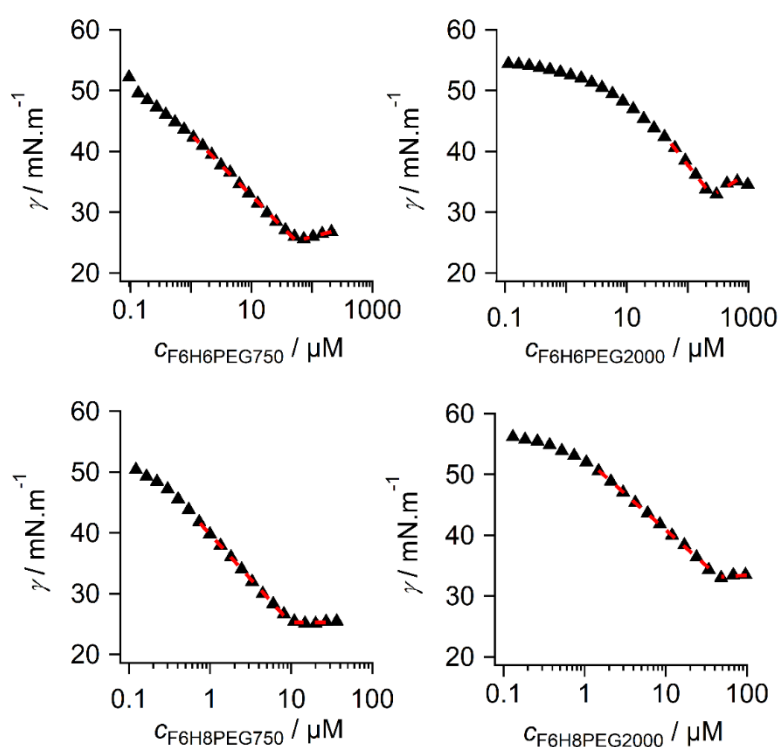


Figure III-3. Variation des tensions de surface γ en fonction du logarithme de la concentration molaire des tensioactifs F₆ PEGylées à 25°C dans l'eau.

Par la détermination de la cmc, plusieurs autres paramètres de surface peuvent être déduits tels que la tension interfaciale à la cmc γ_{cmc} (déterminée graphiquement à la cmc) et la variation de l'énergie libre de Gibbs standard à la micellisation ΔG°_{mic} selon les considérations suivantes :

Dans un système de tensioactifs à la cmc, il y a coexistence de deux systèmes. Le tensioactif (s) seul dans une phase aqueuse (aq) et le tensioactif en phase micellaire (m). Le

coefficient de répartition des fractions molaires pour la micellisation K^{mic} peut alors être calculé selon l'équation suivante (III.2) :

$$K^{\text{mic}} = \frac{X_s^{\text{m}}}{X_s^{\text{aq}}} \quad \text{(III.2)}$$

Où X_s^{aq} représente la fraction molaire du tensioactif seul en phase aqueuse, et X_s^{m} la fraction molaire du tensioactif en phase micellaire. Comme les micelles sont constituées à 100 % de monomères de tensioactif, $X_s^{\text{m}} = 1$ et à la cmc X_s^{aq} prend la forme de $X_s^{\text{aq}} = \frac{cmc}{(c_w + c_s^{\text{aq}})} = \frac{cmc}{(c_w + cmc)} \approx \frac{cmc}{55,5}$ où c_s^{aq} est la concentration en monomères de tensioactif dans la phase aqueuse et c_w la concentration molaire de l'eau égale à 55,5 M. La détermination de $\Delta G^{\circ}_{\text{mic}}$ lors de la démicellisation est définie selon l'équation suivante (III.3) :

$$\Delta G^{\circ}_{\text{mic}} = -RT \ln K_{\text{mic}} = RT \ln \frac{cmc}{55,5} \quad \text{(III.3)}$$

Avec R la constante des gaz parfaits (8,31 J.K⁻¹.mol⁻¹) et T la température.

L'équation de l'isotherme de l'adsorption de Gibbs¹²⁰ décrit les phénomènes surfaciques permettant de mieux comprendre le comportement du tensioactif utilisé à l'interface entre deux milieux (ici l'air et l'eau). Nous pouvons calculer la concentration molaire surfacique ou excès de surface Γ_{max} qui représente la saturation moléculaire par unité de surface à l'interface air-eau selon l'équation (III.4) :

$$\Gamma_{\text{max}} = - \frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln C} \quad \text{(III.4)}$$

Où $\frac{d\gamma}{d \ln C}$ correspond au coefficient de pente de la région linéaire avant rupture de la pente des isothermes $\gamma = f(\ln c)$ en Figure III-3.

De cette valeur est ensuite déduite A_{min} par l'équation (III.5):

$$A_{\text{min}} = - \frac{1}{N_A \Gamma_{\text{max}}} \quad \text{(III.5)}$$

Avec N_A la constante d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Les données issues des précédentes équations abordées (cmc ; γ_{cmc} ; $\Delta G^\circ_{\text{mic}}$; Γ_{max} et A_{min}) sont présentées dans le *Tableau III-1*.

Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG750
cmc (μM)	76 ± 6	40 ± 5	14 ± 3	6 ± 1
$\Delta G^\circ_{\text{mic}}$ (kJ/mol)	- 33,4 ± 0,2	- 35,1 ± 0,3	- 37,7 ± 0,6	- 39,7 ± 0,6
γ_{cmc} (mN/m)	31,5 ± 0,9	26,4 ± 1,5	29,2 ± 1,7	24,2 ± 2,6
$\Gamma_{\text{max}} \times 10^{-12}$ (mol/mm ²)	1,39 ± 0,07	1,66 ± 0,14	1,58 ± 0,16	1,57 ± 0,08
A_{min} (Å ²)	119 ± 6	101 ± 8	106 ± 11	105 ± 6

Tableau III-1. Données physico-chimiques obtenues par TS pour les tensioactifs F₆ PEGylées.

Les valeurs de cmc sont relativement basses et varient de 76 μM pour **F₆H₆PEG2000**, 40 μM pour **F₆H₆PEG750**, 14 μM pour **F₆H₈PEG2000** et 6 μM pour **F₆H₈PEG750**. Ceci nous amène à l'ordre suivant : **F₆H₆PEG2000** > **F₆H₆PEG750** > **F₆H₈PEG2000** > **F₆H₈PEG750**. Les valeurs de $\Delta G^\circ_{\text{mic}}$ vont également dans ce sens, de - 33,4 kJ/mol pour **F₆H₆PEG2000** jusqu'à - 39,7 kJ/mol pour **F₆H₈PEG750**, avec néanmoins une faible variation des valeurs entre les tensioactifs de la série.

Ces valeurs de cmc et $\Delta G^\circ_{\text{mic}}$ seront comparées plus en détail à celles déterminées par d'autres techniques physico-chimiques en discussion générale.

En ce qui concerne les propriétés de surface des tensioactifs, γ_{cmc} diminue avec l'augmentation de longueur de la chaîne hydrocarbonée pour une même tête polaire. Néanmoins, cette diminution générale est relativement faible entre tous les tensioactifs allant de 31,5 mN/m pour **F₆H₆PEG2000**, tensioactif le plus hydrophile, à 24,2 mN/m pour **F₆H₈PEG750**, tensioactif le plus hydrophobe. En comparant ces valeurs avec celles trouvées dans la littérature, celles-ci se rapprochent du comportement des tensioactifs fluorocarbonés

($\sim 20\text{--}30\text{ mN/m}$),⁴³ et restent inférieures à celles des tensioactifs hydrocarbonés non ioniques ($\sim 30\text{--}40\text{ mN/m}$)²⁴.

Les valeurs observées pour Γ_{\max} sont très similaires (entre $1,39$ and $1,66 \times 10^{-12}$ mol/mm²) ce qui indique un compactage similaire de la molécule à l'interface air/eau. Dans ce contexte, ni la taille de la tête polaire PEG ni la longueur de la chaîne hydrocarbonée ne semblent affecter les valeurs de Γ_{\max} . En suivant l'équation d'adsorption de Gibbs, A_{\min} a été déduite pour chaque tensioactif. Les valeurs obtenues sont assez similaires et relativement importantes (de 101 \AA^2 pour **F₆H₆PEG750** à 119 \AA^2 pour **F₆H₆PEG2000**).

1.1.1.2 La titration calorimétrique isotherme (TCI)

Nous avons ensuite utilisé la technique de titration calorimétrique isotherme (TCI) qui consiste à mesurer à l'aide d'un nanocalorimètre (cf. Figure III-4) la quantité de chaleur libérée lors du phénomène de démicellisation par ajouts successifs d'une solution micellaire injectée dans une cellule contenant de l'eau pure.

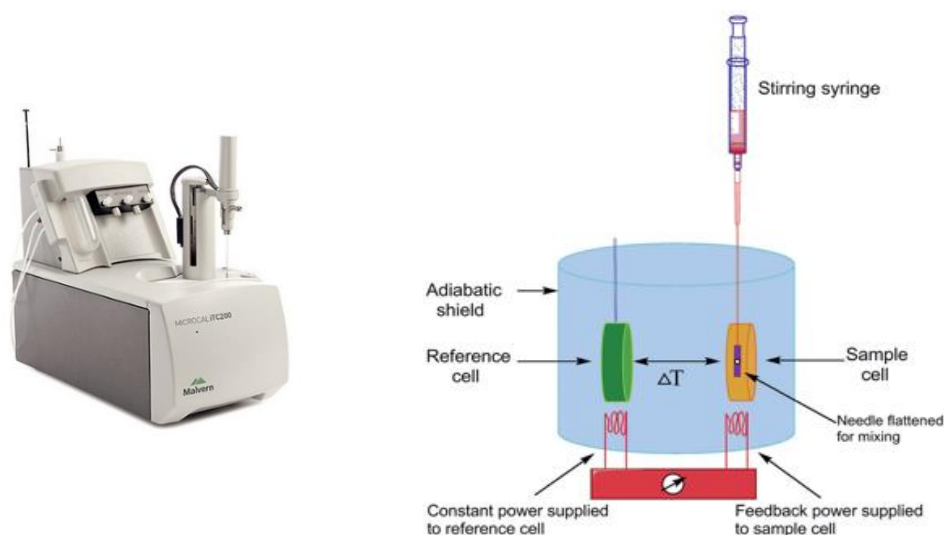


Figure III-4. Modèle d'appareil utilisé ITC200 micro-cal pour la TCI (à gauche) et son principe de fonctionnement (à droite).^{121,122}

Le nanocalorimètre est constitué de deux cellules (référence et échantillon) remplies d'eau à $25\text{ }^\circ\text{C}$ et qui sont positionnées dans une cuve adiabatique. La détection de la différence

de chaleur entre les deux cellules est déterminée par la différence de température entre les deux cellules. Lors de l'acquisition, une solution de tensioactif à une concentration environ 12 fois la cmc est injectée par petits aliquotes via une seringue dans la cellule d'échantillon.

Chaque ajout entraîne la libération de chaleur issue du phénomène de démicellisation. Pour revenir à l'équilibre initial entre les deux cellules (*i.e.* différence de température égale à 0), le nanocalorimètre compense cette chaleur libérée en retour en fournissant une puissance Δp au cours de l'acquisition. Le système délivre alors un thermogramme de démicellisation qui représente les pics de Δp relatifs à la chaleur libérée par l'ajout des différentes injections dans la cellule d'échantillon en fonction du temps.

Par la suite, ces thermogrammes ont été normalisés par le logiciel NITPIC¹²³ qui nous a permis également d'intégrer les pics de chaleur Δp en fonction de la concentration en tensioactif dans la cellule de l'échantillon. Les isothermes expérimentales obtenues ont ensuite été ajustées par la méthode des moindres carrés pour limiter les erreurs sur la mesure. Les modèles sigmoïdaux ajustés ont été directement calculés par le logiciel DSTAIN¹²⁴ et sont représentés pour chaque tensioactif de la série F₆ en Figure III-5.

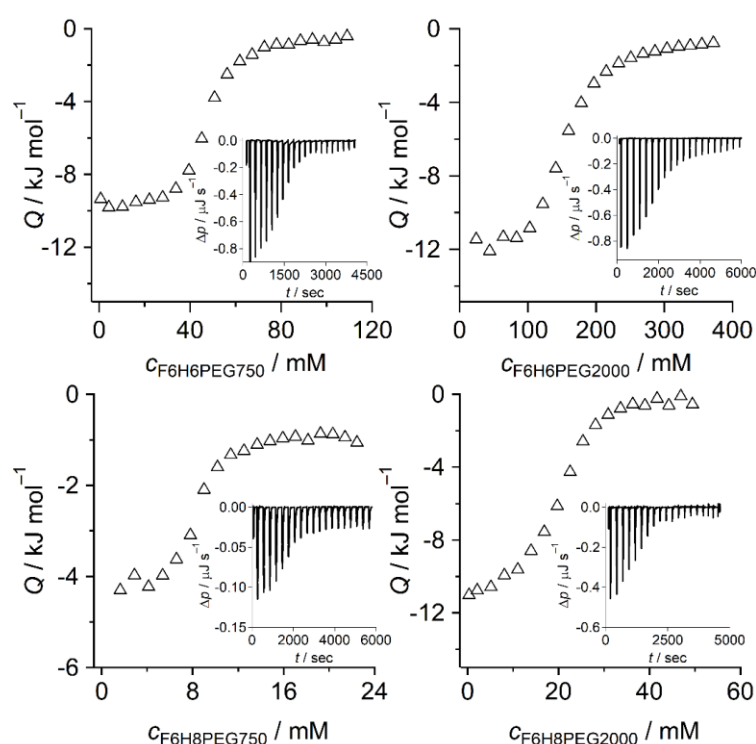


Figure III-5. Thermogrammes normalisés et isothermes obtenues par les logiciels NITPIC¹²³ et D/STAIN¹²⁴.

La différence de chaleur entre les plateaux de valeurs représentés pour chaque tensioactif permet d'en déduire la variation de l'enthalpie standard à la micellisation ΔH°_{mic} . La cmc peut également être déterminée graphiquement par la méthode des tangentes parallèles schématisée en *Figure III-6*.

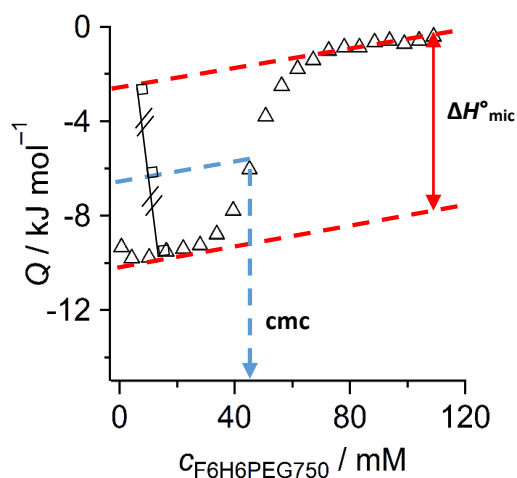


Figure III-6. Détermination graphique de la cmc et de ΔH°_{mic} pour le F₆H₆PEG750.

Dans notre cas, ces valeurs de cmc et ΔH°_{mic} ont été également obtenues automatiquement par le logiciel D/STAIN. ΔG°_{mic} a été ensuite calculé automatiquement par le logiciel selon l'équation (III.3), tout comme la contribution entropique standard à la micellisation $-T\Delta S^\circ_{mic}$, selon l'équation (III.6) de Gibbs-Helmholtz¹²⁵ :

$$-T\Delta S^\circ_{mic} = \Delta G^\circ_{mic} - \Delta H^\circ_{mic} \quad (III.6)$$

L'ensemble des données de cmc, ΔH°_{mic} , ΔG°_{mic} et $-T\Delta S^\circ_{mic}$ est répertorié dans le *Tableau III-2*.

Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG750
cmc (μM)	127 ± 12	47 ± 3	21 ± 5	8 ± 1
ΔG°_{mic} (kJ/mol)	-32,2 ± 0,1	-34,7 ± 0,1	-36,7 ± 0,2	-39,1 ± 0,1
$-T\Delta S^\circ_{mic}$ (kJ/mol)	-45,5 ± 1,5	-42,6 ± 0,9	-45,5 ± 0,5	-46,0 ± 0,1
ΔH°_{mic} (kJ/mol)	13,5 ± 1,5	7,9 ± 0,4	8,7 ± 0,7	7,2 ± 0,2

Tableau III-2. Résultats obtenus par TCI sur la série F₆ PEGylée. Les valeurs sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Les valeurs de cmc mesurées sont de 125 μM pour **F₆H₆PEG2000**, 47 μM pour **F₆H₆PEG750**, 21 μM pour **F₆H₈PEG2000** et 8 μM pour **F₆H₈PEG750**. Comme pour la tensiométrie, on remarque que la diminution de la cmc évolue de façon inversement proportionnelle à la contribution hydrophobe des tensioactifs (**F₆H₆PEG2000** > **F₆H₆PEG750** > **F₆H₈PEG2000** > **F₆H₈PEG750**).

Les valeurs de $\Delta G^{\circ}_{\text{mic}}$ vont également dans ce sens allant de – 32,2 kJ/mol pour **F₆H₆PEG2000** jusqu'à – 39,1 kJ/mol pour **F₆H₈PEG750**, avec néanmoins encore ici, une faible variation des valeurs entre les tensioactifs de la série.

Concernant les paramètres thermodynamiques (cf. *Tableau III-2*), une légère contribution positive est constatée pour $\Delta H^{\circ}_{\text{mic}}$ entre 7,2 et 8,7 kJ/mol excepté pour **F₆H₆PEG2000**, qui présente une valeur de $\Delta H^{\circ}_{\text{mic}}$ deux fois plus haute (13,5 \pm 1,5 kJ/mol), ce qui est surprenant par rapport au reste de la série. Le paramètre $-T\Delta S^{\circ}_{\text{mic}}$ a une contribution très négative (allant de – 42,6 à – 46,0 kJ/mol) et décroît lorsque l'on augmente la longueur de chaîne hydrocarbonée ce qui confirme que la micellisation est sous contrôle entropique.

1.1.1.3 La spectrofluorimétrie

Pour confirmer la gamme des cmc estimées pour les tensioactifs F₆ PEGylées, leur détermination a également été entreprise par spectrofluorimétrie en s'intéressant au spectre d'émission du Rouge Nil, un fluorophore solubilisé au sein des micelles.

L'appareil de mesure utilisé est présenté en *Figure III-7*. Il permet une acquisition en temps réel de l'intensité de fluorescence d'une molécule en solution en fonction d'une gamme de longueurs d'onde λ dans une cuve de quartz.



Figure III-7. Spectrofluorimètre utilisé pour l'acquisition.

Cette intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la concentration de la molécule en solution selon l'expression simplifiée de la loi de Beer-Lambert (III.7) valable uniquement pour les solutions diluées :

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot c \quad \text{(III.7)}$$

Où K représente une constante, I_f l'intensité fluorescente, I_0 l'intensité incidente provenant du laser et c la concentration de la molécule.

Dans notre cas, nous avons utilisé comme fluorophore lipophile, le Rouge Nil (cf. Figure III-8), qui présente la particularité d'être très faiblement fluorescent dans l'eau. Une fois incorporé dans un environnement apolaire (comme par exemple un environnement lipidique), il présente une haute intensité fluorescente avec de larges spectres d'absorption et d'émission entre 500 et 750 nm. Ainsi, on solubilise le fluorophore au sein de nos micelles PEGylés pour permettre l'acquisition de son spectre d'émission. On remarque que l'intensité maximale observée pour chaque concentration est à $\lambda_{\text{max}} = 615$ nm. L'intensité évolue avec la concentration en tensioactif dans l'échantillon.

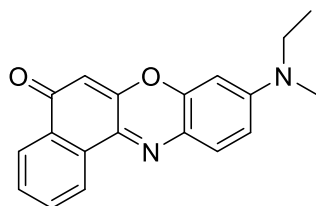


Figure III-8. Structure chimique de l'agent fluorescent « Rouge Nil ».

En effet, plus l'intensité émise du Rouge Nil est élevée, plus la concentration en Rouge Nil et donc en micelles est élevée dans la solution¹²⁶. À l'inverse, lorsque l'on observe des intensités quasi-constantes au fur et à mesure des dilutions des échantillons, cela indique qu'il n'y a plus de micelles en solution et donc que seule la faible contribution fluorescente dans l'eau du Rouge Nil émet.

La Figure III-9 représente les différentes intégrations de ces spectres d'émission du Rouge Nil solubilisé en fonction de la concentration en micelles. Cette intégration de

l'intensité en kilocoups par seconde (kcps) est ensuite rapportée en fonction du logarithme népérien de la concentration pour déterminer la cmc graphiquement à la rupture de pentes.

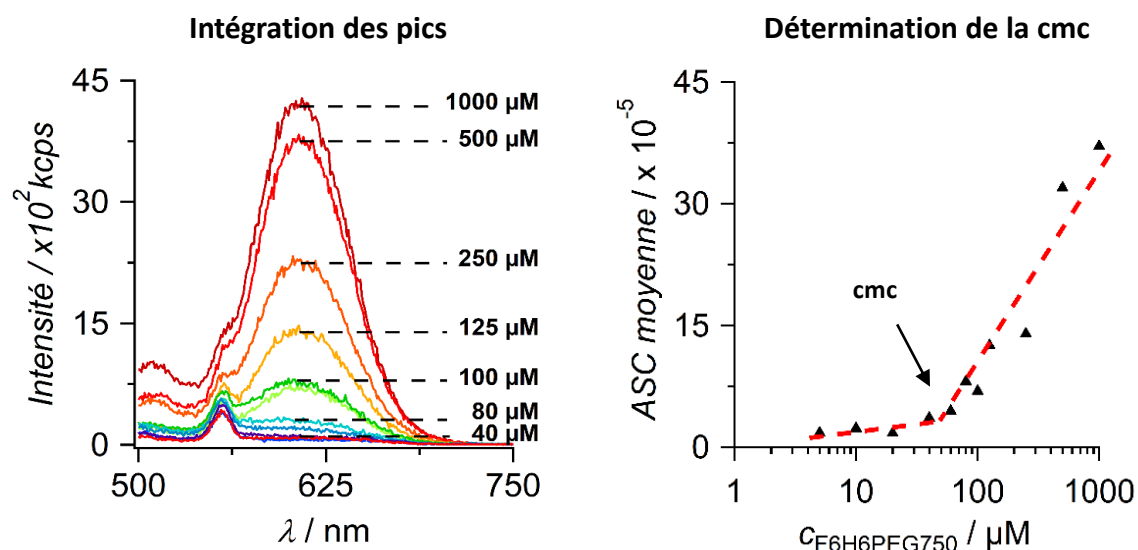


Figure III-9. Intégration de chaque spectre d'émission du Rouge Nil solubilisé dans une solution micellaire de F₆ PEGylée de concentration connue c.

La Figure III-10 montre les valeurs de cmc pour les tensioactifs de la série F₆ PEGylée.

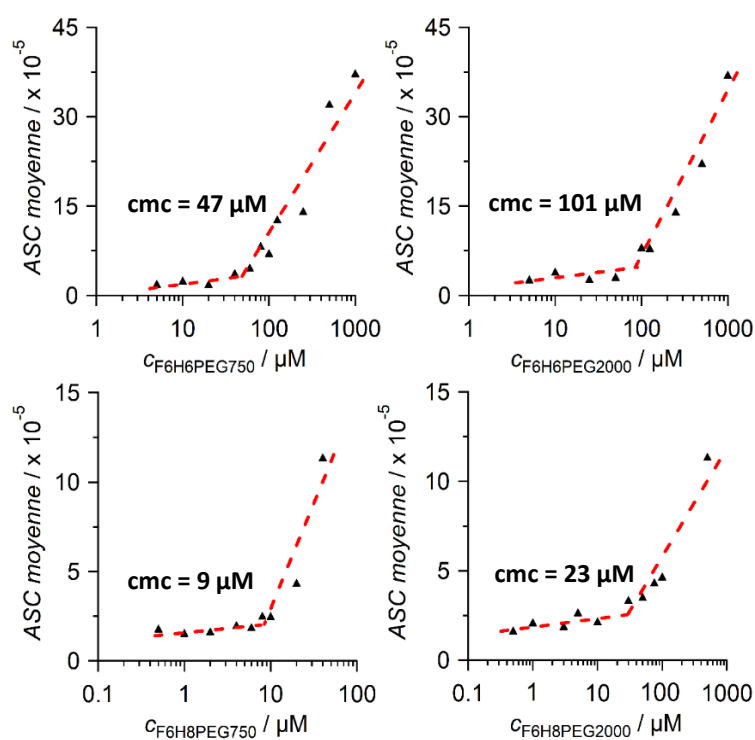


Figure III-10. Aire sous la courbe (ASC) moyenne de l'intensité fluorescente du Rouge Nil solubilisé dans les micelles F₆ PEGylées en fonction de la concentration.

1.1.1.4 Discussion générale

Les données de cmc sont pour chaque tensioactif et technique d'analyse utilisée sont visibles sur l'histogramme de la *Figure III-11*. La diminution de la cmc suit l'ordre suivant (*i.e.* **F₆H₆PEG2000** > **F₆H₈PEG2000** > **F₆H₆PEG750** > **F₆H₈PEG750**).

On peut également y remarquer une tendance pour la spectrofluorimétrie et la TCI à surestimer légèrement les valeurs de cmc comparé à la TS. Les barres d'erreurs sont assez similaires excepté pour **F₆H₆PEG2000** en TCI, où l'erreur d'incertitude sur la mesure est légèrement plus importante.

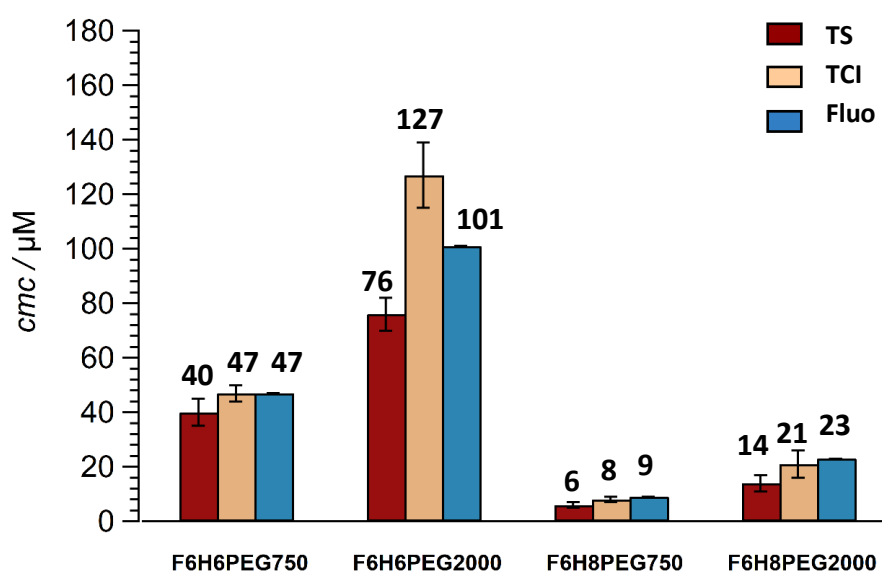


Figure III-11. Comparaison des cmc par TS, TCI et spectrofluorimétrie pour la série F₆ PEGylée. Les cmc par spectrofluorimétrie (Fluo) ont été déterminées par une seule expérience.

Ces valeurs de cmc ont été comparées à celles de tensioactifs bicaténaires perfluorés en C₉F₁₉ à tête PEG800 (nombre de motifs PEG = 20, cmc de 0,123 mM) et PEG2000 (nombre de motifs PEG=50, 0,187 mM) déjà étudiés dans la littérature (*cf. Schéma III-1*).¹²⁷

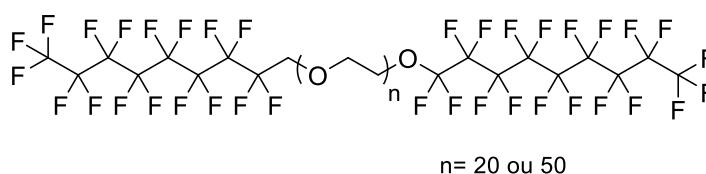


Schéma III-1. Structure des tensioactifs bicaténaires perfluorés en C₉F₁₉ avec un bloc moléculaire central composé de PEG avec différentes tailles représentées par le nombre de motifs n¹²⁷.

Nos composés présentent des cmc plus basses malgré des parties polaires similaires et une chaîne fluorée plus courte. Cela semble indiquer une additivité des contributions hydrophobes des chaînes R(H) et des chaînes R(F).

Nous avons ensuite étudié l'influence des têtes hydrophiles et longueurs de chaînes R(H)–R(F) sur les cmc de la série. Quelle que soit la taille de la tête polaire, la cmc diminue d'environ 5 et 7 fois pour une tête PEG2000 ou PEG750 respectivement, lorsque l'on ajoute deux méthylènes sur la chaîne hydrocarbonée. Parallèlement à chaînes hydrophobes fixes, la diminution de la taille de la tête polaire de PEG2000 à PEG750 (rapport 2,6) entraîne une diminution d'environ de moitié de la cmc. Ce qui explique l'ordre suivant de diminution de la cmc entre les tensioactifs : **F₆H₆PEG2000 > F₆H₈PEG2000 > F₆H₆PEG750 > F₆H₈PEG750**.

Pour le paramètre ΔG°_{mic} , les données obtenues en TS et TCI sont similaires avec des valeurs comprises entre $-32,2$ et $-39,1$ kJ/mol. Généralement, la contribution à la micellisation par unité $-CF_2$ est égale à $\sim -4,1$ kJ/mol contre $\sim -2,4$ kJ/mol par unité $-CH_2$. Il a été mis en évidence que la contribution à la micellisation d'un groupement CF_2 est égal à environ $1,5 CH_2$.²⁷ En effet, plus ΔG°_{mic} est négative, plus la micellisation sera favorisée et donc plus les cmc seront basses.¹²⁸ En calculant cette contribution hydrophobe à la micellisation par unité $-CH_2$ pour nos tensioactifs, nous obtenons les valeurs de $-2,2$ kJ/mol et $-2,3$ kJ/mol pour les dérivés PEG2000 et PEG750 respectivement.

Ces valeurs sont similaires voire légèrement plus basses que la valeur de référence pour les tensioactifs hydrocarbonés ($-2,4$ kJ/mol)¹²⁸.

En résumé, l'utilisation de ces trois techniques nous a permis de déterminer les cmc et ΔG°_{mic} de chaque tensioactif de la série F₆ et de comparer ainsi les sensibilités de détection respectives. Indépendamment, la tensiométrie a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur les propriétés de surface du tensioactif à l'interface air/eau (γ_{cmc} , Γ_{max} et A_{min}) et la TCI des compléments d'informations sur la thermodynamique de micellisation (*i.e.* $-T\Delta S^{\circ}_{mic}$, ΔH°_{mic}). Ces techniques ont également été utilisées sur la série F₈ pour comprendre l'impact de la longueur de chaîne fluorocarbonée sur les propriétés physico-chimiques des tensioactifs hybrides F–H.

1.1.2 Etude de la série F₈ PEGylée

❖ Analyses de tensiométrie sur la série F₈

Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer la cmc par TS. Nous avons tenté d'appliquer à cette série la méthode initiale qui consiste à effectuer des dilutions automatiques d'une solution micellaire du tensioactif de concentration supérieure à $3 \times$ la cmc et à mesurer γ pour chaque concentration. Cependant, nous avons été confrontés à de très fortes variations sur la mesure de chaque point, avec une stabilisation de γ bien plus lente à obtenir (au-delà d'1 h pour chaque point) que pour les tensioactifs F₆ PEGylés.

Nous avons alors utilisé la méthode dite « manuelle » qui consiste à préparer chaque concentration à étudier dans des fioles jaugées puis de mesurer la tension de surface résultante γ par le tensiomètre. Cette méthode permet de contrôler le temps nécessaire pour obtenir une stabilisation de l'interface et évite une perturbation supplémentaire liée aux dilutions automatiques de la solution au cours de l'acquisition.

La mesure moyenne de chaque point a été relevée sous condition que l'erreur standard des mesures prises de γ en fonction du temps soit égale ou inférieure à $\pm 0,5$ mN/m. La *Figure III-12* montre le temps nécessaire pour atteindre une erreur standard sur la mesure moyenne des points étudiés égale ou inférieure à $\pm 0,5$ mN/m.

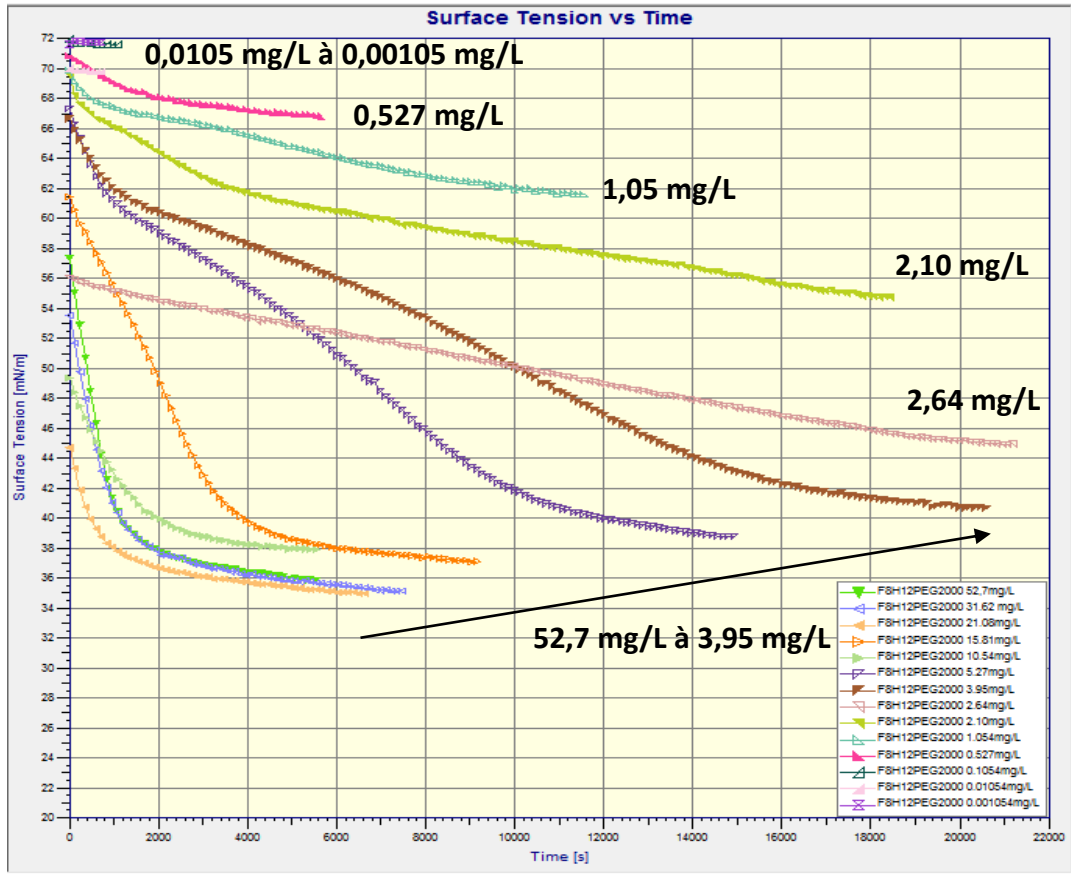


Figure III-12. Courbes de stabilisation de la tension de surface γ en fonction du temps (en secondes) pour la gamme de concentrations du tensioactif F₈H₁₂PEG2000 dans l'eau.

Nous avons l'exemple ici avec le tensioactif F₈H₁₂PEG2000 en solution micellaire. Pour chaque tensioactif, nous avons relevé des temps de stabilisation de γ d'au minimum 3–4 h pour les points les plus éloignés de la cmc et jusqu'à 10 heures d'acquisition pour les points se rapprochant de la valeur de cmc estimée.

Comme pour la série F₆, nous avons ensuite reportés graphiquement γ en fonction du logarithme népérien de la concentration pour construire les isothermes de Gibbs en Figure III-13.

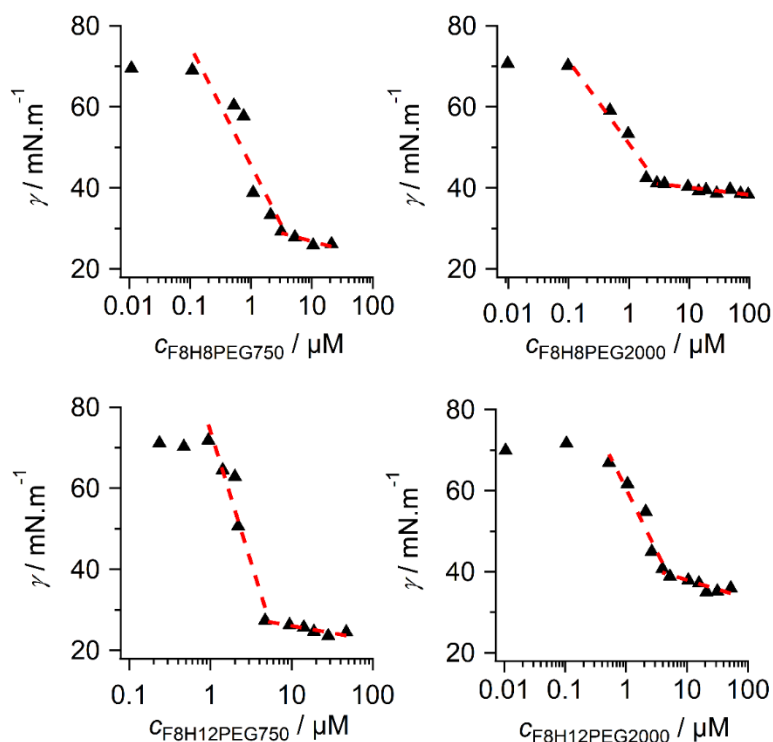


Figure III-13. Variation des tensions de surface γ en fonction du log c des tensioactifs F_8 PEGylées à 25 °C dans l'eau.

Les valeurs de cmc , γ_{cmc} et ΔG°_{mic} (cf. Tableau III-3) ont ainsi été déduites des courbes isothermes retracées pour chaque tensioactif de la série F_8 .

Tensioactifs	$F_8H_8PEG2000$	$F_8H_8PEG750$	$F_8H_{12}PEG2000$	$F_8H_{12}PEG750$
cmc (μM)	1,1	1,4	1,7	2,9
γ_{cmc} (mN/m)	41,5	29,4	40,7	26,9
ΔG°_{mic} (kJ/mol)	- 44,0	- 43,4	- 42,9	- 41,6

Tableau III-3. Comparaison des cmc , γ_{cmc} et ΔG°_{mic} obtenues avec la TS pour les tensioactifs F_8 PEGylées.

Ces cmc trouvées pour la série F_8 sont environ 2 à 6 fois plus basses que celle du dérivé le plus hydrophobe de la série F_6 , $F_6H_8PEG750$ (*i.e.* cmc de 6,5 μM en TS). Dans le cas de tensioactifs fluorés monocaténares di-glucosylés^{33,84} (cf. Schéma III-2), la cmc diminue d'environ 45 fois avec l'ajout de deux unités $-CF_2$, contrairement à 2–6 fois observées dans notre cas.

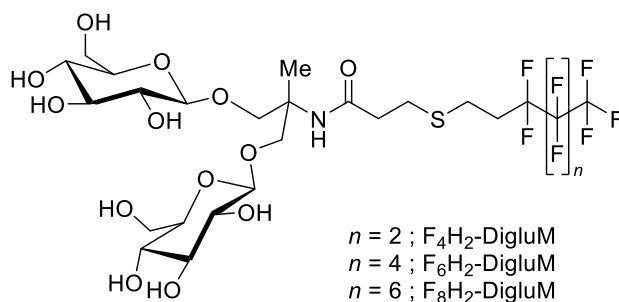


Schéma III-2. Structure des F_nH₂-DigluM synthétisés et décrits par Abla *et al.*⁸⁴ et Boussambé *et al.*³³.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le faible écart observé pour les tensioactifs hybrides F–H PEGylés synthétisés :

- La contribution hydrophile de la chaîne polaire PEG pourrait limiter la diminution de cmc occasionnée par l'ajout de deux carbones perfluorocarbonés. À titre d'exemple, le groupe de Wang *et al.* a relevé des cmcs de 4,46 mM et 0,35 mM pour leurs tensioactifs monocaténares perfluorées PEGylés avec une chaîne perfluorocarbonée en F₄ et F₆ respectivement, soit une diminution de la cmc par 12 en ajoutant deux carbones perfluorés¹²⁹.
- Les valeurs de cmc pour les tensioactifs F₈ sont tellement basses qu'elles ne peuvent être quantifiées correctement par TS. Ceci pourrait être due à une limite de sensibilité sur la mesure mais aussi à des variations de celle-ci notamment liées à l'évaporation possible de l'eau à température ambiante du fait d'un temps d'acquisition très long (supérieur à 10 h).

Nous remarquons également que les tensioactifs F₈ PEGylés conduisent à des valeurs de cmc proches (de 1,1 à 2,9 μM), et que l'ordre des valeurs de cmc n'est pas en cohérence avec celui que nous avons trouvé pour la série F₆. Pour déterminer la contribution de la chaîne F₈ sur la thermodynamique de micellisation, nous avons ensuite comparé les valeurs de ΔG°_{mic} sur la série PEGylée en fixant la longueur de chaîne hydrocarbonée et la taille de la tête polaire PEG.

Les valeurs déterminées pour la contribution d'une unité –CF₂ sont de – 3,2 kJ/mol dans le cas d'un dérivé PEG2000 (*i.e.* ΔG°_{mic} de – 37,7 et – 44,0 kJ/mol pour **F₆H₈PEG2000** et

F₈H₈PEG2000 respectivement) et de – 1,9 kJ/mol pour un dérivé PEG750 (*i.e.* de – 39,7 et – 43,4 kJ/mol pour **F₆H₈PEG750** et **F₈H₈PEG750** respectivement).

Si l'on compare ces résultats à la valeur théorique pour un tensioactif non ionique classique ($\sim 4,1\text{--}4,4$ kJ/mol), on constate qu'ils sont en désaccord avec la littérature.^{27,33}

Ces résultats sont en désaccord avec la littérature en comparant à la valeur théorique. Par manque de recul sur l'interprétation des valeurs de cmc et $\Delta G^\circ_{\text{mic}}$ de la série F₈, l'ensemble des observations précédentes nous a conduit à ne pas considérer les valeurs obtenues en TS.

- **Analyses d'ITC sur la série F₈**

En parallèle de ces analyses par TS pour la série F₈, nous avons appliqué le protocole de TCI utilisé pour la série F₆ sur ces tensioactifs.

Les analyses ont commencé avec les composés théoriquement les plus hydrophiles de la série, **F₈H₈PEG2000** et **F₈H₈PEG750**. Nous sommes partis au départ d'une concentration initiale de 15 μM et 10 μM respectivement (*cf. Figure III-14*), soit une cmc estimée à environ 1,25 μM et 0,8 μM .

L'étude des thermogrammes bruts traités par le logiciel NITPIC permettent de voir des fenêtres d'isothermes entre 0–3 μM pour **F₈H₈PEG2000** et 0–2 μM pour **F₈H₈PEG750**.

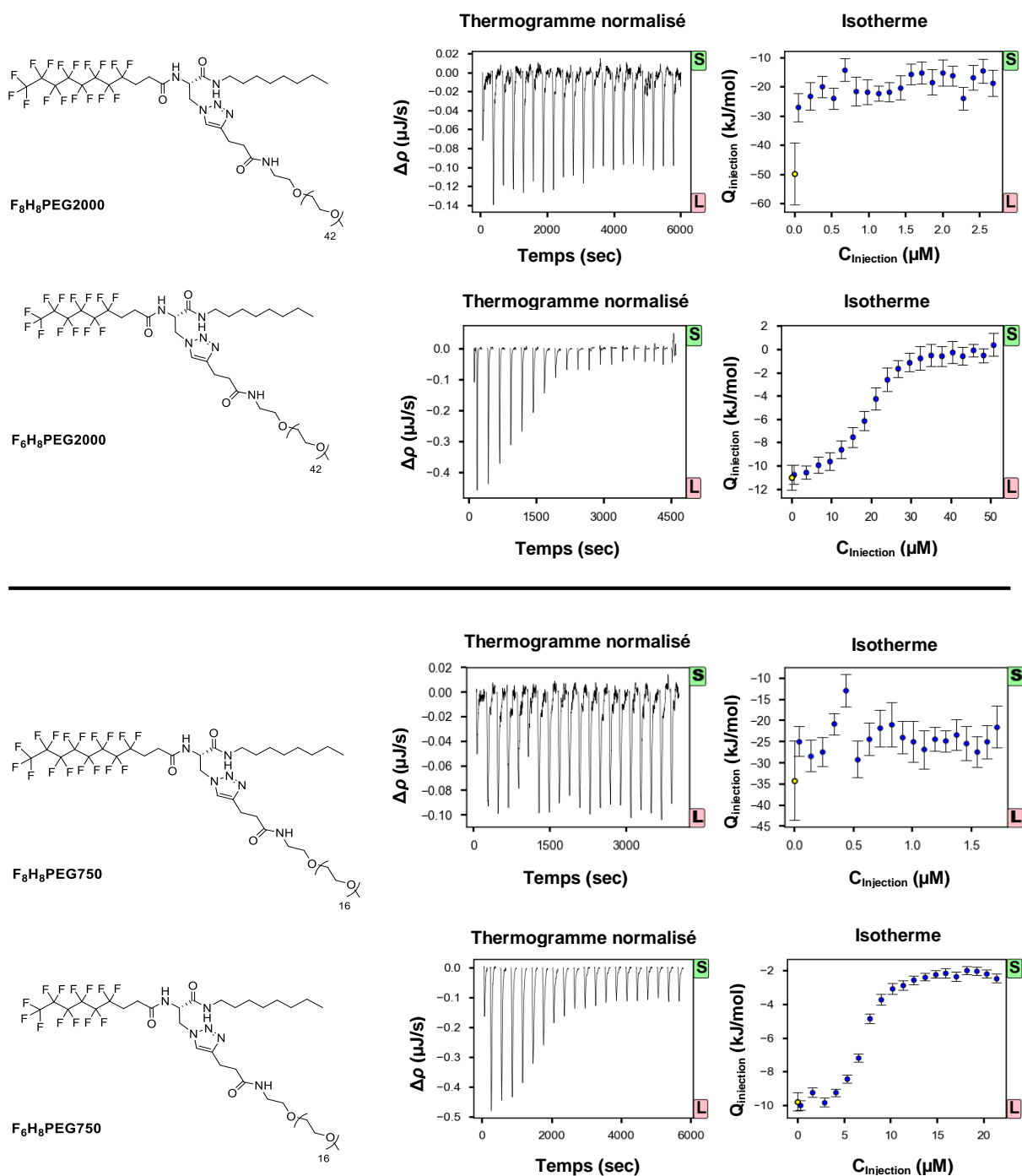


Figure III-14. Comparaison des thermogrammes bruts obtenus à 25 °C par TCI de $F_8H_8PEG2000$ et $F_8H_8PEG750$ ($\Delta\rho$ en fonction du temps (sec)) sur le logiciel NITPIC et leur isotherme ($Q_{injection}$ en fonction de la concentration à l'injection $C_{injection}$).

Globalement, les thermogrammes présentent des pics constants de quantité de chaleur à la démicellisation Q_{demic} au fur et à mesure de l'acquisition. Ceci ne nous a pas permis de détecter de variation de chaleur suffisamment significative pour pouvoir être analysée ensuite sur le logiciel DSTAIN. Si nous comparons l'allure de ces pics à ceux trouvés pour leurs analogues en F_6 (*i.e.* **F₆H₈PEG2000** et **F₆H₈PEG750**), on s'aperçoit que la quantité de chaleur par pic de démicellisation est divisée par 10 pour les tensioactifs F_8 .

Deux hypothèses peuvent être avancées :

- Soit la cmc est bien plus basse qu'estimée par TS ($< 1 \mu\text{M}$). Ce qui voudrait dire que dès la première injection de solution micellaire, la concentration dans la cuve d'échantillon reste au-dessus de la cmc après dilution du volume d'injection. Dans ce cas, la quantité de chaleur délivrée lors du phénomène de démicellisation est très faible et constante lors de l'acquisition. Il faudrait alors diminuer la concentration initiale du volume d'injection pour que la concentration en tensioactif dans la cuve après la première injection soit au-dessous de la cmc. De ce fait, on pourrait observer une variation de chaleur suffisante qui puisse être détectée par l'appareil.
- Soit la variation de Q_{demic} pour ces tensioactifs n'est pas suffisante pour pouvoir être détectée par l'appareillage. Il y aurait donc une limite de sensibilité à la détection de la mesure.

- **Analyses de spectrofluorimétrie sur la série F_8**

Nous avons ensuite procédé aux analyses en spectrofluorimétrie (*cf.* *Figure III-15*). Nous observons des cmc similaires pour les dérivés **F₈H₈PEG2000**, **F₈H₈PEG750** et **F₈H₁₂PEG2000** ($\sim 2\text{--}5 \mu\text{M}$). Le dérivé **F₈H₁₂PEG750** n'a pas pu être analysé par manque de temps. Là encore, les cmc des tensioactifs sont indiscernables entre elles et ne permettent pas de confirmer celles trouvées par TS ($\sim 1\text{--}3 \mu\text{M}$).

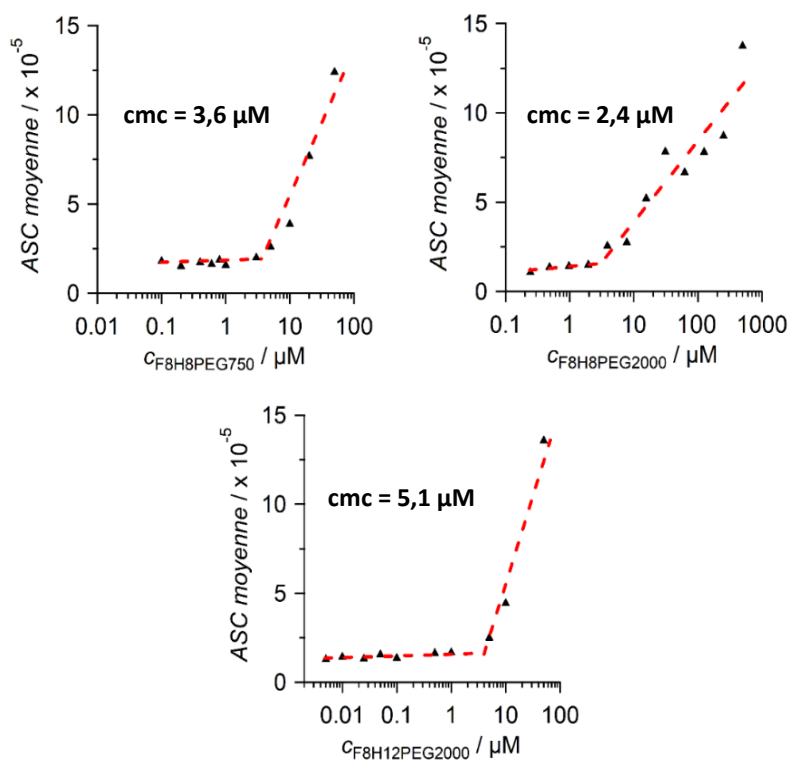


Figure III-15. Aire sous la courbe (ASC) moyenne de l'intensité fluorescente du Rouge Nil solubilisé dans les micelles F_8 PEGylées en fonction du $\ln c$ étudié.

Pour résumer l'étude de la détermination des cmc et ΔG°_{mic} de la série F_8 , nous avons relevé des valeurs de cmc similaires entre-elles, par TS et spectrofluorimétrie, et nous avons constaté que l'ordre ne correspond pas à celui observé pour la série F_6 . Nous n'avons pas pu déterminer avec certitude la valeur de ΔG°_{mic} calculée par TS compte tenu des difficultés d'analyses rencontrées en TS, TCI et spectrofluorimétrie. À ce stade, nous ne pouvons pas malheureusement tirer de conclusions sur l'étude.

Nous supposons que ces valeurs de cmc soient inférieures à $1 \mu\text{M}$ et que les différentes techniques utilisées ne permettent pas de les différencier entre-elles. Il conviendrait de s'intéresser à d'autres techniques plus sensibles pour obtenir des valeurs plus précises de cmc (*i.e.* TCI à partir d'un nanocalorimètre) et compléter le profil thermodynamique (ΔG°_{mic} , $-\Delta S^{\circ}_{mic}$ et ΔH°_{mic}) de ces tensioactifs à la micellisation.

Néanmoins, avec ces estimations de très faibles cmc , la série F_8 pourrait être intéressante dans des applications d'encapsulation de principes actifs.

1.2 Evaluation de la taille et forme des agrégats

L'étude de la distribution de tailles des agrégats a été réalisée sur tous les tensioactifs PEGylés (séries F₆ et F₈) par diffusion dynamique (DLS) et statique (SLS) de la lumière. Dans une deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur la morphologie des agrégats de la série F₈ par microscopie électronique à transmission (MET).

1.2.1 Détermination de la taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS permet d'évaluer le coefficient de diffusion D et le diamètre hydrodynamique D_H des particules dans l'échantillon. Ces valeurs sont déterminées à partir de l'analyse dynamique des fluctuations d'intensité diffusée dans toutes les directions par les particules provenant de leur mouvement Brownien¹³⁰. Le dispositif Nano ZS Zetasizer (cf. Figure III-16) émet une lumière incidente d'un laser à une longueur d'onde $\lambda=633$ nm, qui diffuse à travers une cellule de quartz de 1 mL avec à l'intérieur l'échantillon à analyser. La lumière, diffusée par les particules dans toutes les directions, est ensuite captée par un détecteur placé à un angle $\theta = 90^\circ$ ou 173° du rayon incident (cet angle dépend du modèle d'appareil utilisé). Le signal est ensuite converti par le corrélateur qui va analyser les fluctuations d'intensité à différents intervalles de temps.

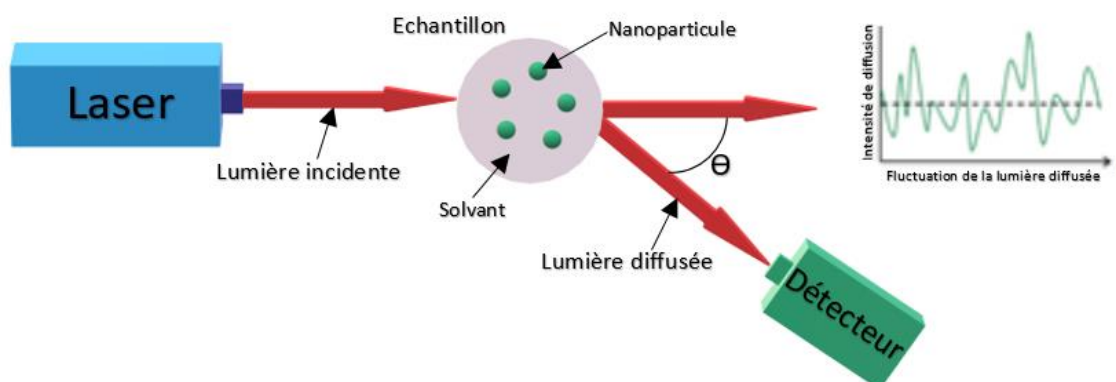


Figure III-16. Principe de fonctionnement de l'appareil de DLS.¹³¹

Les particules larges bougent plus lentement que les particules de petite taille. De ce fait, les fluctuations d'intensité enregistrées au cours du temps par l'appareil vont être plus lentes, et inversement pour les particules plus petites¹³⁰.

La fonction d'autocorrélation figurant en équation **(III.8)** permet ainsi de mesurer le degré de corrélation à très petite échelle de temps, entre deux données aléatoires d'intensité $I(t)$ avec un intervalle de temps τ au cours de l'acquisition :

$$G(t) = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt \quad \text{(III.8)}$$

La fonction est normalisée telle que $G(\infty) = 1$. En *Figure III-17*, il est montré que le délai τ nécessaire pour que la fonction de corrélation revienne à 0 est plus court pour des particules de petite taille que pour des tailles de particules plus grandes. Par la suite, le logiciel transforme ce signal en une forme exponentielle¹³² simplifiée selon l'équation **(III.9)** :

$$G(\tau) = A + B e^{-2q^2 D \tau} \quad \text{(III.9)}$$

Où τ représente cet intervalle de temps, A et B des constantes liées à la mesure par l'instrument, q le vecteur d'onde de diffusion tel que $q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ et D le coefficient de diffusion de l'équation de Stokes-Einstein¹³³ donnée par l'expression **(III.10)** :

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H} \quad \text{(III.10)}$$

Ici k représente la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du solvant. Le logiciel délivre par la suite les différentes distributions de tailles de particules en pourcentage d'intensité, de volume et nombre. Ces distributions pour chaque tensioactif des séries F₆ et F₈ en solution à 1 % massique (1 g/L) dans l'eau à 25 °C sont représentées dans la *Figure III-17*.

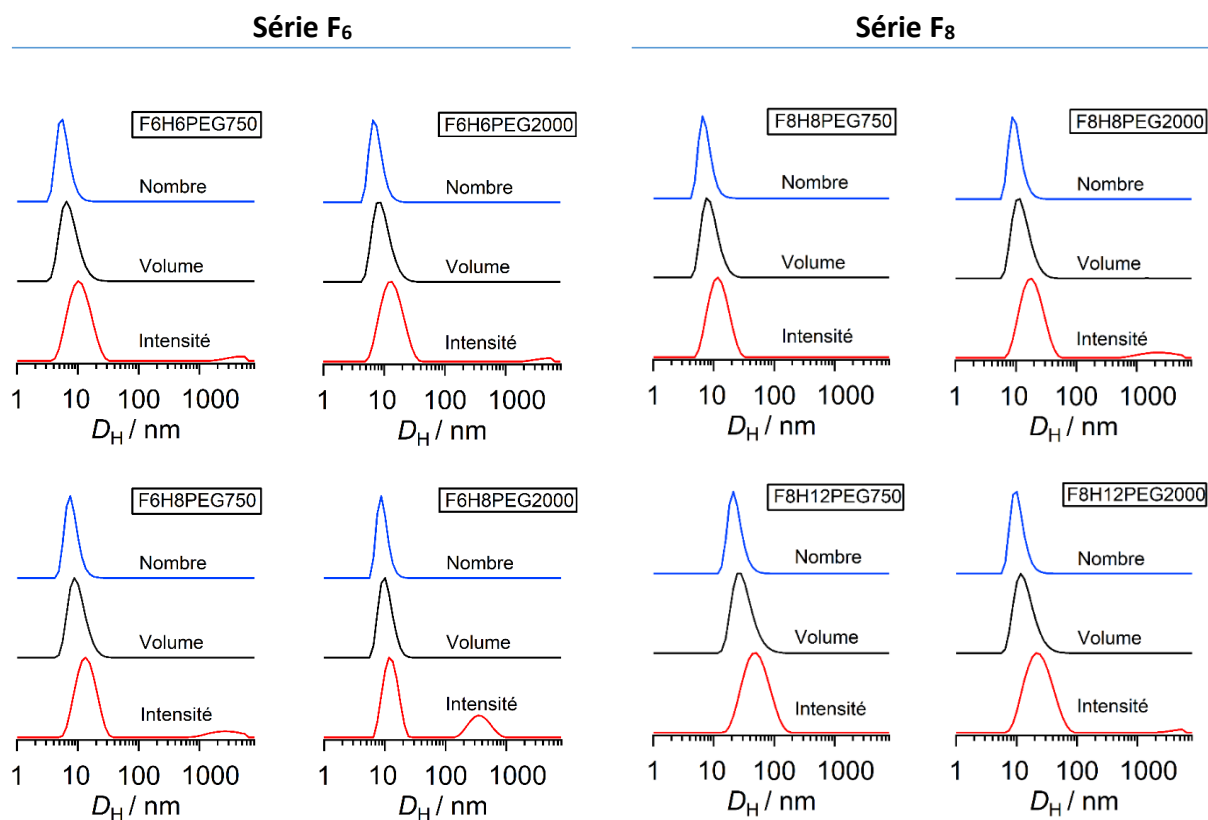


Figure III-17. Distribution des tailles de particules pour les séries F₆ et F₈ PEGylées à 1 g/L.

Pour la série F₆, on remarque que ces distributions de taille en pourcentage d'intensité, de volume et en nombre (*cf. Figure III-17*), sont similaires et présentent toutes un profil unimodal avec un pic entre 10–15 nm. Ceci semble indiquer la présence de micelles globulaires, excepté pour **F₆H₈PEG2000**, qui présente une distribution bimodale en intensité avec un second pic moyen à ~330 nm. Pour ce tensioactif, il semble y avoir une coexistence de petits agrégats avec des agrégats plus larges. Toutefois, ce second pic est négligeable en distribution en volume (0,01 % du volume de l'échantillon) par rapport au premier pic de micelles (99,9 % du volume de l'échantillon) à ~12,4 nm de diamètre moyen des micelles. En distribution en nombre, seul le pic relatif aux micelles à 8,7 nm est d'ailleurs observé.

L'approximation de Rayleigh explique que l'intensité diffusée I_a d'une particule N_a est proportionnelle à son diamètre D_a à la puissance 6 dans le cas d'une distribution en intensité¹³⁴. En prenant également en compte la théorie de Mie¹³⁵, cette intensité diffusée I_a d'une particule N_a est proportionnelle à son diamètre D_a à la puissance 3 pour une distribution en volume (en considérant le volume de la particule comme une sphère avec $\frac{4}{3}\pi R_H^3$) et à son diamètre D_a pour une distribution en nombre. Ce qui explique que les particules plus larges

diffusent beaucoup plus en intensité que les plus petites particules, mais peuvent être représentées en quantité infinitésimale dans une distribution en volume ou en nombre.

Pour la série F₈, aucune distribution bimodale n'est observée sur les profils en intensité, volume et nombre de ces tensioactifs à 1 g/L (cf. Figure III-17). Ces distributions nous confirment une similarité des D_H moyens à 1 g/L pour **F₈H₈PEG750**, **F₈H₈PEG2000** et **F₈H₁₂PEG2000** (entre ~9–14 nm en volume) contrairement à **F₈H₁₂PEG750** qui diffère (~26,7 nm en volume).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la détermination du D_H à dilution infinie (D_{H0} , valeur théorique à 0 g/L) des agrégats formés par les tensioactifs. Les profils de distribution de tailles en intensité pour chaque tensioactif ont été analysés en DLS après dilutions successives des échantillons dans l'eau de 50 g/L à 1 g/L pour la série F₆ et de 10 g/L à 1 g/L pour la série F₈. Les valeurs des D_H avec leurs barres d'erreurs respectives sont représentées en fonction de la concentration en tensioactif (cf. Figure III-18). Les mesures effectuées par l'appareil ont été répliquées au moins 3 fois pour chaque échantillon.

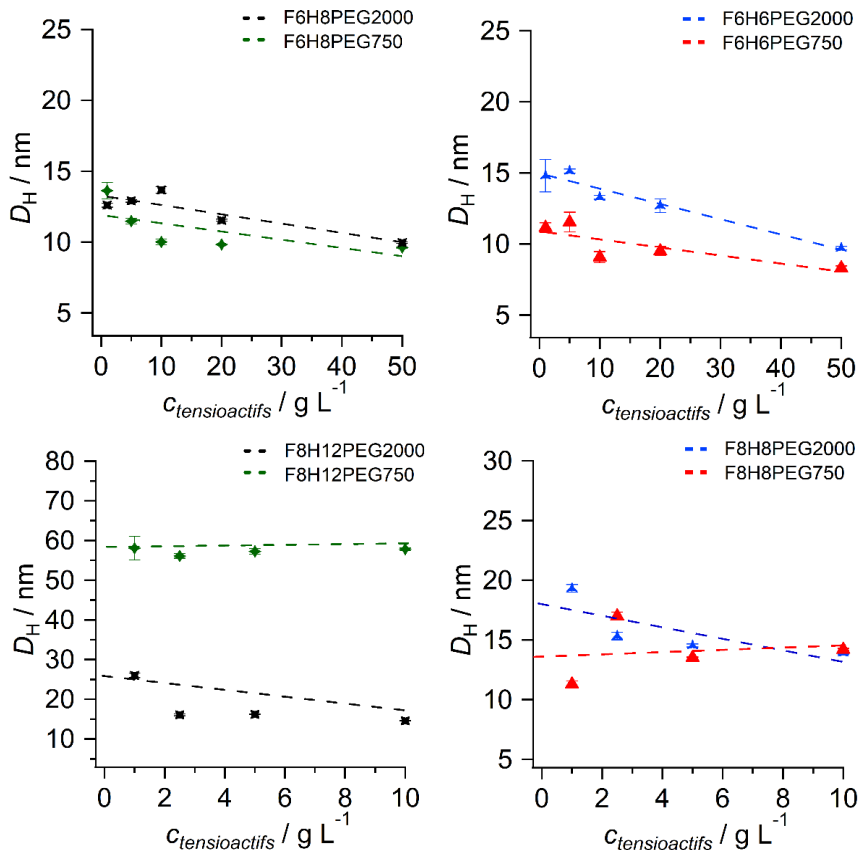


Figure III-18. Distribution des tailles de particules pour les séries F₆ et F₈ PEGylée.

On peut noter premièrement que les dilutions successives de l'échantillon dans l'eau de 50 à 1 g/L pour la série F₆ et de 10 à 1 g/L pour la série F₈ excepté pour **F₈H₈PEG750** et **F₈H₁₂PEG750**, aboutissent à une augmentation des D_H . Ceci pourrait être expliqué par la présence de 3 fonctions amides sur les molécules, qui favorisent la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. Celles-ci pénétreraient plus facilement à l'interface des parties hydrophobes/hydrophiles, augmentant le D_H des agrégats^{79,93}.

Une régression linéaire a été faite pour chaque plage de données, permettant d'extrapoler le D_{H0} à 0 g/L pour chaque tensioactif. Ces valeurs figurent dans le *Tableau III-4*.

Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG750
D_{H0} (nm)	15,0	10,9	13,3	11,9
Tensioactifs	F ₈ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₈ PEG750	F ₈ H ₁₂ PEG2000	F ₈ H ₁₂ PEG750
D_{H0} (nm)	18,0	13,6	22,6	57,1

Tableau III-4. Valeurs de D_H déterminées par l'extrapolation à 0 de la concentration en tensioactif dans l'eau.

Pour la série F₆ (cf. *Tableau III-4*), les valeurs de D_{H0} sont assez proches allant de 10 à 15 nm dans l'ordre suivant **F₆H₆PEG750** < **F₆H₈PEG750** < **F₆H₈PEG2000** < **F₆H₆PEG2000**. Concernant la série F₈, celles-ci vont de 14 à 57 nm dans cet ordre **F₈H₈PEG750** < **F₈H₈PEG2000** < **F₈H₁₂PEG2000** < **F₈H₁₂PEG750**. En particulier, le D_H de **F₈H₁₂PEG750** (57,1 nm) indique une taille d'agrégat significativement plus importante que les autres D_H de la série (de 14 à 23 nm environ). Par ailleurs, nous avons relevé plusieurs points à discuter :

- En fixant la longueur des chaînes hydrophobes quelle que soit la série, on s'aperçoit que la réduction de la tête polaire (PEG2000 à PEG750) s'accompagne d'une réduction du D_{H0} excepté pour **F₈H₁₂PEG750**.
- Lorsque l'on augmente la longueur de la chaîne fluorocarbonée (série F₆ à série F₈) à même longueur de chaîne hydrocarbonée et taille de tête polaire, les D_{H0} augmentent. Par ailleurs, cette augmentation de D_{H0} est plus marquée lorsque la chaîne

hydrocarbonée augmente de 4 $-CH_2$ pour la série F₈. Ceci pourrait être lié à l'immiscibilité des chaînes fluorocarbonées et hydrocarbonées chez les tensioactifs hybrides F–H, entraînant une ségrégation intramicellaire. L'allongement de la longueur pour une seule ou les deux chaînes hydrophobes F–H augmenterait de ce fait le volume hydrophobe total et ainsi le D_{H_0} ^{37,66}. Cette contribution est moins marquée pour la série F₆ avec l'ajout de 2 $-CH_2$ sur la chaîne hydrocarbonée et ne change pas significativement le D_{H_0} des agrégats (~10–15 nm).

1.2.2 Détermination de la taille par diffusion statique de la lumière (SLS)

Nous avons ensuite voulu confirmer ces résultats par diffusion de la lumière statique, couplée à la chromatographie par exclusion de taille (CES–SLS). Elles ont été menées dans le cadre d'une mobilité sortante du programme Perdiguier de l'Université d'Avignon en 2019 au sein du laboratoire « Molecular Biophysics » du Prof. Dr. S. Keller (Kaiserslautern, Allemagne).

Cette technique utilise un système de chromatographie en phase liquide à haute performance classique. Une colonne d'exclusion de taille est intégrée. Celle-ci est couplée à un détecteur triple constitué : d'un réfractomètre pour détecter l'indice de réfraction (IR), un détecteur à absorbance ultraviolet (UV) et un détecteur de lumière diffusée (LS) par l'échantillon élué. Le principe de fonctionnement de l'appareil est présenté en *Figure III-19*.

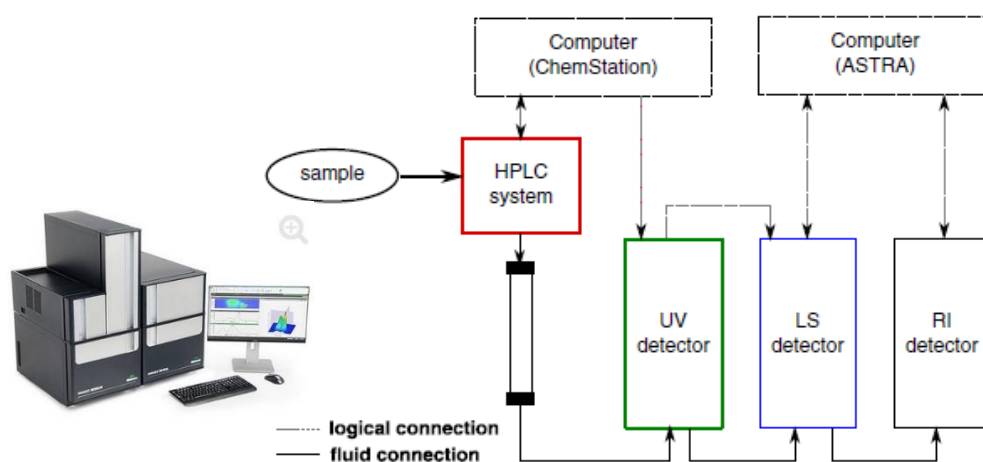


Figure III-19. Principe de fonctionnement de la technique de diffusion de la lumière statique avec le système OmniSEC schématisé par Gimpl *et al.*¹³⁶.

Un viscosimètre est également inclus pour mesurer la viscosité intrinsèque lors de l'éluion de l'échantillon. Ainsi, l'avantage de cette technique est d'analyser chaque entité de l'échantillon séparément au cours d'une même expérience. Il est possible par la suite de déterminer la masse molaire en poids M_w de chaque entité au sein du même échantillon à partir du logiciel OMNIséc (Malvern) couplé à l'appareil. Il effectue les calculs automatiquement *via* la relation générale de Zimm^{137,138} qui régit les lois de diffusion statique de la lumière selon l'équation **(III.11)** :

$$\begin{aligned} \Delta R_{\theta} &= \Delta R_{\theta, \text{échantillon}} - \Delta R_{\theta, \text{solvant}} \\ \Delta R_{\theta} &= Kc \left(M_w P_{\theta} + \frac{1}{2A_2 c} + \dots \right) \end{aligned} \quad \text{(III.11)}$$

Où : ΔR_{θ} représente la variation du ratio de Rayleigh, qui est la différence des signaux de diffusion de la lumière (LS) entre l'échantillon et le solvant d'éluion ; K une constante optique dépendante de l'indice d'incrément $\partial n/\partial c$ déterminé expérimentalement ; c la concentration effective des particules en solution ; P_{θ} le facteur de forme qui représente la dépendance angulaire de l'intensité diffusée et A_2 le second coefficient du Viriel, qui tient compte des interactions interparticulaires dans l'échantillon.

Les échantillons injectés dans le système sont dilués et les mesures d'intensité peuvent se faire à de petits angles, ce qui nous permet de négliger le terme A_2 et de considérer $P_{\theta} = 1$. La relation de Zimm peut alors être approximée selon la relation **(III.12)** de Rayleigh¹³⁶ pour des petites particules donc le diamètre est inférieur ou égal à $\frac{\lambda}{20}$ dans un système dilué:

$$\Delta R_{\theta} = \Delta R_{\theta, \text{échantillon}} - \Delta R_{\theta, \text{solvant}} \approx KM_w c \quad \text{(III.12)}$$

Avec K la constante optique déterminée automatiquement par l'appareil selon l'équation **(III.13)** :

$$K = \frac{4 \pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2}{N_A \lambda^4} \quad \text{(III.13)}$$

Où n_0 , $\frac{\partial n}{\partial c}$, N_A et λ représentent respectivement l'indice de réfraction du solvant, l'incrément de l'indice de réfraction de l'échantillon calculé indépendamment par l'utilisateur (et intégré dans la méthode de calcul du logiciel), la constante d'Avogadro et la longueur d'onde utilisée lors de l'acquisition.

Une fois la valeur de M_w déterminée pour les particules en solution, dans le cas de solutions micellaires, il est possible de calculer le rayon hydrodynamique R_H de la particule selon l'équation **(III.14)** d'Einstein-Simha¹³⁹:

$$M_w/IV_w = \frac{5}{2} N_A V_H \quad \text{(III.14)}$$

Où IV_w est la viscosité intrinsèque au pic d'élution de l'échantillon et V_H le volume hydrodynamique, considéré ici comme $V_H = \frac{4}{3}\pi R_H^3$ pour des micelles sphériques.

Par ailleurs, il est également possible à partir des valeurs M_w , calculées par l'appareil, de déterminer le nombre d'agrégation N . Ce nombre est calculé à partir de l'équation suivante **(III.15)** :

$$N = \frac{M_w}{\overline{M_w}} \quad \text{(III.15)}$$

Où $\overline{M_w}$ représente la masse molaire moyenne en poids pour un monomère de tensioactif. Cette valeur a été au préalable déterminée par la spectrométrie de masse Maldi-TOF pour chaque tensioactif (*cf. Chapitre II ; Matériel et Méthodes*).

Les profils d'élution des séries F₆ et F₈ PEGylées sont montrés respectivement en *Figures III-20 et III-21*. Les signaux acquis en détection triple (excès RI, LS et UV) sont représentés graphiquement en fonction du volume élué en chromatographie d'exclusion stérique. Pour les deux séries, on observe deux pics d'élution pour chaque tensioactif aux alentours de ~8,7 et 14,5 mL. Ces pics pourraient être attribués à la lumière diffusée par les micelles pour le premier, puis au tensioactif sous forme monomérique, pour le second.

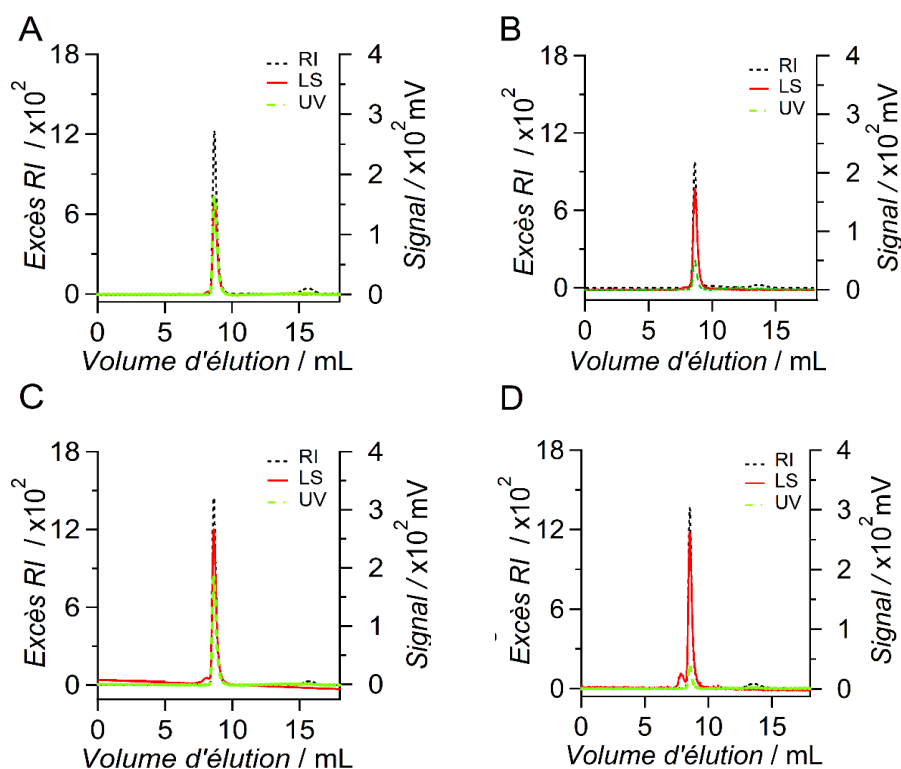


Figure III-20. Profils d'élution en CES–SLS par détection triple pour la série F₆. (A) F₆H₆PEG750 ; (B) F₆H₆PEG2000 ; (C) F₆H₈PEG750 et (D) F₆H₈PEG2000

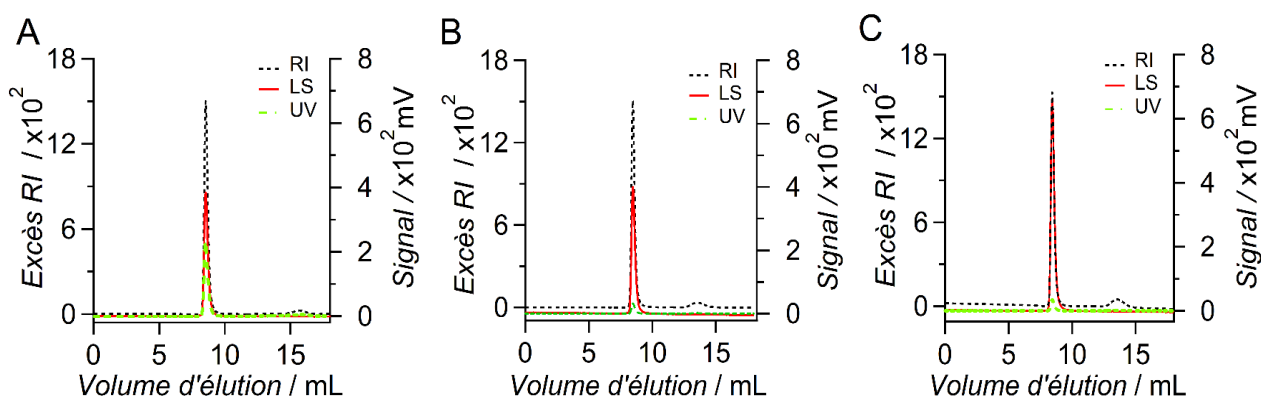


Figure III-21. Profils d'élution en CES–SLS par détection triple pour la série F₈. (A) F₈H₈PEG750 ; (B) F₈H₈PEG2000 et (C) F₈H₁₂PEG2000.

Pour la série F₈ PEGylée, les dérivés PEG750 ont été testés dans un premier temps à une concentration de 5 mM. Malheureusement, l'intensité du signal diffusé pour le tensioactif **F₈H₁₂PEG750** a saturé le détecteur de l'appareil, ce qui ne nous a pas permis d'obtenir les

valeurs de M_w et de D_H associées. Nous avons donc diminué par deux les concentrations injectées pour ce tensioactif et pour les dérivés PEG2000 pour obtenir les profils CES–SLS.

Toutefois, ces nouveaux essais de CES–SLS sur le dérivé **F₈H₁₂PEG750** n’ont pas été concluants. Nous avons changé de lot de synthèse et vérifié l’absence d’impuretés dans les lots testés. Malheureusement le signal de diffusion de la lumière sature le récepteur qui s’est retrouvé saturé tout au long de l’élution. Le composé semble « s’accrocher » sur la colonne d’exclusion stérique pendant l’acquisition ce qui pourrait être dû à son fort caractère hydrophobe.

Par ces profils d’élution, les valeurs de M_w et des rayons hydrodynamiques R_H ont été obtenues pour tous les composés via le logiciel de l’appareil de CES–SLS (cf. Figure III-22).

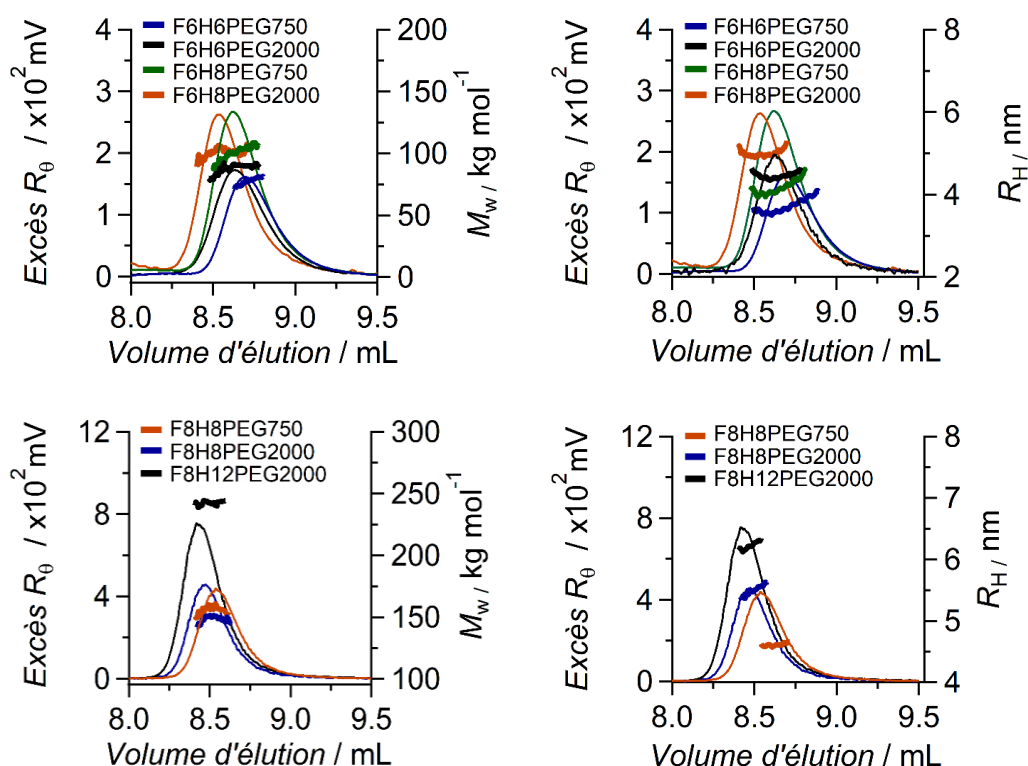


Figure III-22. Signaux LS (Excès R_θ), M_w et R_H en fonction du volume d’élution pour les séries F₆ et F₈. Les valeurs de M_w et R_H représentées en fonction du volume d’élution sont issues de la dérivée du signal LS.

Toutes les données recueillies en CES–SLS pour chaque tensioactif des séries F₆ et F₈ figurent dans le *Tableau III-5* :

Chapitre III – Caractérisation des agrégats de tensioactifs hybrides F–H

Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG750
Volume d'élution (mL)	8,63	8,69	8,53	8,62
∂n/∂c (mL/g)	0,116	0,106	0,121	0,114
IV_w (dL/g)	0,07 ± 0,01	0,048 ± 0,001	0,087 ± 0,001	0,053 ± 0,002
M_w (kDa)	90,0 ± 1,5	77,7 ± 0,6	102,3 ± 0,1	104,3 ± 0,9
D_H (nm)	9,31 (à 6,6 g/L)	7,76 (à 7,2 g/L)	10,34 (à 6,5 g/L)	8,78 (at 7,4 g/L)
M_w monomère (Da)	2600,0	1496,2	2609,7	1524,4
Tensioactifs	F ₈ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₈ PEG750	F ₈ H ₁₂ PEG2000	F ₈ H ₁₂ PEG750
Volume d'élution (mL)	8,46	8,54	8,43	ND
∂n/∂c (mL/g)	0,116	0,104	0,116	ND
IV_w (dL/g)	0,080 ± 0,01	0,045 ± 0,04	0,075 ± 0,01	ND
M_w (kDa)	141,8 ± 1,5	149,9 ± 0,9	231,8 ± 0,8	ND
D_H (nm)	11,20 (à 6,8 g/L)	9,46 (à 7,88 g/L)	12,94 (à 7,04 g/L)	ND
M_w monomère (Da)	2717,7	1598,9	2785,7	1583,4

Tableau III-5. Valeurs obtenues en CES-SLS pour les séries F₆ et F₈. Les valeurs sont la moyenne de deux expériences indépendantes. *ND* signifie que les données ne sont pas disponibles.

Les nombres d'agrégation *N* ont ensuite été calculés par l'équation (III.15) et sont reportés dans le Tableau III-6.

Série PEG750				
Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG750	F ₈ H ₈ PEG750	F ₈ H ₁₂ PEG750
<i>N</i>	52	69	94	ND
Série PEG2000				
Tensioactifs	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₁₂ PEG2000
<i>N</i>	35	37	52	83

Tableau III-6. Comparaison des *N* pour les dérivés PEG750 et PEG2000 des tensioactifs hybrides F–H PEGylés.

Pour la série F₆, les *N* ont été trouvés à 35 pour **F₆H₆PEG2000**, à 52 pour **F₆H₆PEG750**, à 69 pour **F₆H₈PEG750**, et à 37 pour **F₆H₈PEG2000**. Pour la série F₈, les *N* trouvés sont de 52 pour **F₈H₈PEG2000**, 94 pour **F₈H₈PEG750** et de 83 pour **F₈H₁₂PEG2000**. On remarque que *N* augmente avec l'augmentation de la longueur de chaîne hydrocarbonée.

Ces résultats sont en accord avec les valeurs de tensioactifs hybrides F–H rapportés dans la littérature¹⁴⁰. L'augmentation de la longueur de chaîne hydrocarbonée R(H) (3, 5 ou 7 carbones hydrogénés) pour une chaîne fluorocarbonée R(F) fixe de 4 ou 6 carbones perfluorés et une même tête polaire, fait également augmenter *N* (cf. Schéma III-3).

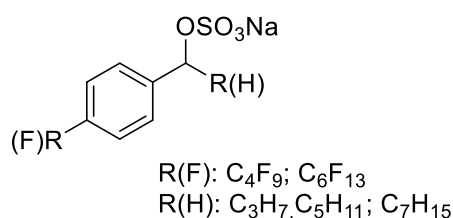


Schéma III-3. Structure chimique des tensioactifs hybrides F–H à tête sulfonate rapportés par Yoshino et al.^{40,44,140}.

L'influence de la taille de la tête polaire sur le nombre d'agrégation a aussi été vérifiée avec une diminution significative de 69 à 37 entre **F₆H₈PEG750** et **F₆H₈PEG2000**, du fait de l'encombrement stérique plus important pour la tête PEG2000 (cf. Schéma III-4). Cet effet est également observable pour les tensioactifs de la série F₈ (**F₈H₈PEG750** et **F₈H₈PEG2000**).

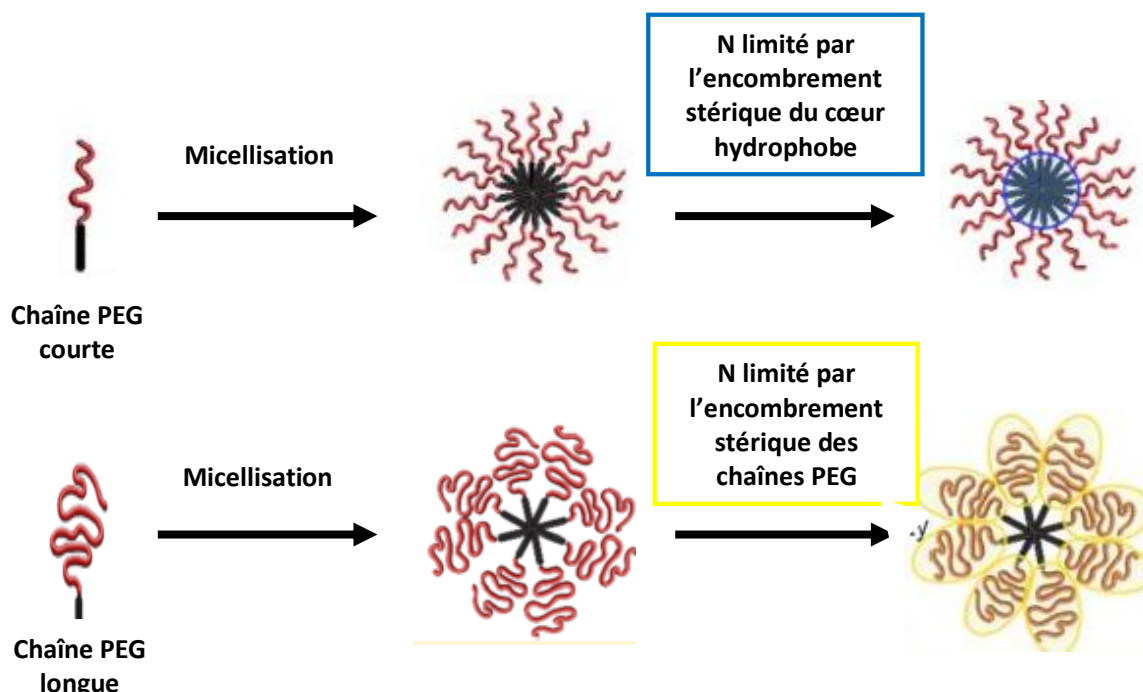


Schéma III-4. Structure de micelles avec une tête polaire PEG dans le cas d'une courte chaîne PEG ou d'une longue chaîne PEG schématisée par Vuorte *et al.*¹⁴¹.

Pour comparer la taille des agrégats par les deux méthodes de diffusion de la lumière (*i.e.* DLS et CES-SLS), les valeurs de D_H en DLS pour tous les tensioactifs, ont été recalculées aux concentrations étudiées en CES-SLS, via l'équation de la régression linéaire de la *Figure III-18*. Excepté pour **F₈H₁₂PEG750** qui ne peut être comparé.

Les concentrations utilisées pour les dérivés PEG750 sont de 7,2 g/L ; 7,4 g/L et 7,9 g/L pour les chaînes hydrophobes F₆H₆, F₆H₈ et F₈H₈ respectivement. Pour les dérivés PEG2000, elles sont à 6,6 g/L ; 6,5 g/L ; 6,8 g/L et 7,1 g/L pour les chaînes hydrophobes F₆H₆, F₆H₈, F₈H₈ et F₈H₁₂ respectivement (*cf. Figure III-23*).

Dans l'ensemble, les techniques de diffusion de la lumière nous ont permis d'avoir une idée plus claire de N et de la taille des agrégats PEGylés, avec des valeurs comprises entre 8 et 23 nm. Si l'on se focalise uniquement sur les D_H déterminés en CES-SLS et ceux recalculés en DLS, à même concentration, l'écart se resserre entre 8 et 16 nm.

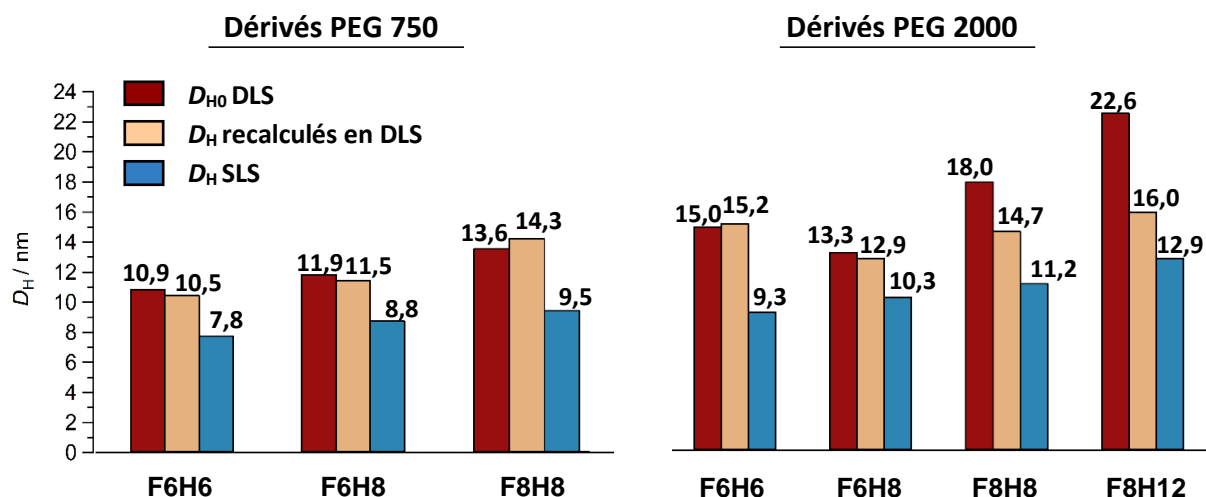


Figure III-23. Représentation des D_{H0} et comparaison des D_H moyens en DLS (recalculés) et CES-SLS pour les dérivés PEG750 et PEG2000 des tensioactifs hybrides F–H PEGylés. Les concentrations utilisées pour les dérivés PEG750 sont respectivement de 7,2 g/L ; 7,4 g/L et 7,9 g/L pour les chaînes hydrophobes F₆H₆, F₆H₈ et F₈H₈. Pour les dérivés PEG2000, elles sont respectivement de 6,6 g/L ; 6,5 g/L ; 6,8 g/L et 7,1 g/L pour les chaînes hydrophobes F₆H₆, F₆H₈, F₈H₈ et F₈H₁₂.

On observe également que la méthode de CES-SLS a une tendance à diminuer les valeurs de D_H . Quel que soit le tensioactif étudié en CES-SLS de la Figure III-23, plus les longueurs de chaînes hydrophobes augmentent à même tête polaire, plus D_H augmente très légèrement (~ 1 nm). Inversement, en augmentant la taille de la tête polaire à même partie hydrophobe, les D_H augmentent d'environ 2 nm.

Nous suggérons comme hypothèse la présence probable de micelles globulaires larges pour les D_H d'agrégats entre 8 et 16 nm (série F₆, F₈H₈PEG750, F₈H₈PEG2000 et F₈H₁₂PEG2000).

En revanche, nous nous sommes interrogés sur la différence significative de D_{H0} à 57 nm pour F₈H₁₂PEG750 et l'impossibilité de l'étudier en CES-SLS. Par la suite, la forme effective des agrégats de la série F₈ a été étudiée par MET et Cryo-ME en section 1.2.3.

1.2.3 Etude de la série F₈ par imagerie électronique à transmission (MET)

Les images MET ont été réalisées sur les tensioactifs de la série F₈ PEGylée à 0,1 g/L par nos collaborateurs de l'Université Martin Luther de Halle-Wittenberg en Allemagne, au

laboratoire du Dr. Annette Meister (Equipe ZIK HALOmem & Institut de Biochimie et Biotechnologie).

1.2.3.1 Principe de la technique MET

La MET, à coloration négative, est une technique utilisée pour déterminer la morphologie des agrégats en solution aqueuse. Cette technique, consiste à placer l'échantillon sous un faisceau d'électrons diffractés, par un système de lentilles dans la colonne microscopique, depuis le faisceau incident électronique. Les électrons transmis sont ensuite projetés sur une caméra qui enregistre l'image résultante (cf. Figure III-24)¹⁴².

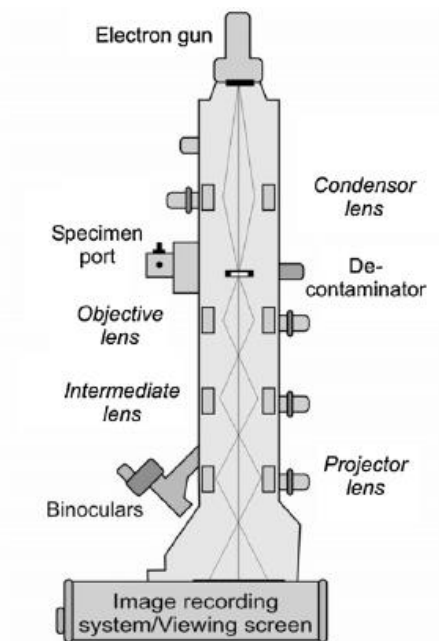


Figure III-24. Représentation schématique d'un microscope électronique à transmission¹⁴².

La mesure de la densité électronique peut aboutir à des différences d'absorptions d'électrons sur certaines zones de l'échantillon, qui créent le contraste sur l'image. Lorsque la variation de densité électronique est faible, pour pouvoir être détectée, on utilise un agent de contraste. Généralement, des métaux lourds sont utilisés comme agent de contraste pour traiter l'échantillon, déposé sur des grilles de cuivre carbonaté. Cet agent de contraste va ensuite interagir préférentiellement avec les électrons pour augmenter le contraste nécessaire sur l'image¹⁴³. Ici l'agent de contraste utilisé est l'acétate d'uranyle (AU) aqueux.

L'échantillon est ensuite séché pendant au moins 24 h avant d'être visualisé au microscope électronique (*cf. Figure III-25*).

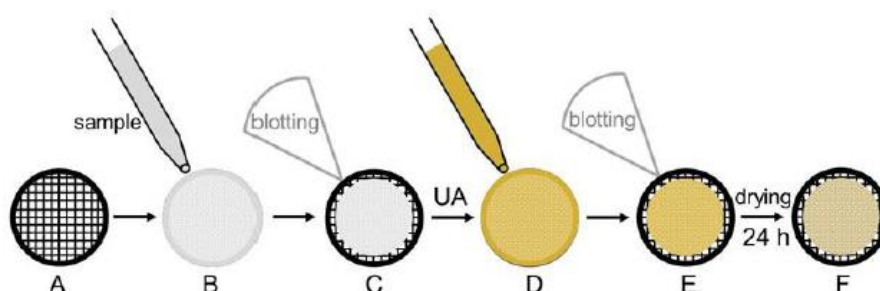


Figure III-25. Représentation schématique de la technique de coloration négative (A) les grilles de cuivre avec le film Formvar (B) Application de l'échantillon (C) L'excès d'échantillon est enlevé au papier filtre (*blotting*) (D) Application de l'agent de contraste UA (E) Etape de *blotting* (F) Séchage¹⁴³.

Lors de la visualisation, l'augmentation de la résolution de l'image est proportionnelle à l'augmentation de la tension d'accélération des électrons. Cependant, cela a pour effet de diminuer la longueur d'onde électronique et par conséquent le contraste sur l'image. Généralement, la tension d'accélération se trouve dans une gamme allant de 80 à 200 kV.

L'inconvénient de l'utilisation de cette technique, est que le séchage et la coloration peuvent perturber l'organisation réelle des agrégats de l'échantillon en les orientant et les écrasant uniformément sur les grilles de cuivre ; ce qui rend difficile l'interprétation morphologique des images. Par exemple, les vésicules lipidiques pourraient ne pas rester sphériques à cause de l'évaporation de l'eau et pourraient être confondu avec des structures d'agrégats de tensioactif en forme de disque¹⁴².

Pour s'affranchir de cette contrainte et stabiliser les formes d'agrégats, les échantillons peuvent être congelés et visualisés à basse température par la technique de Cryo-ME, qui préservera les agrégats dans une couche de glace amorphe. Cependant, si l'accès à l'appareillage Cryo-ME est limité, l'usage de la MET est plus répandue et les appareillages plus accessibles, ce qui permet de faire des tests préliminaires dans un premier temps sur les tensioactifs PEGylés de la série F₈. La Cryo-ME sera uniquement abordée en *section 2.1.2* sur les tensioactifs glycosylés.

1.2.3.2 Interprétation des résultats

La Figure III-26 résume les structures visualisées pour chaque tensioactif de la série F₈ à 0,1 g/L.

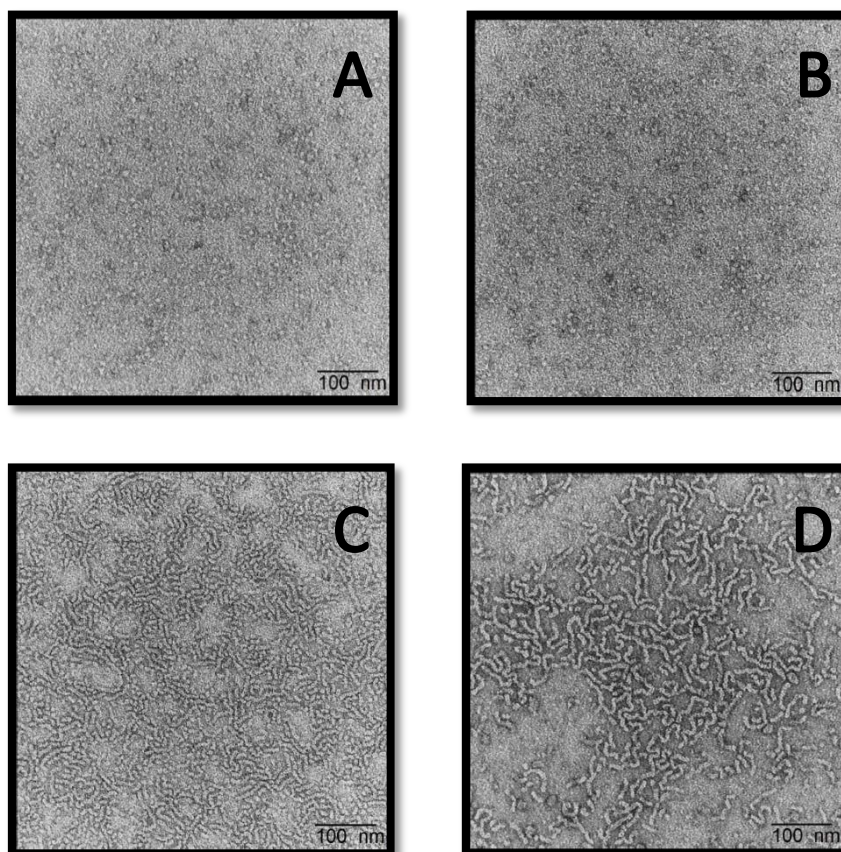


Figure III-26. Comparaison des images MET des agrégats formés par la série F₈ avec (A) F₈H₈PEG2000 ; (B) F₈H₁₂PEG2000 ; (C) F₈H₈PEG750 et (D) F₈H₁₂PEG750.

L'observation de petits objets sphériques dans le cas de **F₈H₈PEG2000** et **F₈H₁₂PEG2000** (cf. Figure III-26-A&B) à 0,1 g/L souligne que les dérivés PEG2000 s'agrègent sous forme de micelles globulaires de taille (~ 10 nm). Concernant cette fois-ci les dérivés PEG750 (cf. III-Figure 26), on constate à 0,1 g/L une organisation dense sous forme de micelles cylindriques et/ou nanotubes. Ceci pourrait être dû à un paramètre d'empilement P (cf. Introduction générale) compris entre $\frac{1}{3}$ et $\frac{1}{2}$ où le volume du tensioactif dans l'agrégat pourrait s'apparenter à un cône tronqué, contrairement aux dérivés PEG2000 ($P < \frac{1}{3}$ où le volume du tensioactif pourrait être un cône simple).

Par l'étude de la taille des agrégats de la série hybride F–H PEGylée et de la morphologie des agrégats de la série F_8 , nous avons convenu d'utiliser les dérivés PEG2000 de la série F_8 comme potentiels candidats à l'encapsulation de principes actifs. En effet, ils semblent présenter des cmc très basses ($< 1 \mu\text{M}$) et s'auto-associent en micelles globulaires de tailles comprises en 10 et 100 nm. Ces deux paramètres essentiels à ce type d'application sont donc respectés pour la suite.

2. Etude de l'agrégation des tensioactifs glucosylés

2.1 Protocole d'agrégation sous forme de vésicules

Pour les tensioactifs glucosylés $F_6H_6_Glucose$ et $F_6H_8_Glucose$, nous avons souhaité les valoriser en tant que vésicules dans lesquels nous pourrions incorporer un principe actif hydrophile. Chaque tensioactif a été préparé dans l'eau jusqu'à sa limite de solubilité (1 et 0,75 g/L respectivement pour $F_6H_6_Glucose$ et $F_6H_8_Glucose$) puis les échantillons ont été thermostatés à 30 °C et agités pendant 2 h.

À ce stade, nous observons une solution trouble dans l'échantillon. Pour obtenir des populations monodisperses de vésicules, les échantillons ont été extrudés 35 fois sur membrane de porosité 100 nm. (cf. *Matériel et Méthodes*). On obtient alors les solutions limpides de vésicules qui ont été observées avec un D_H de 100 nm en DLS (cf. *Figure III-27*).

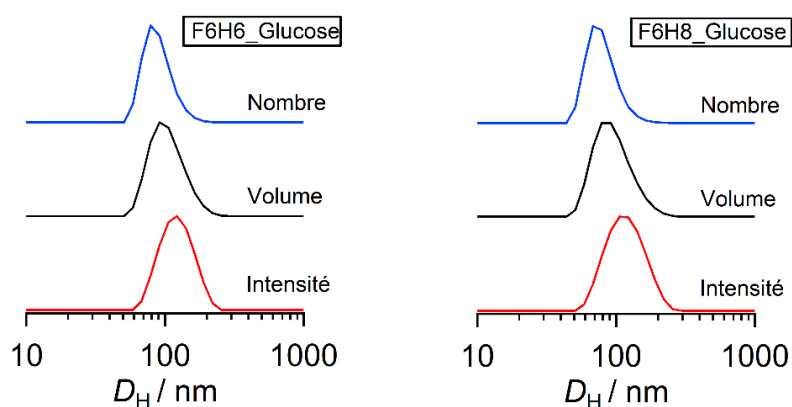


Figure III-27. Distributions de tailles des agrégats formés par (A) $F_6H_6_Glucose$ à 1 g/L et (B) $F_6H_8_Glucose$ à 0,75 g/L en DLS.

2.2 Caractérisation microscopique par MET et par Cryo-ME

Pour apporter une information supplémentaire sur la forme des agrégats de tensioactifs glucosylés, les images MET en coloration négative et Cryo-ME ont été réalisées sur les tensioactifs de la série glycosylée à 0,1 g/L et 0,75 g/L par nos collaborateurs de l'Université Martin Luther Halle-Wittenberg en Allemagne, au laboratoire du Dr. Annette Meister (Equipe ZIK HALOmem & Institut de Biochimie et Biotechnologie).

2.2.1 Principe de la cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-ME)

La Cryo-ME vient en complément de la technique microscopique MET. L'échantillon est directement visualisé sans certaines étapes de préparation (*i.e.* coloration négative et séchage), ce qui permet d'éviter les altérations possibles de la conformation des agrégats et de pouvoir les observer dans leur état natif en les congelant à très basse température ($\sim -175^{\circ}\text{C}$ environ).

La seule différence matérielle réside dans l'utilisation d'un cryoéquipement amovible pendant l'acquisition des images, constitué d'un passeur de grilles d'échantillons sur sa pointe connecté par conductivité thermique à un réceptacle d'azote liquide qui stabilise la température pour conserver la congélation des échantillons (*cf. Figure III-28*)¹⁴².

Une fois les grilles d'échantillons préparées et instantanément congelées avec de l'éthane liquide, celles-ci sont placées et maintenues au bout de la pointe refroidie, pour éviter tout effet thermique dommageable sur la structure de l'échantillon congelé.

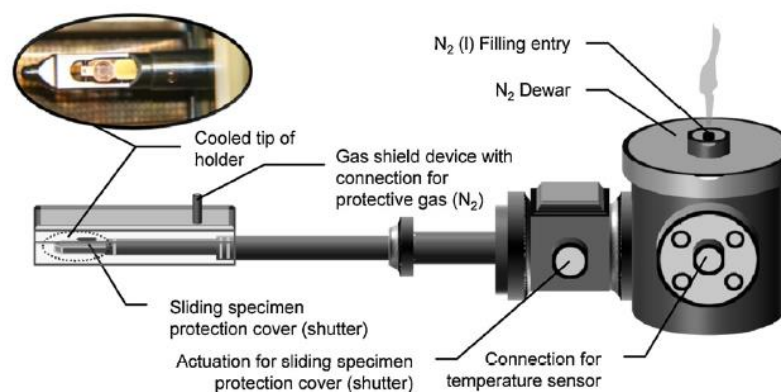


Figure III-28. Représentation schématique d'un passeur d'échantillons en Cryo-ME¹⁴².

Des protections supplémentaires sont placées tout autour de la pointe (comme un bloc cubique glacé) pour éviter la formation de glace sur la pointe qui pourrait apporter des contaminations extérieures ou des transitions de phase de l'échantillon avec le changement de température. Le cryoéquipement est ensuite rapidement transféré jusqu'au microscope électronique à transmission pour la visualisation des images.

Un inconvénient de l'utilisation de cette technique est que le protocole de préparation est fastidieux et requiert une attention marquée pour éviter les possibles transitions de phase d'échantillon ou contaminants extérieurs venant de la formation de glace lié à la variation de température lors du transfert de préparation des échantillons au microscope électronique.

2.2.2 Discussion générale

Les images MET des agrégats formés par **F₆H₆_Glucose** (*Figure III-29-A*) et **F₆H₈_Glucose** (*Figure III-29-B*) montrent la coexistence de vésicules qui semblent être déformées probablement en raison du séchage des échantillons pendant leur préparation.

Pour compléter ces observations, les images de Cryo-ME ont été faites. Dans le cas de **F₆H₆_Glucose** (*Figure III-29-C*) les agrégats s'organisent sous forme d'une population dense et compactée de vésicules uni-lamellaires (VUL). Pour **F₆H₈_Glucose** (*Figure III-29-D*), on observe des populations denses de vésicules multi-lamellaires (VML) de contrastes différents. Dans les deux cas, les vésicules montrent des diamètres internes variables (30 à 100 nm environ).

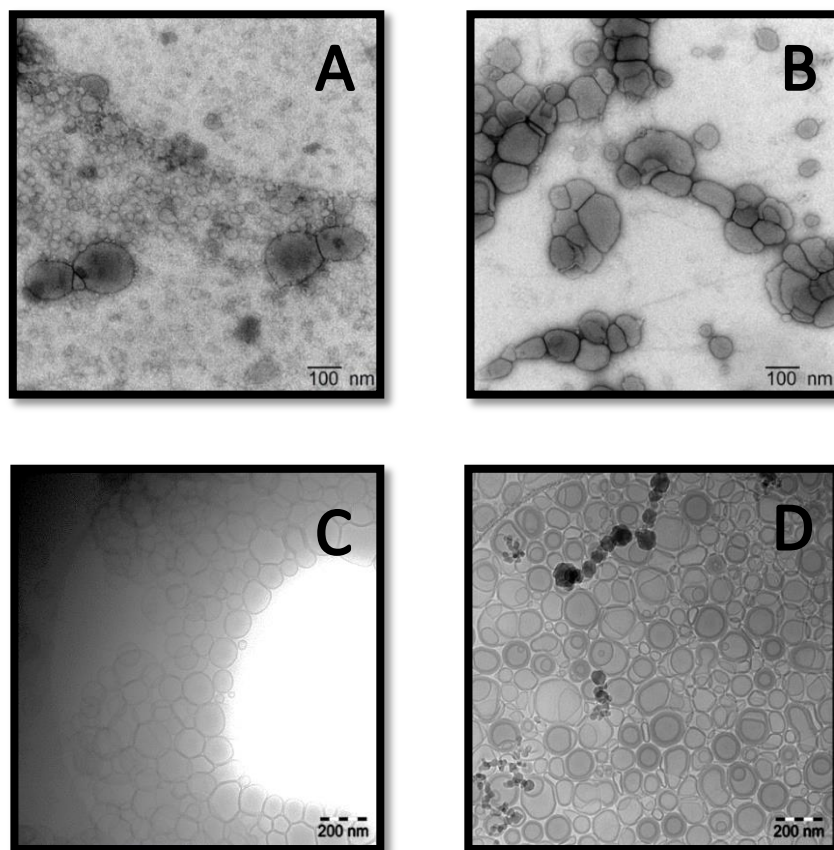


Figure III-29. Images MET des agrégats formés par (A) $F_6H_6_Glucose$ et (B) $F_6H_8_Glucose$ et Cryo-ME pour (C) $F_6H_6_Glucose$ et (D) $F_6H_8_Glucose$ à 1 g/L et 0,75 g/L respectivement.

Dans le cas de $F_6H_8_Glucose$ (Figure III-29-D), certaines couches lamellaires semblent beaucoup plus foncées que d'autres du fait de la présence de fluor qui possède une densité électronique importante¹⁴³. Ceci semble confirmer la ségrégation des chaînes hydrophobes au sein des vésicules³⁷.

L'étude microscopique des vésicules formées par les tensioactifs $F_6H_6_Glucose$ et $F_6H_8_Glucose$ nous a permis de les envisager comme outils potentiels pour une application au transport de principes actifs hydrophiles et/ou lipophiles. En effet, les VUL de $F_6H_6_Glucose$ observées en Cryo-ME d'un diamètre de 100 nm environ (en accord avec la DLS) sont acceptables pour cette application et pourrait transporter des actifs hydrophiles.

Concernant les VML observées pour $F_6H_8_Glucose$, celles-ci seraient très utiles dans les thérapies combinées (l'actif hydrophile encapsulé dans les compartiments aqueux et l'actif

hydrophobe dans les bicouches lipophiles). Cependant, les populations de MLV dans notre cas sont très hétérogènes en taille.

2.3 Etude cinétique de la stabilisation des vésicules en solution

En parallèle, nous avons étudié la stabilité des vésicules formées par **F₆H₆_Glucose** au cours du temps (de 24 h à 1 mois). Cette étude a été scindée en deux parties : dans un premier temps, l'influence de la température (de 25 °C à 37 °C), pour se rapprocher au plus près des conditions physiologiques du corps humain.

Ensuite, l'influence de la nature de la solution tampon dans laquelle ont été formées les vésicules de **F₆H₆_Glucose** a également été suivie. Nous avons comparé la stabilité des vésicules dans l'eau pure et dans un tampon phosphate salin (PBS) qui permet de mimer le milieu physiologique¹⁴⁴.

2.3.1 Influence de la température

Les échantillons dont les résultats en DLS sont montrés en *Figure III-30* ont été réalisés avec deux échantillons provenant d'une même solution mère de vésicules **F₆H₆_Glucose** à 1 g/L dans l'eau pure.

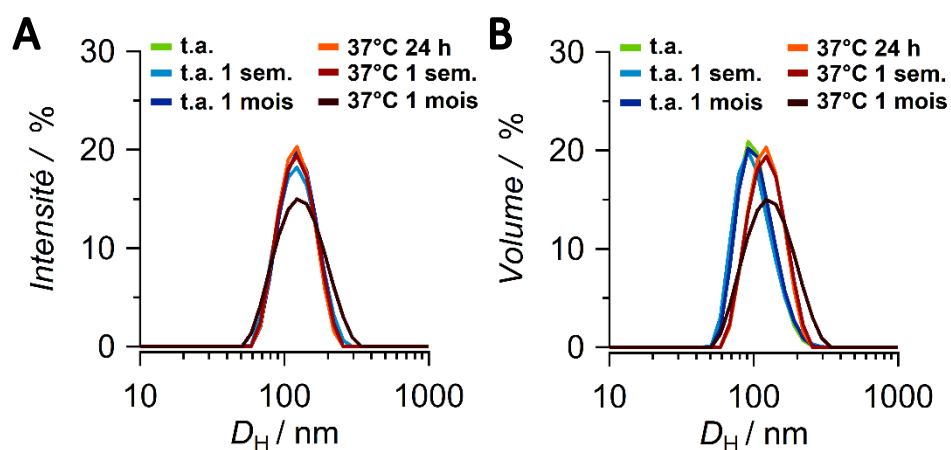


Figure III-30. Distributions de tailles des vésicules formées par **F₆H₆_Glucose** en pourcentage d'intensité (A) et de volume (B) à température ambiante et après incubation à 37 °C.

On peut remarquer que la distribution de taille reste unimodale et quasi identique dans le temps, quel que soit la température appliquée (*cf. Tableau III-7*) : cela confirme la présence de populations monodisperses.

D_H (nm)	t= 0 min	t= 1 semaine	t= 1 mois
À 25 °C	124,5	127,5	127,5
À 37 °C	125,9	124,8	136,0

Tableau III-7. D_H des vésicules en fonction du temps d'incubation (t=0 min ; 1 semaine ; 1 mois) à une température appliquée (25 °C ou 37 °C) pour une solution de vésicules F₆H₆_Glucose à 1 g/L.

Toutefois on remarque qu'il y a une très légère augmentation de la taille des vésicules au bout d'1 mois à température constante de 37 °C.

2.3.2 Influence de la nature de la solution tampon

Nous avons ensuite étudié la stabilité des vésicules dans le tampon PBS (*cf. Figure III-31*) en poursuivant la même étude qu'en *section 2.3.1*.

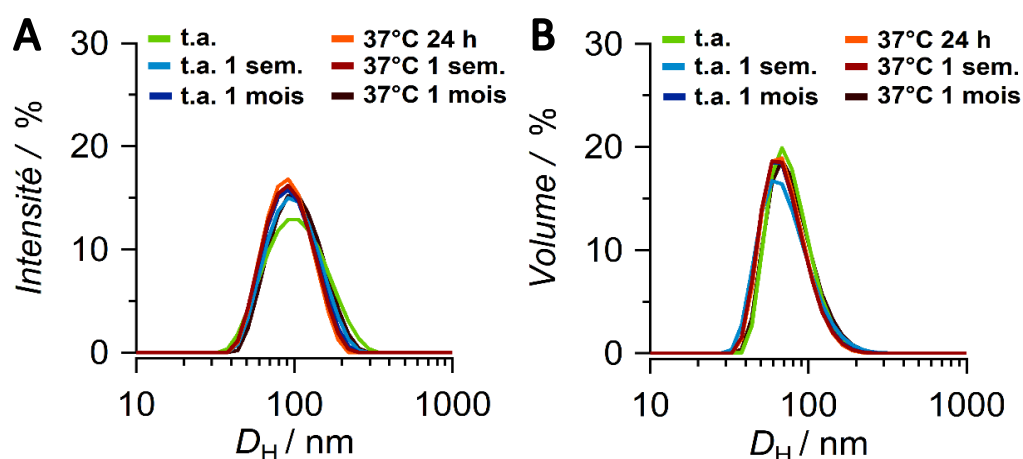


Figure III-31. Distributions de tailles des vésicules de F₆H₆_Glucose en pourcentage d'intensité (A) et de volume (B) à température ambiante et après incubation à 37 °C dans le tampon PBS.

Ce dernier s'est avéré particulièrement propice à la formation de populations monodisperses de vésicules comme celles formées dans l'eau. La stabilité des vésicules dans

le tampon PBS est également remarquable pendant 1 mois quelle que soit la température (cf. *Tableau III-8*).

D_H (nm)	t= 0 min	t= 1 semaine	t= 1 mois
À 25 °C	110,9	103,2	98,6
À 37 °C	95,2	96,9	108,6

Tableau III-8. D_H des vésicules en fonction du temps d'incubation (t=0 min ; 1 semaine ; 1 mois) à une température appliquée (25 °C ou 37 °C) pour une solution de liposomes F₆H₆_Glucose à 1 g/L dans le tampon PBS.

La très bonne stabilité des vésicules de **F₆H₆_Glucose** dans le temps, quelle que soit la température ou la solution tampon utilisée (eau ou PBS) rend les perspectives d'encapsulation de principes actifs hydrophiles, à des conditions physiologiques normales (37 °C ; PBS), intéressantes à étudier.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les propriétés de micellisation des dérivés PEGylés par 3 techniques physico-chimiques différentes (TS, TCI et spectrofluorimétrie). Ces composés s'auto-assemblent dans l'eau à des concentrations très basses : un critère recherché pour la délivrance de principes actifs. En particulier, les cmc de la série F₈ semblent inférieures à 1 μ M mais cela n'a pas pu être confirmé avec précision.

La taille de ces auto-assemblages a été déterminée par des techniques de DLS et CES-SLS, et indiquent que les D_H et N augmentent avec les longueurs des chaînes hydrophobes et la diminution de la taille de la tête PEG. Associées à une étude morphologique des agrégats par microscopie MET et Cryo-ME pour la série F₈, nous avons pu mettre en évidence l'influence de la taille de la tête polaire PEG sur la nature des agrégats formés avec un assemblage de type micelles globulaires d'environ 10 nm pour les dérivés PEG2000 et des micelles

cylindriques de 20 à 60 nm dans le cas des dérivés PEG750. Il serait intéressant en perspective, de comparer ces résultats avec d'autres longueurs de chaînes fluorées, plus courtes et/ou ramifiées.

Nous avons ensuite étudié la famille de tensioactifs glucosylés qui ont été valorisés sous forme de vésicules dans le but d'y incorporer des actifs hydrophiles. Leurs tailles et formes ont été étudiées en DLS, MET et Cryo-ME et ont montré la formation de VUL pour **F₆H₆_Glucose** et de MLV pour **F₆H₈_Glucose** avec des tailles de vésicules variant entre 30 et 100 nm.

En choisissant **F₆H₆_Glucose** pour l'homogénéité de ses VUL, nous avons étudié la stabilité en solution aqueuse ou dans des conditions physiologiques de ces assemblages. Une stabilité remarquable au-delà d'1 mois à 37 °C a été observée. Le **F₆H₆_Glucose** semble être de ce fait un candidat intéressant la vectorisation de principes actifs hydrophiles, qui fera l'objet d'une évaluation à l'avenir.

**CHAPITRE IV. TRAVAUX PRÉLIMINAIRES
D'ENCAPSULATION D'UN PRINCIPE ACTIF
AU SEIN DES AGRÉGATS FORMÉS PAR UN
TENSIOACTIF DE LA SÉRIE F₈ PEGYLÉE**

Introduction

Nous nous sommes consacrés dans ce chapitre, à étudier de manière préliminaire, la capacité des micelles PEGylées à pouvoir solubiliser un principe actif hydrophobe : ici le Paclitaxel (PTX). Le PTX est un modèle de principe actif hydrophobe très décrit dans la littérature, ce qui nous a permis de comparer l’efficacité de notre système de transport par rapport à d’autres existants déjà sur le marché.

Le choix du candidat tensioactif et du protocole de solubilisation micellaire ont également été étudiés et optimisés, pour déterminer au mieux les paramètres de charge médicamenteuse (C.M.) et d’efficacité d’encapsulation (E.E.), par rapport à un pourcentage massique initial de PTX choisi dans la formulation micellaire.

Par la suite, une étude de relargage du PTX encapsulé au sein des micelles PEGylées a été réalisée. Celle-ci a ensuite été complétée par des tests de viabilité cellulaire réalisés par nos collaborateurs de l’Institut de NeuroPhysiopathologie (équipe GlioME) à AMU. Les cellules tumorales pulmonaires A549 ont été utilisées pour vérifier l’innocuité de notre vecteur PEGylé seul, puis pour comparer la cytotoxicité du système vecteur–PTX à celle du PTX libre.

1. Choix des candidats tensioactif et principe actif

1.1 Le Paclitaxel (PTX)

1.1.1 Généralités

Pour étudier la solubilité micellaire d’actifs au sein de nos micelles PEGylées, nous avons choisi comme modèle d’étude, le PTX, qui est un agent anticancéreux hydrophobe largement étudié dans la littérature (*cf. Schéma IV-1*)¹⁴⁵.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

Le PTX fait partie de la famille des taxanes. Son origine en tant que principe actif provient d'un arbre, l'If du Pacifique (*Taxus brevifolia*), dont les propriétés cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales ont été rapportées pour la première fois dans les années 1960 par Monroe E. Wall. Sa structure chimique fut ensuite, élucidée en 1971 par Monroe E. Wall et Mansuck C. Wani¹⁴⁶⁻¹⁴⁷. Son hémisynthèse a été découverte par l'équipe de Pierre Potier (Institut de chimie des substances naturelles, Gif-sur-Yvette) dans les années 80 à partir de la 10-désacétylbaccatine III (non cytotoxique) provenant des aiguilles de l'If européen *Taxus Baccata*¹⁴⁸.

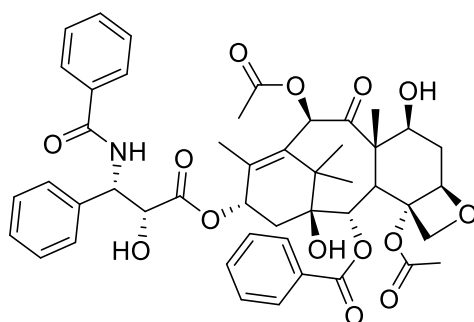


Schéma IV-1. Structure chimique du PTX

Depuis plus de 30 ans, le PTX est utilisé dans la prise en charge de certains cancers, comme les cancers de l'ovaire et du sein chez la femme, ainsi que les cancers du système respiratoire chez l'adulte. Il est utilisé seul ou en thérapie combinée avec d'autres principes actifs cytotoxiques¹⁴⁷. Il fait partie de la classe pharmacologique des agents stabilisants du microtubule. Il possède une concentration inhibitrice médiane IC₅₀, c'est-à-dire la concentration à laquelle 50 % d'une population cellulaire est inhibée, comprise entre 2,5 et 7,5 nM¹⁴⁹. Pour comprendre son mécanisme d'action, il faut s'intéresser dans un premier temps, au rôle des microtubules lors de la mitose cellulaire, phénomène essentiel à la prolifération cellulaire et au développement de cancers.

❖ Les microtubules

Les microtubules sont constitués de dimères de tubuline (sous-unités α et β) assemblés en protofilaments, eux-mêmes assemblés en microtubules (cf. Schéma IV-2). Constituants du cytosquelette, ils ont un rôle majeur dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la morphologie, le transport intracellulaires, la migration et la division cellulaire. Pour assurer ces fonctions, ils sont l'objet de phénomènes de polymérisation et dépolymérisation constants et finement régulés.

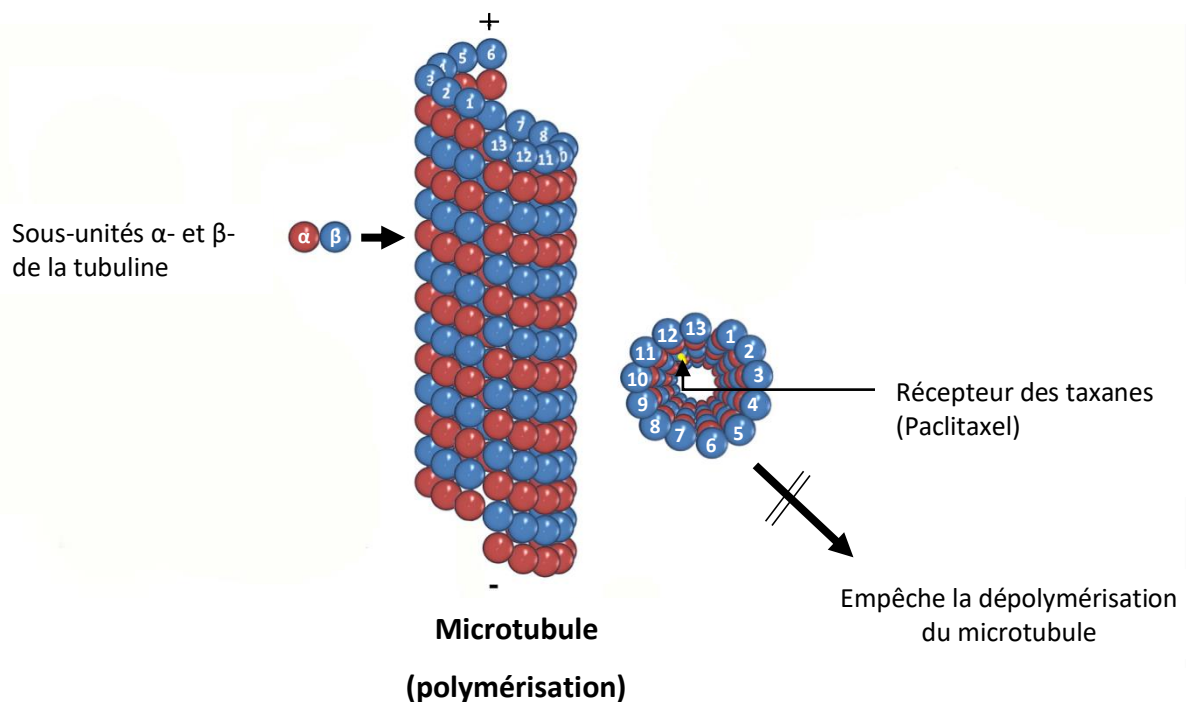


Schéma IV-2. Représentation d'un microtubule et mécanisme d'action du PTX sur ce dernier. Schéma adapté des travaux de Calligaris *et al.*¹⁵⁰

Lorsqu'il y a présence de PTX ou d'autres dérivés taxanes, ceux-ci viennent se lier sur le récepteur sélectif de la sous-unité β de la tubuline (cf. Schéma IV-2). Cela a pour conséquence de favoriser la polymérisation de la tubuline et à empêcher sa dépolymérisation et donc la réorganisation des microtubules. Lors de la mitose, ceci induit un blocage des cellules lors de la métaphase et empêche la progression de la mitose.

Le PTX contribue ainsi à l'arrêt du cycle de division cellulaire, induisant l'apoptose des cellules. Les cellules tumorales, caractérisées par leur prolifération très active, seront

particulièrement sensibles à l'action du PTX. Néanmoins, cela n'est pas sans conséquence puisqu'il touchera également les cellules saines à renouvellement rapide comme les cellules sanguines (hémotoxicité), les follicules pileux (alopécie) ou encore les cellules de la muqueuse digestive (mucites, vomissements). Il possède également une activité antiangiogénique^{151,152}.

D'un point de vue chimique, le PTX est un composé très faiblement soluble dans l'eau (entre ~ 0,1 et 0,3 µg/mL)^{153,154,10} et lipophile (~ 34 mg/mL dans l'éthanol)¹⁴⁷. Il peut également présenter des dégradations, qui induisent une perte d'activité, à des températures supérieures à 60 °C ; notamment par hydrolyse possible des trois fonctions acétate ou épimérisation réversible sur le carbone C7 (*7-épi-taxol*). Ces dégradations sont favorisées dans des conditions de milieu aqueux à pH neutre ou basique¹⁵⁵, au contraire de pH plus acides, où la stabilité du PTX a été rapportée (cf. Schéma IV-3)¹⁵⁶.

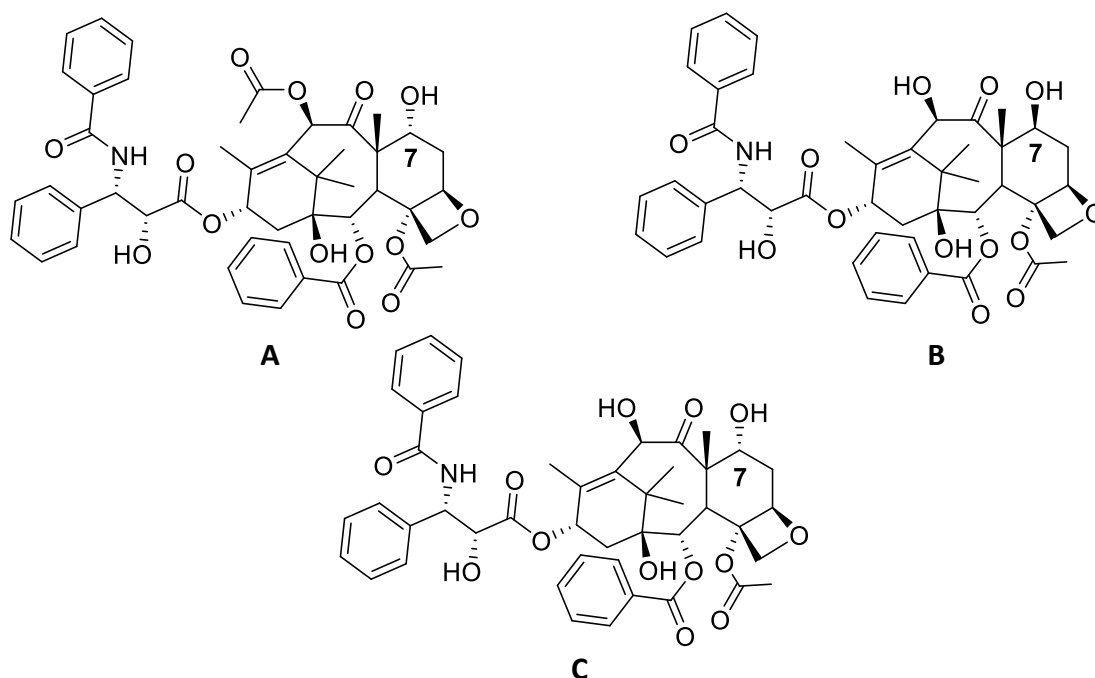


Schéma IV-3. Représentation de quelques métabolites du PTX : son épimère le 7-épi-taxol (A) ; son analogue hydrolysé le 10-déacétyltaxol (B) ; et l'épimère de (B) le 7-épi-10-Déacétyltaxol (C)¹⁵⁷.

1.1.2 Les formulations actuelles du PTX

Plusieurs défis sur l'utilisation médicale du PTX demeurent encore d'actualité^{145,147,158} : sa très faible solubilité dans l'eau limite sa biodisponibilité dans le corps humain. Ainsi, la première génération d'excipients utilisés pour augmenter l'hydrosolubilité du PTX sont l'éthanol et l'huile de ricin polyoxyl 35 (Cremophor EL®). Cependant, d'importants effets secondaires chez les patients ont été relevés comme des réactions allergiques sévères liées aux excipients comme le crémosphor ou des neurotoxicités^{98,145,147}.

Suite à cela, d'autres formulations du PTX ont été imaginées afin de s'affranchir des toxicités liées aux excipients et des phénomènes de résistance vis-à-vis du principe actif, tout en conservant les propriétés cytotoxiques de ce dernier.

Actuellement, il existe 5 catégories de systèmes de délivrance du PTX approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA) ou en essai clinique avancé : les nanoparticules d'albumine (Abraxane®, déjà commercialisé), les micelles polymériques (Genexol®PM), les prodrogues à base de polymère (OPAXIO®), les formulations liposomales (Lipusu®) et les injections concentrées en PTX pour la nanodispersion (Bebetex®)¹⁴⁵.

Concernant les micelles polymériques, il existe une multitude de formulations à base de copolymère amphiphile block PLGA (monométhoxy-poly(éthylène glycol-block-poly(D,L-lactide) ou encore avec des copolymères à base de PLA (Poly(lactide)) ou de PCL (Poly(ε-caprolactone))⁹⁸. D'autres formulations ont également été mises au point avec des polymères biodégradables comme le chitosan^{159,160} ou le TPGS (Tocophérol polyéthylène glycol succinate) dérivé de la vitamine E¹⁶¹ qui montrent d'ailleurs des efficacités d'encapsulation supérieures à 90 % et des charges d'actif pouvant aller jusqu'à environ 25 %, un des taux maximum observé dans la littérature pour le PTX^{98,162}.

L'encapsulation et la stabilité du principe actif au sein de l'agrégat sont dépendants de multiples paramètres tels que la nature du tensioactif choisi (ionique, non ionique), du type d'agrégat formé, de la nature hydrophile/lipophile du principe actif choisi et des charges ioniques dans l'environnement proche de l'agrégat (par exemple, le milieu physiologique).

1.2 Objectif de l'étude et choix du tensioactif candidat

Pour étudier les paramètres d'encapsulation du PTX au sein de nos micelles PEGylées, nous avons dû dans un premier temps élire un tensioactif candidat. En croisant les différentes données physico-chimiques énumérées pour chaque tensioactif au Chapitre III, le tensioactif **F₈H₁₂PEG2000** nous a semblé être un candidat de choix :

- D'une part, nous avons suggéré une cmc pour ce tensioactif < 1 μM par rapport aux difficultés rencontrées de sensibilité des techniques. Cette estimation reste plus basse que les cmc des dérivés F₆ PEGylés et permettrait ainsi de garder intacte la structure de l'agrégat chargé en principe actif, lors de son injection dans un système dilué comme la circulation sanguine¹⁶³.
- Une cmc aussi faible devrait également contribuer à limiter la toxicité du vecteur, en limitant la concentration en tensioactif nécessaire au transport de l'actif, et donc circulant dans l'organisme. De plus, sachant que les tensioactifs fluorocarbonés ont un caractère peu cytolytique¹⁶⁴, on peut espérer que la chaîne fluorocarbonée de ces hybrides PEGylés leur confère cette propriété.
- La taille des micelles (~10–15 nm) lui permettrait de diffuser plus facilement vers les tissus tumoraux pour s'y accumuler par voie passive *via* l'effet EPR²⁰ (*cf. Introduction générale*).
- Il possède des chaînes PEG plus longues, ce qui pourrait conférer une meilleure furtivité (*cf. Figure I-9*) aux systèmes micellaires vis-à-vis des cellules du système réticuloendothélial après injection dans la circulation sanguine^{165,166}.
- D'autre part, leur compartiment hydrophobe, plus volumineux que dans le cas du **F₈H₈PEG2000**, pourrait permettre de solubiliser davantage de PTX dans le cœur hydrophobe des micelles.

2. Choix du protocole optimal d'encapsulation du PTX

Plusieurs méthodes existent dans la littérature pour incorporer physiquement le PTX dans des micelles. Nous avons choisi de présenter et de comparer deux méthodes très répandues, comme *l'injection de solvant organique* et la *dispersion aqueuse d'un film organique sec*, pour optimiser le protocole d'incorporation du PTX dans nos micelles de **F₈H₁₂PEG2000**. Nous avons comparé les deux méthodes en chromatographie CLHP à 5 et 10 % de pourcentages massiques initiaux de PTX dans la formulation micellaire (%_{mass.,(i)} de PTX); Ces valeurs de %_{mass.,(i)} de PTX se trouvent dans la gamme de celles étudiées dans la littérature.

2.1 Méthode d'incorporation par injection de solvant organique

Les étapes de l'incorporation du PTX par *injection de solvant organique* figurent en *Schéma IV-4* et sont inspirées de la littérature^{167,168}.

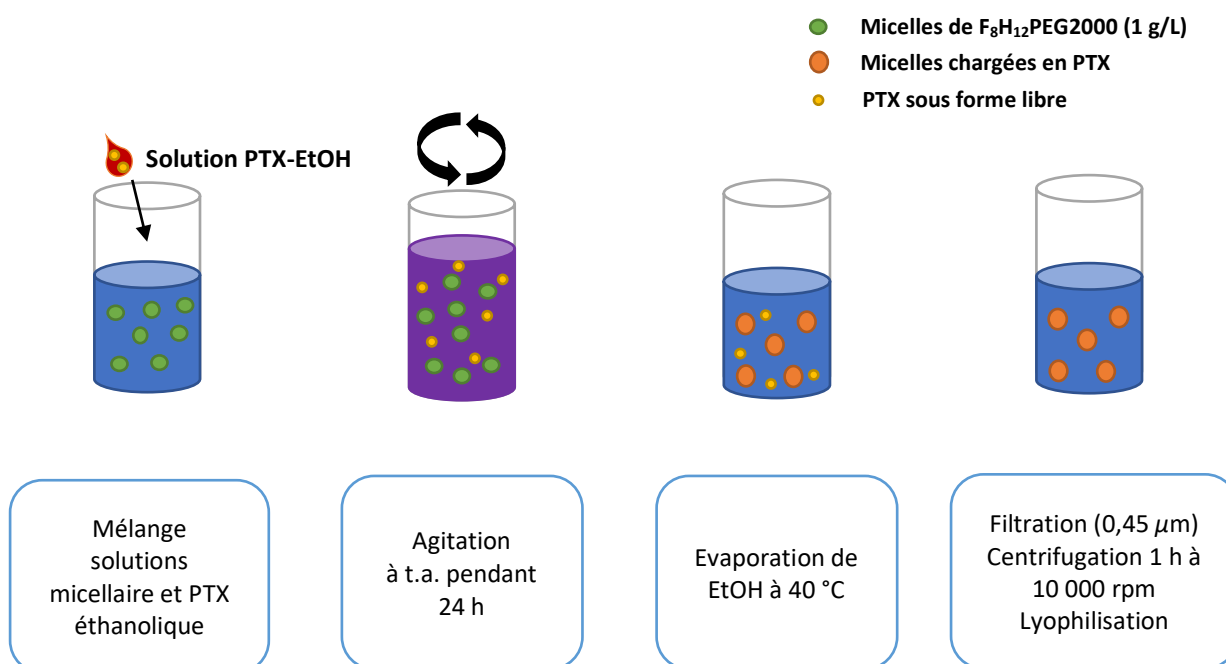


Schéma IV-4. Méthode d'injection de solvant organique utilisée sur les micelles de F₈H₁₂PEG2000.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

Dans un premier temps nous avons voulu valider la faisabilité de cette technique d'encapsulation sur le couple PTX/ F₈H₁₂PEG2000 et vérifier, sans doser précisément le PTX chargé, qu'aucune altération du principe actif ne se produise.

Pour cela, une solution aqueuse de F₈H₁₂PEG2000 est préparée à 1 g/L dans un flacon de 8 mL. On introduit un volume précis de solution éthanolique de PTX à 1 g/L dans la solution micellaire pour obtenir 5 % ou 10 %_{mass.,(i)} de PTX. Ensuite, le milieu est agité vigoureusement à température ambiante pendant 24 h. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite (vitesse 50 rpm ; 40 °C). Une aliquote de 700 µL est prélevée au fond de l'ependorf avec une micropipette pour éviter de prélever la mousse en surface. Cette aliquote est par la suite filtrée sur membrane de cellulose à 0,45 µm pour enlever le PTX sous forme libre et ainsi n'avoir que les micelles chargées en PTX dans le filtrat. Le filtrat est transvasé dans un eppendorf de 1,5 mL et il est ensuite centrifugé pendant 1 h (vitesse 10 000 rpm ; 20 °C). 400 µL de surnageant sont ensuite prélevés avant d'être lyophilisés pendant 12 h.

L'analyse du PTX chargé, est réalisée par la technique de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en injectant les échantillons de micelles préalablement déstabilisées dans le MeOH et agités au vortex 1 minute. Le chromatogramme en *Figure IV-1* montre l'analyse effectuée de la formulation micellaire à 5 %_{mass.,(i)} de PTX.

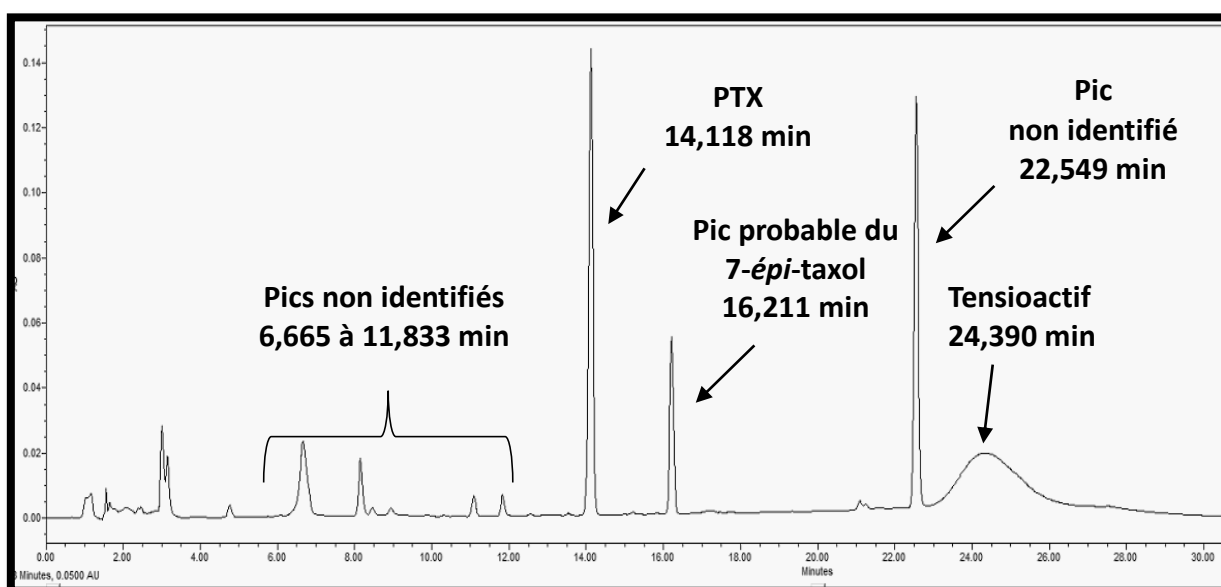


Figure IV-1. Chromatogramme de la formulation micellaire à 5 %_{mass.,(i)} de PTX par injection de solvant organique.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

On observe le pic du PTX à ~14,1 min et le pic large correspondant au tensioactif à ~24,4 min. Ce dernier ne peut être quantifiable, étant donnée la distribution large des chaînes PEG en CLHP : c'est pourquoi, seule la concentration en PTX sera prise en compte ici. Cependant, d'autres pics plus ou moins intenses sont présents sur ce chromatogramme. Les hypothèses d'attribution de ces pics avant 14 min pourraient être des sous-produits d'hydrolyse du PTX, plus polaires ; de même, le pic à ~16 min pourrait s'apparenter à son épimère le 7-*épi*-taxol décrit dans la littérature pour être élué après le PTX sur une colonne analogue à la nôtre¹⁶⁹.

Le pic à 22,5 min n'a pu être identifié et ne semble pas provenir d'un sous-produit de dégradation du PTX par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature. Ainsi, nous avons testé la stabilité du tensioactif seul au cours du processus de formulation du PTX pour confirmer son incidence sur l'apparition du pic à 22 min en CLHP et en parallèle contrôler la présence unique de micelles en DLS en solution aqueuse après réhydratation du lyophilisat.

En DLS (cf. Figure IV-2), nous observons deux populations distinctes à ~145–150 nm et ~700-750 nm en intensité et en volume, et une population à 124,1 nm en nombre à un pourcentage de 99,7 %.

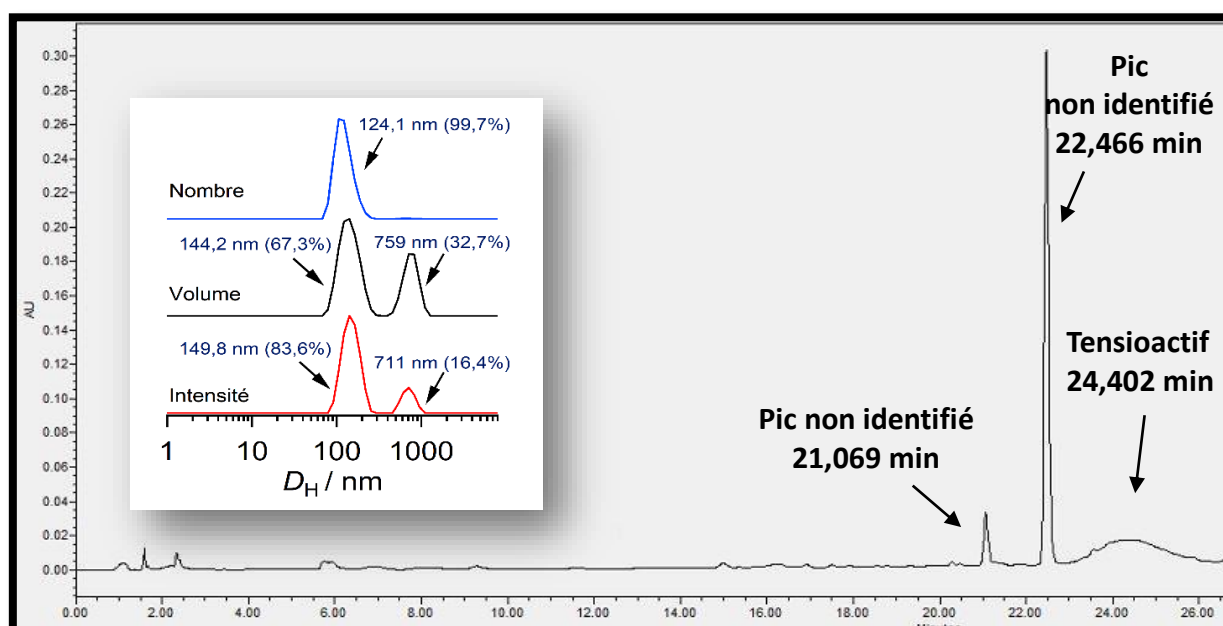


Figure IV-2. Chromatogramme et distribution des tailles en DLS du test effectué avec le tensioactif seul à 1 g/L par méthode d'injection de solvant organique.

Ceci nous indique la présence majoritaire d'agrégats larges qui ne correspondent pas aux micelles. De plus, l'analyse CLHP de la formulation micellaire sans PTX (cf. *Figure IV-2*), confirme l'apparition de sous-produits (pics à 21 et 22,5 min) également visibles en *Figure IV-1*. Il y a donc une dégradation probable du tensioactif au cours du procédé d'injection de solvant organique, qui nous a conduits à écarter cette méthode d'encapsulation.

2.2 Méthode d'incorporation par dispersion aqueuse d'un film organique sec

Nous sommes donc passés directement à la méthode *de la dispersion aqueuse d'un film organique sec*, qui permet de s'affranchir de l'étape d'évaporation de l'éthanol, en présence d'eau à 40 °C. En effet cette étape d'évaporation pourrait être à l'origine de la formation des sous-produits, constatés avec la méthode précédente. Les étapes de l'incorporation du PTX pour cette seconde méthode figurent dans le *Schéma IV-5* et ont été inspirées de la littérature^{165,166,170-173} :

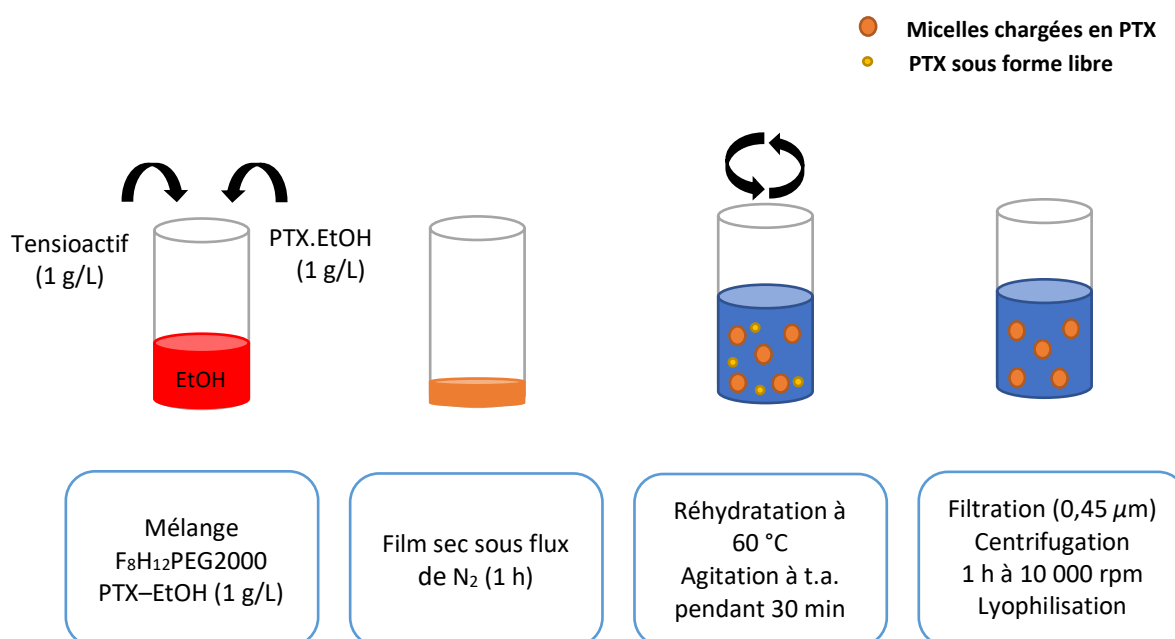
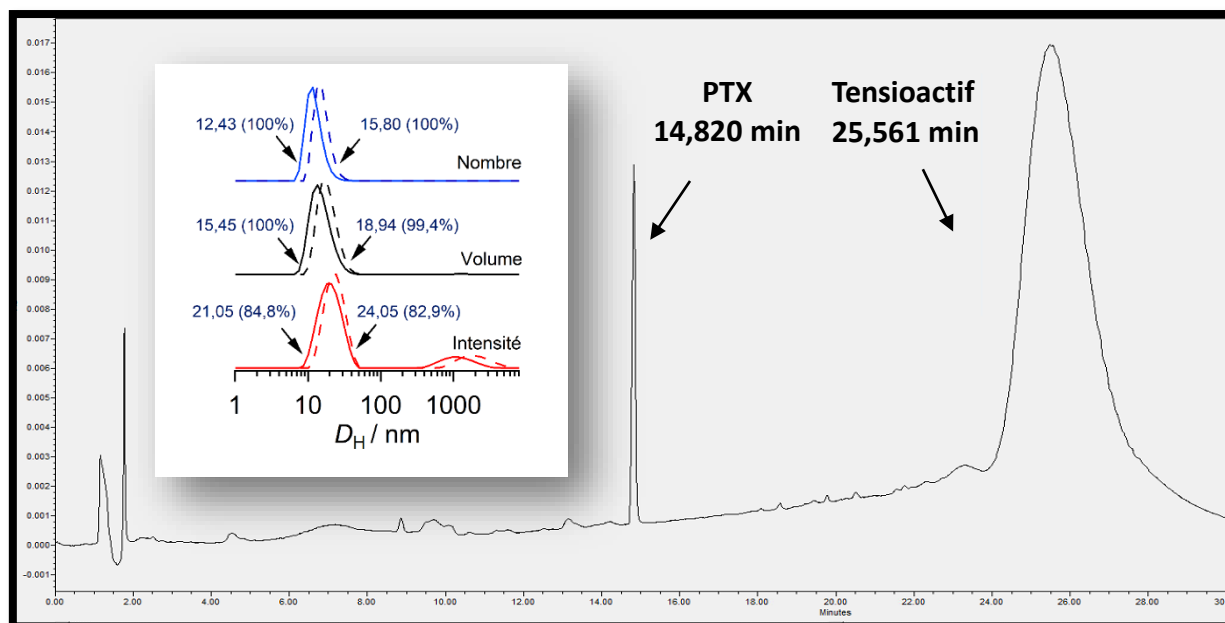


Schéma IV-5. Méthode de dispersion aqueuse d'un film organique sec appliquée aux micelles de F₈H₁₂PEG2000.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

Contrairement à la méthode par *injection de solvant organique*, le tensioactif et le PTX sont ici directement solubilisés dans l'EtOH. Les formulations micellaires sont faites également à 5 % et 10 %_{mass.,(i)} de PTX ici, pour comparer les deux méthodes entre-elles. Le mélange est ensuite séché sous un flux d'azote à température ambiante pendant 1 h, formant un film sec transparent au fond du flacon de 8 mL. Ce film est ensuite réhydraté à 60 °C pour obtenir une concentration finale de **F₈H₁₂PEG2000** de 1 g/L et l'ensemble est agité pendant 30 min à température ambiante.

De la même façon que pour la première méthode utilisée, on prélève une aliquote (V~700 µL) que l'on filtre sur membrane de cellulose à 0,45 µm pour enlever le PTX sous forme libre et ainsi ne garder que les micelles chargées en PTX. On centrifuge ensuite pendant 1 h à 10 000 rpm l'aliquote pour affiner la séparation, puis un volume précis de surnageant est prélevé (V=400 µL) avant d'être lyophilisé pendant 12 h. On regarde ensuite la stabilité de la formulation aqueuse, avant et après lyophilisation, par DLS. Parallèlement, les échantillons lyophilisés sont déstabilisés dans le MeOH, en agitant au vortex l'ensemble 1 minute à température ambiante. On les analyse ensuite en CLHP, ce qui nous donne les chromatogrammes correspondants (*cf. Figure IV-3*).



En croisant les résultats, nous avons confirmé la stabilité de la formulation micellaire préparée par *dispersion aqueuse d'un film organique sec*, avant et après lyophilisation des échantillons, par DLS.

En CLHP, nous avons constaté uniquement les pics du PTX et du tensioactif, ce qui nous permettra de doser quantitativement l'actif total encapsulé. À noter qu'à partir de cette méthode, nous avons dû réduire le débit en CLHP de 1,5 à 1,2 mL/min suite à des problèmes externes de surpression de la colonne utilisée. Ceci a eu pour conséquence de légèrement augmenter les temps de rétention pour le PTX (14,820 min) et le tensioactif (25,561 min). Cette dernière méthode a été gardée pour la suite des travaux, permettant de quantifier précisément le PTX chargé.

2.3 Optimisation de la méthode d'encapsulation choisie

Pour quantifier le PTX au sein des micelles de **F₈H₁₂PEG2000**, nous nous sommes intéressés à deux paramètres :

- *La charge médicamenteuse (C.M.)*, qui représente la masse de PTX chargée dans les micelles par rapport à la masse de micelles chargée en PTX. Celle-ci est exprimée en pourcentage massique (%_{mass.}). Pour notre système micellaire dynamique utilisé à 1 g/L, soit à très haute concentration en tensioactif par rapport à sa cmc estimée, nous supposons que tous les tensioactifs s'auto-organisent sous forme de micelles et que la faible fraction de monomère est infinitésimale.
- *L'efficacité d'encapsulation (E.E.)*, qui représente la masse de PTX chargée dans les micelles par rapport à la masse initiale de PTX dans la formulation. Elle est également exprimée en pourcentage massique (%_{mass.}).

Ces deux paramètres seront essentiels dans la suite du chapitre, pour optimiser au mieux le protocole choisi *de la dispersion aqueuse d'un film organique sec* et comparer notre formulation finale à d'autres systèmes existants.

2.3.1 Durée optimale de mise en contact du PTX libre en formulation micellaire

Les premiers essais d’optimisation que nous avons réalisés concernent la durée optimale de mise en contact du PTX avec le tensioactif avant séparation du PTX libre, et l’influence du temps de centrifugation sur la concentration finale en PTX chargé.

En effet, nous nous étions basés, pour des tests préliminaires, à 30 min de mise en contact et 1 h de centrifugation. Toutefois, pour étudier le relargage, ces durées sont très vite devenues une contrainte par rapport à la cinétique que nous avons souhaité mettre en place, notamment avec des temps fixes inférieurs ou égaux à la durée totale de la centrifugation (*e.g.* relargage à t_0+30 min).

Plusieurs auteurs ont rapporté des temps de mise en contact entre 10 et 30 min^{170,172,174} et des durées de centrifugation inférieures à 1 h, jugées efficaces pour séparer le PTX libre de la formulation¹⁷⁵. Concernant cette dernière, nous avons décidé de réduire le temps de centrifugation t_c à 10 min, et comparer ces nouveaux résultats avec le protocole initial (*i.e.* 1 h à 10 000 rpm).

Le *Tableau IV-1* rapporte les résultats des tests tripliqués pour différents temps de mise en contact, après analyse quantitative en CLHP de la concentration massique en PTX chargé dans les micelles ($C_{PTX \text{ chargé}}$), de la charge médicamenteuse (C.M.) et de l’efficacité d’encapsulation (E.E.). Différents temps de mise en contact pour la formulation micellaire à 10 %_{mass.,(i)} de PTX ont été testés ici avec 15 min, 30 min, jusqu’à 1 h 30 maximum, pour évaluer la saturation complète en PTX dans les micelles au cours du temps.

Temps de mise en contact (min/h)	C _{PTX chargé} (µg/mL)		C.M. (% _{mass.})		E.E (% _{mass.})	
	$t_c = 1 \text{ h}$	$t_c = 10 \text{ min}$	$t_c = 1 \text{ h}$	$t_c = 10 \text{ min}$	$t_c = 1 \text{ h}$	$t_c = 10 \text{ min}$
15 min	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,11 ± 0,2	0,12 ± 0,02	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2
30 min	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,10 ± 0,2	0,12 ± 0,01	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1
1 h 30	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,11 ± 0,2	0,12 ± 0,03	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3

Tableau IV-1. Influence du temps de centrifugation (t_c) sur les paramètres d’encapsulation pour la formulation micellaire à 10 %_{mass.,(i)} de PTX.

D'après le tableau, quel que soit le temps de mise en contact de l'actif en présence de la solution micellaire et la durée de centrifugation, nous obtenons une concentration en PTX chargé, comprise entre 1,0 et 1,2 µg/mL, pour cette formulation micellaire à 10 %_{mass.,(i)} de PTX.

Nous avons ensuite calculé les paramètres C.M. et l'E.E, associées à chaque expérience tripliquée, avec des résultats allant respectivement de 0,1 à 0,12 % et 1,0 à 1,2 %. Ces premières données d'encapsulation sont très faibles, comparées aux formulations micellaires polymériques en PTX actuellement décrites dans la littérature, pouvant aller jusqu'à 25 % de C.M. et 90 % d'E.E.^{98,162}.

2.3.2 Choix du pourcentage massique initial de PTX dans la formulation

Pour essayer d'augmenter les paramètres C.M. et E.E. pour notre système micellaire, nous avons fait varier le paramètre %_{mass.,(i)} de PTX entre 5 et 10 % maximum.

2.3.2.1 Charge médicamenteuse (C.M.)

Les résultats tripliqués de C_{PTX chargé} et du paramètre C.M. à 5, 7 et 10 %_{mass.,(i)} de PTX dans la formulation micellaire, figurent en *Tableau IV-2*.

Là encore, nous avons souhaité vérifier la saturation complète en PTX chargé dans les micelles, qui atteint un palier dès 15 min de mise en contact, quel que soit la valeur étudiée du paramètre %_{mass.,(i)} de PTX.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d’encapsulation d’un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

Temps de mise en contact (min/h)	C _{PTX} chargé (µg/mL)		
	5 % _{mass.}	7 % _{mass.}	10 % _{mass.}
15 min	0,8 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2
30 min	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1h30	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,3
Temps de mise en contact (min/h)	C.M. (% _{mass.})		
	5 % _{mass.}	7 % _{mass.}	10 % _{mass.}
15 min	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02
30 min	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
1 h 30	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,03

Tableau IV-2. Influence du paramètre %_{mass.,(i)} de PTX (5,7 et 10 %_{mass.}) sur C_{PTX} chargé et le paramètre C.M.

Nous avons ensuite rapporté les moyennes et écarts-types du paramètre C.M. au bout de 15 min de mise en contact, en fonction des valeurs étudiées de %_{mass.,(i)} de PTX, montrés en *Figure IV-4*.

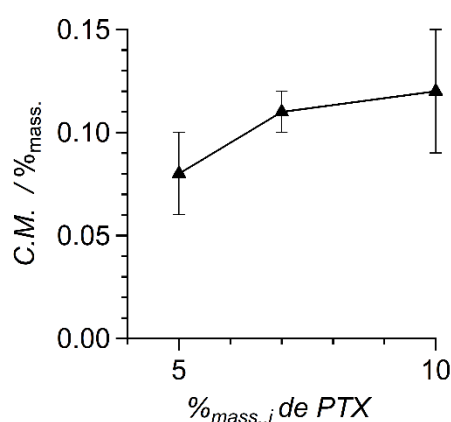


Figure IV-4. Paramètre C.M. en fonction du paramètre %_{mass.,(i)} de PTX.

On remarque le début de la saturation en PTX dans les micelles par l’inflexion de la courbe à 7 %_{mass.,(i)} de PTX dans la formulation micellaire (expérience **EG282**). Ceci signifie qu’à

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

partir de cette valeur, il y a une saturation complète des micelles en PTX chargé. Il convient ensuite de regarder le paramètre E.E. pour confirmer cette tendance.

2.3.2.2 Efficacité d'encapsulation (E.E.)

Les calculs pour le paramètre E.E. ont également été faits pour chaque expérience tripliquée, aux mêmes valeurs de %_{mass.,(i)} de PTX (i.e. 5, 7 et 10 %_{mass.}). Ils figurent dans le *Tableau IV-3* ci-dessous :

Temps de mise en contact (min/h)	E.E. (% _{mass.})		
	5 % _{mass.}	7 % _{mass.}	10 % _{mass.}
15 min	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2
30 min	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1h30	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2

Tableau 3. Influence du paramètre %_{mass.,(i)} de PTX sur le paramètre E.E.

Nous avons ensuite rapporté les moyennes et écarts-types du paramètre E.E. en fonction des valeurs étudiées de %_{mass.,(i)} de PTX, après 15 min de mise en contact dans la *Figure IV-5* :

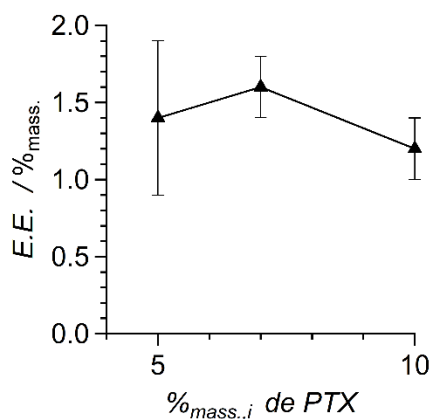


Figure IV-5. Efficacité d'encapsulation (E.E.) en fonction du %_{mass.,(i)} de PTX.

Une fois de plus, la formulation micellaire à 7 %_{mass.,(i)} de PTX (**EG282**) se distingue des autres, puisque nous obtenons une efficacité maximale de 1,6 %, légèrement plus haute que celles à 5 et 10 %_{mass.,(i)} de PTX (paramètre E.E. à 1,2 et 1,4 %_{mass.} respectivement). À partir des résultats précédents, nous avons décidé de nous placer à 7 %_{mass.,(i)} de PTX, comme paramètre optimal de formulation.

Pour résumer, malgré l'optimisation du protocole et la comparaison de deux méthodes d'encapsulation, la charge optimale de PTX obtenue par *dispersion aqueuse d'un film organique sec* (à 7 %_{mass.,(i)} de PTX), est de 0,1 %_{mass.}, pour une efficacité d'encapsulation de nos vecteurs de 1,6 %_{mass.}. Ces résultats sont bien inférieurs à ceux décrits dans la littérature (*cf. section 1.1.2*), avec d'autres systèmes de transport du PTX ; ce qui semble indiquer qu'en l'état, notre système micellaire n'est pas adapté à ce principe actif.

Nous avons malgré tout tenté d'utiliser cette formulation micellaire à 7 %_{mass.,(i)} de PTX, à titre purement exploratoire, pour étudier le relargage du PTX hors des micelles par un suivi cinétique préliminaire sur 4 h, puis un suivi complet sur 72 h.

3. Etude cinétique de relargage passif du PTX

3.1 Protocole de relargage passif

Pour l'étude de relargage passif du PTX, nous sommes repartis de la méthode par *dispersion aqueuse d'un film organique sec*, pour préparer en triplicat, les formulations micellaires à partir de 7 %_{mass.,(i)} de PTX (*cf. Schéma IV-6*).

Le début du suivi de relargage ($t_0 = 0$ min) commence à partir de la formulation fraîchement filtrée et centrifugée après $t + 15$ min de mise en contact. Le milieu est agité à température ambiante jusqu'à différents temps de relargage ($t_0 + 30$ min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h et 72 h), au cours desquels on prélève une aliquote d'échantillon qui est traité similairement au protocole de mise en contact, pour être analysé par la suite en CLHP.

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

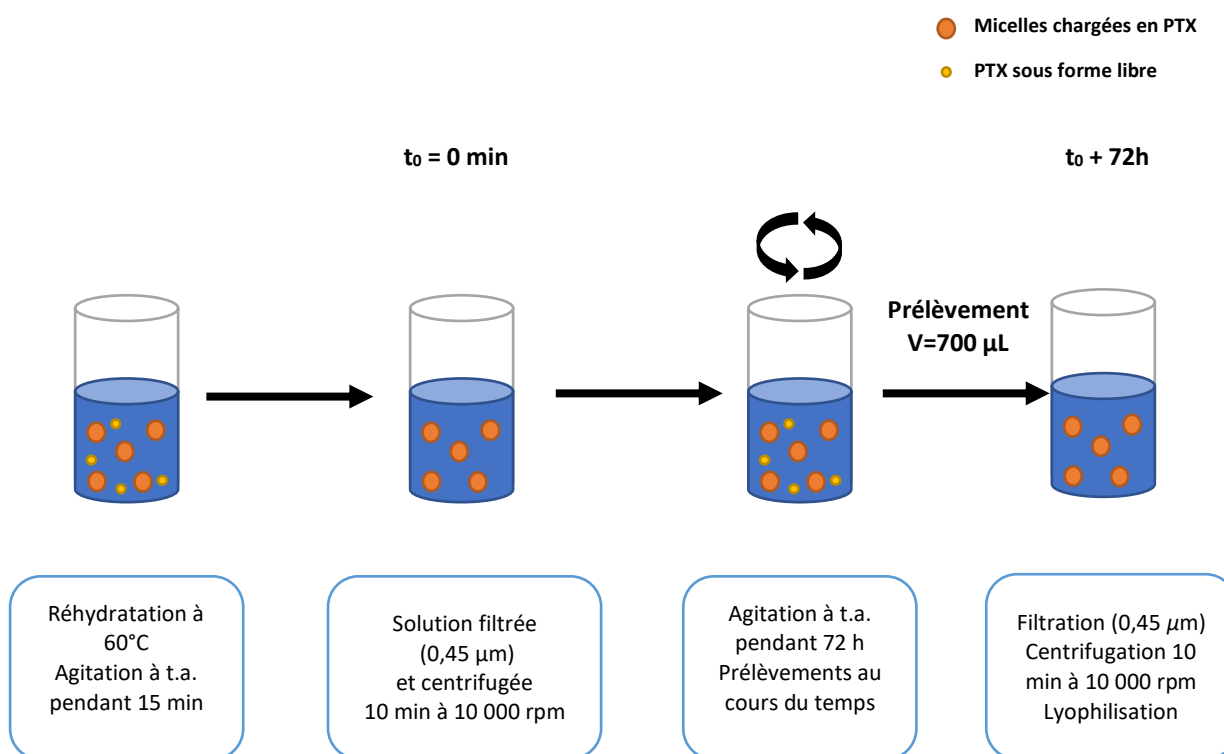


Schéma IV-6. Relargage passif du PTX hors des micelles de F₈H₁₂PEG2000.

Nous avons testé deux volumes différents de formulation de départ (3,5 mL et 8,5 mL) en gardant fixe la concentration massique en tensioactif (1 g/L). La première expérience à 3,5 mL (expérience **EG290**) a permis de faire un suivi préliminaire avec des prélèvements sur 4 h et de se placer aux mêmes conditions de volume d'échantillons que le protocole de mise en contact (expérience **EG282**) décrit en *section 2.3*.

La seconde expérience à 8,5 mL (expérience **EG291**) a permis d'avoir suffisamment de points à analyser au cours du relargage passif sur 72 h. Parallèlement, l'analyse au temps $t_0 = 0 \text{ min}$ du relargage avec 8,5 mL de formulation de départ nous permettra de recalculer les paramètres d'encapsulation (*i.e.* $C_{\text{PTX chargé}}$, paramètres C.M. et E.E.) et de déterminer l'influence de la mise à échelle (*i.e.* 3,5 mL *versus* 8,5 mL) sur ces paramètres.

3.2 Résultats et discussion

Les paramètres d’encapsulation de chaque expérience de relargage, ont été déterminés à $t_0 = 0$ min et comparés à **EG282**. Nous avons également préparé la formulation utilisée pour les tests cellulaires (**EG292**) dans les mêmes conditions qu’**EG291**. Les résultats obtenus figurent dans le *Tableau IV-5*.

Entrées	Protocoles à 7 % _{mass.,(i)} de PTX	C _{PTX} chargé (µg/mL)	C.M. (% _{mass.})	E.E. (% _{mass.})
EG282	Formulation/mise en contact 3,4 mL	1,1 ± 0,2	0,11 ± 0,02	1,6 ± 0,2
EG290	Formulation/relargage passif 3,5 mL	2,5 ± 0,3	0,25 ± 0,03	3,6 ± 0,4
EG291	Formulation/relargage passif 8,5 mL	4,6 ± 1,2	0,46 ± 0,12	6,5 ± 1,7
EG292	Formulation/tests cellulaires 8,2 mL	3,18	0,3	4,5

× 2,4 ↻

Tableau IV-5. Paramètres d’encapsulation à $t_0 = 0$ min pour chaque expérience menée.

Si l’on compare dans un premier temps les paramètres d’encapsulation pour le protocole de mise en contact (**EG282**) avec le suivi de relargage préliminaire (**EG290**) : on remarque que pour un volume de formulation comparable, nous avons une augmentation de la concentration en PTX chargé d’environ 2,2 fois dans le cas de l’expérience de suivi de relargage ; ce qui est assez surprenant.

Nous avons conservé ce résultat de suivi préliminaire (**EG290**) pour observer, lors du suivi cinétique sur 72 h (**EG291**), l’effet de la mise à échelle du volume de formulation, en passant respectivement de 3,5 mL à 8,5 mL de formulation (soit une augmentation de 2,4 fois). Malgré une valeur similaire de %_{mass.,(i)} de PTX, on constate un doublement de la charge en PTX dans les micelles lors de l’expérience **EG291** (*i.e.* de 2,5 à 4,6 µg/mL). La mise à l’échelle a donc une influence sur l’encapsulation.

Cette étude, restée au stade préliminaire, montre qu’il aurait été nécessaire de pouvoir tester d’autres volumes de formulation à ce rapport massique. Compte tenu de cette variabilité des paramètres d’encapsulation C.M. et E.E., en fonction du volume de la

formulation de départ, ces derniers ont été systématiquement mesurés pour les échantillons préparés en vue des tests biologiques (échantillon **EG292**, cf. *tableau IV-5*).

Si on s'intéresse maintenant à la cinétique de relargage passif, la *Figure IV-6* récapitule les 2 expériences menées dans le temps : le suivi préliminaire sur 4 h pour **EG290** et le suivi complet sur 72 h pour **EG291**.

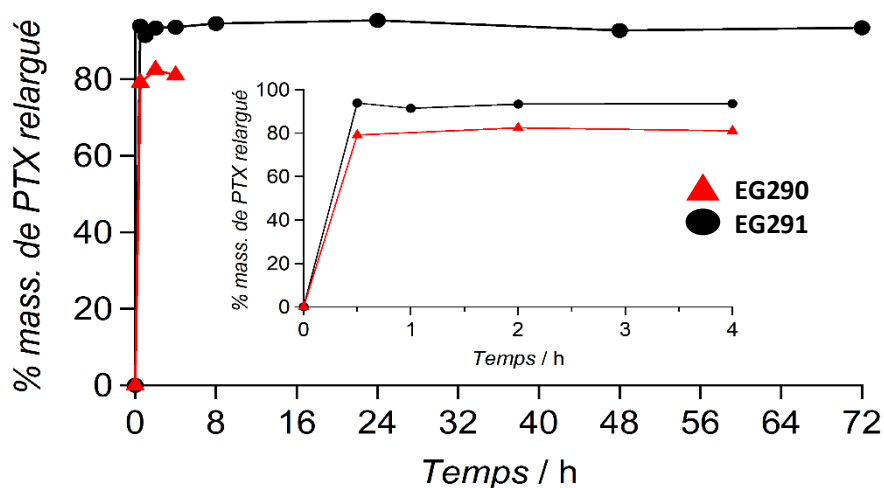


Figure IV-6. Pourcentage massique de PTX relargué passivement (%_{mass.}) au cours du temps.

On remarque que les deux courbes suivent la même tendance avec une inflexion importante au bout de 30 min correspondant à un relargage conséquent de 79 %_{mass.} (**EG290**) et 93 %_{mass.} (**EG291**) du PTX encapsulé. Il semble y avoir un effet de « burst-release » quasi immédiat, c'est-à-dire une libération rapide (environ 30 min) du PTX dans le milieu extérieur.

Au bout de 48 h et 72 h de suivi (cf. *Figure IV-7*), nous avons constaté l'apparition d'un pic de rétention vers 19,7 min, que nous attribuons à une possible dégradation du PTX, étant donné que la formulation est agitée en continu à température ambiante avec présence d'air dans le flacon. Cependant ceci est sans incidence sur l'étude de relargage, puisque pratiquement tout le PTX est libéré au cours des premières minutes d'agitation.

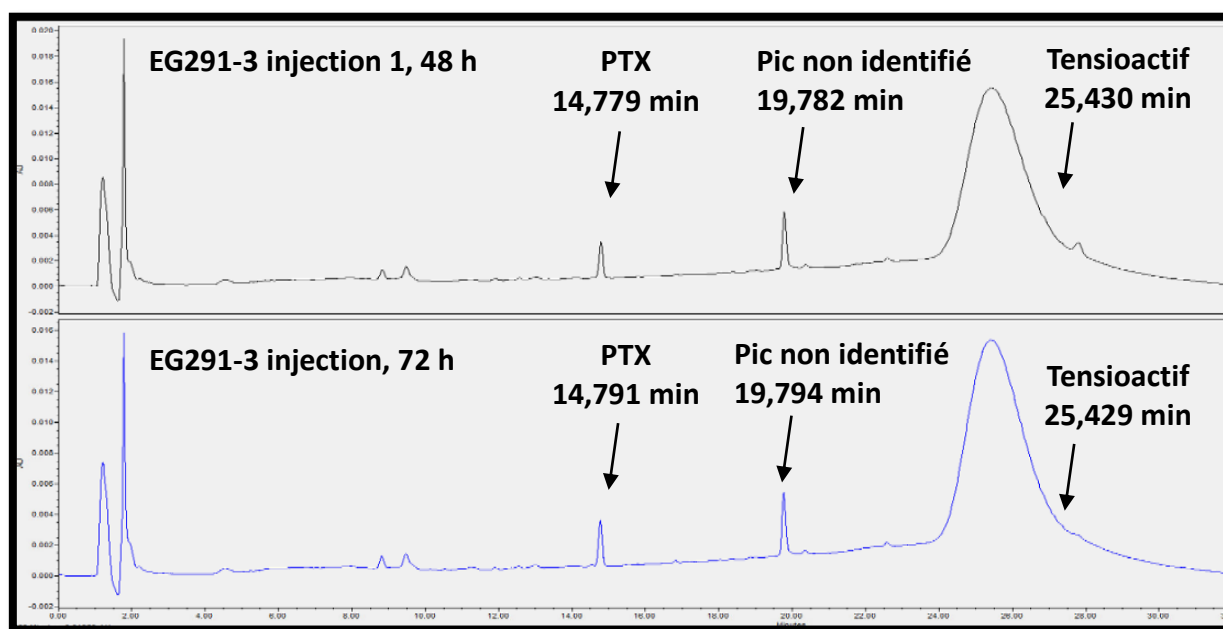


Figure IV-7. Chromatogrammes à t=48 h et t=72 h du relargage de EG291 analysés en CLHP.

Ceci est un argument supplémentaire sur le fait que ce système micellaire ne semble pas approprié pour encapsuler le PTX. Par manque de temps, nous n'avons pas pu tester d'autres tensioactifs afin d'évaluer leur potentiel et éventuellement établir une corrélation structure/rétention du principe actif.

4. Tests de viabilité cellulaire

En parallèle de nos essais de cinétique de relargage passif du PTX hors des micelles **F₈H₁₂PEG2000**, des tests de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) ont été effectués sur la lignée de cellules cancéreuses pulmonaires humaines A549. Elles ont été pré-traités avec différentes concentrations en tensioactif seul ou avec la formulation micellaire chargée à 7 %_{mass.,(i)} de PTX (**EG292**) pendant 72 h. Le choix d'une même lignée cellulaire pour les deux études a été fait pour connaître l'effet du tensioactif sur un même modèle cellulaire avec ou sans présence de PTX.

4.1 Principe du test MTT

Le principe du test colorimétrique au MTT est le suivant¹⁷⁶ : les cellules pré-traitées sont mises en contact avec du MTT, qui va être réduit en composé formazan par action des enzymes oxydoréductases NADPH-dépendantes (succinate déshydrogénase mitochondriale) des cellules vivantes (cf. Schéma IV-7).

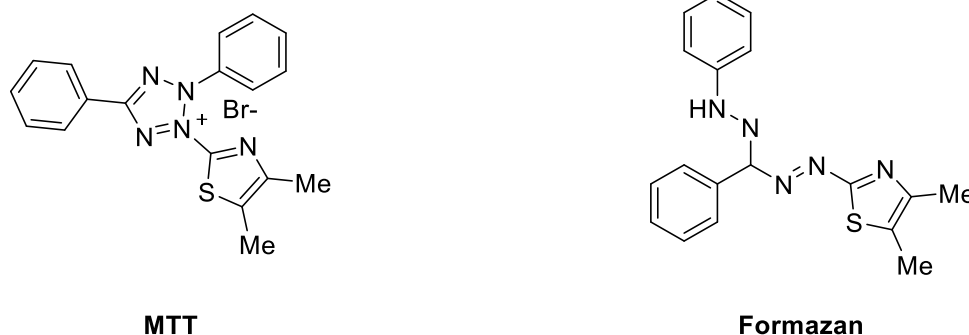


Schéma IV-7. Structures chimiques du MTT et du Formazan¹⁷⁶.

Les cristaux violets de Formazan sont ensuite solubilisés dans un solvant organique (DMSO). Pour chaque puits, l'absorbance est alors mesurée avec un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600 nm. La densité optique d'un puits est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et le pourcentage de viabilité cellulaire est déterminé selon la formule **(IV.1)**:

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{A_{\text{cellules traitées}}}{A_{\text{cellules témoins}}} \times 100 \quad \text{(IV.1)}$$

Où $A_{\text{cellules traitées}}$ représente l'absorbance mesurée de chaque puits de cellules traitées avec le tensioactif ou la solution micellaire chargée en PTX, et $A_{\text{cellules témoins}}$ représente l'absorbance mesurée de chaque puits de cellules témoins sans traitement (considérée comme équivalente à 100 % de viabilité cellulaire).

Le pourcentage de viabilité cellulaire (%) est ensuite représenté graphiquement en fonction de la concentration en tensioactif pour l'étude de l'innocuité du vecteur seul, ou en fonction de la concentration en PTX pour l'étude de l'activité des micelles chargées en PTX vis-

à-vis des cellules A549. La concentration qui inhibe 50 % de la viabilité cellulaire (IC₅₀) est déterminée graphiquement.

4.2 Innocuité du vecteur seul en présence de cellules A549

Le graphique en *Figure IV-8* présente la viabilité cellulaire des cellules A549 après 72 h d'incubation avec différentes concentrations inférieures et supérieures à la cmc supposée (< 1 µM) du tensioactif **F₈H₁₂PEG2000**. Ces concentrations ont été préparées par dilutions successives d'une solution micellaire initiale à 360 µM. Le contrôle est réalisé avec les mêmes quantités de cellules en l'absence de tensioactif (point à 100 % de viabilité cellulaire).

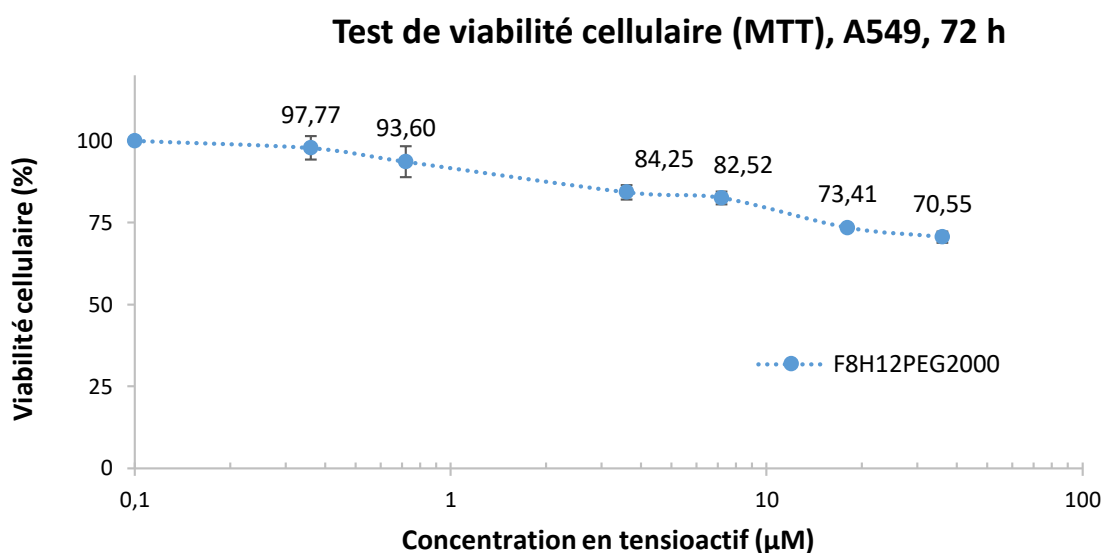


Figure IV-8. Viabilité cellulaire (%) en fonction de la concentration en tensioactif F₈H₁₂PEG2000.

On constate une faible inhibition de la viabilité cellulaire pour des concentrations inférieures < 1 µM (97,8 % pour 0,36 µM et 93,6 % pour 0,72 µM respectivement) ou à des concentrations supérieures à la cmc estimée (82,5 % à 7,2 µM). Cette inhibition de viabilité cellulaire inférieure à 20 % est considérée comme acceptable¹⁷⁷, ce qui permet de conclure que le vecteur seul est biocompatible à des concentrations allant jusqu'à environ 8 µM.

4.3 Etude de l'activité de la formulation micellaire vis-à-vis des cellules A549

La formulation (EG292) utilisée pour les tests de viabilité cellulaire a montré une concentration en PTX chargée dans les micelles de 3,18 µg/mL (soit 3,72 µM en concentration molaire) pour une concentration massique en tensioactif de 1 g/L (soit 360 µM en concentration molaire).

Le graphique en Figure IV-9 présente l'activité des micelles chargées en PTX (cf. courbe orange) sur les cellules A549 après 72 h d'incubation avec différentes concentrations en PTX chargé dans les micelles (de 1 à 75 nM). Ces concentrations ont été préparées par dilutions successives à concentration micellaire constante (7,2 µM). Cette concentration en tensioactif est choisie, parce qu'elle est suffisamment élevée par rapport à la cmc estimée, et parce qu'elle est faiblement toxique (inhibition de viabilité < 20 %).

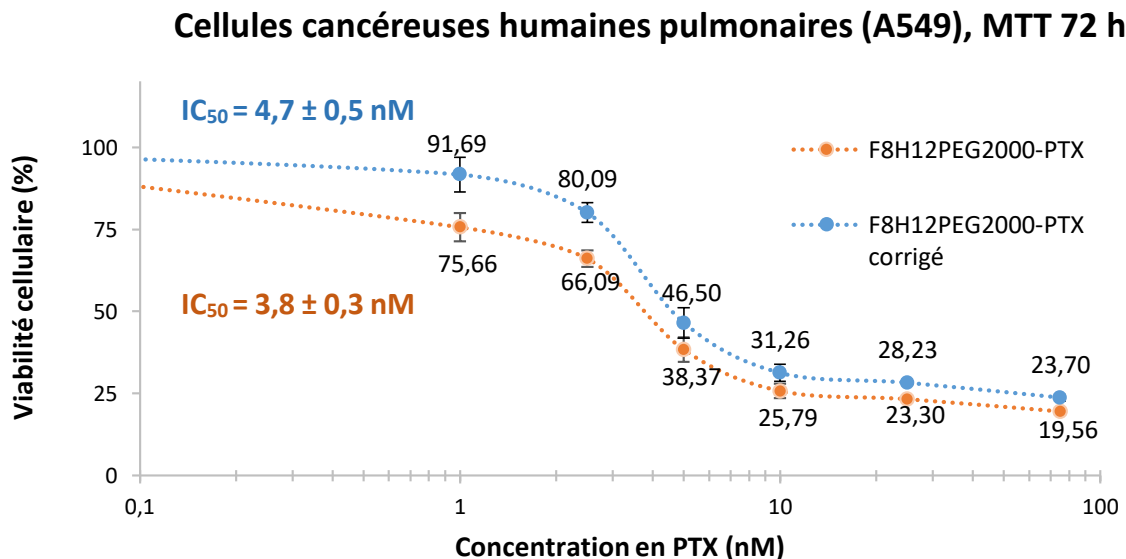


Figure IV-9. Viabilité cellulaire (%) en fonction de la concentration en PTX chargé dans une solution micellaire de concentration fixe en F₈H₁₂PEG2000 à 7,2 µM.

Il apparait que le PTX chargé dans les micelles est toujours actif avec une décroissance majeure de la viabilité cellulaire de 75,7 % à 2,5 nM à 19,56 % à 75 nM de PTX.

Pour comparer l'activité de notre formulation micellaire chargée en PTX à celle du PTX libre (c'est-à-dire non encapsulé) nous avons utilisé les valeurs d'IC₅₀. L'IC₅₀ du PTX libre déterminé dans les mêmes conditions sur les cellules A549 est de $6,3 \pm 1,6$ nM après 72 h de traitement¹⁷⁸. Pour les micelles chargées en PTX, l'IC₅₀ obtenue est de $3,8 \pm 0,3$ nM.

À titre indicatif, pour obtenir uniquement la contribution cytotoxique du PTX chargé dans les micelles (*cf. courbe bleue*) après 72h d'incubation, et en supposant que les toxicités du tensioactif et du PTX soient additives, on s'est affranchi de la contribution cytotoxique du tensioactif à la concentration d'étude (soit induisant ~18 % de mort cellulaire à 7,2 μM) en recalculant les données issues de la courbe orange.

Ainsi, on remarque que l'IC₅₀, liée à la contribution unique du PTX dans les micelles (*cf. courbe bleue*), est légèrement plus haute et égale à $4,7 \pm 0,5$ nM. Cette valeur d'IC₅₀ est comparable à celle du PTX libre de référence ($6,3 \pm 1,6$ nM) ; ce qui semble indiquer que le processus d'encapsulation n'altère pas l'activité pharmacologique du PTX une fois libéré.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons choisi le tensioactif **F₈H₁₂PEG2000** en système micellaire pour encapsuler le PTX. L'utilisation de cet anti-cancéreux actif est à l'heure actuelle limitée par son manque de solubilité dans l'eau, ce qui implique la présence d'excipients toxiques tels que le Cremophor dans les formulations disponibles en clinique.

Nous avons testé plusieurs techniques d'encapsulation possibles avec notre système micellaire, comme *l'injection de solvant organique* et la *dispersion aqueuse d'un film organique sec*. Les résultats en CLHP et DLS ont montré que l'utilisation de la *dispersion aqueuse d'un film organique sec* était la plus appropriée, notamment avec une stabilisation de taille du système micellaire (~17 nm) et l'absence de pics de rétention parasites ou de dégradations éventuelles du PTX ou du tensioactif. L'optimisation de cette méthode au

Chapitre IV – Travaux préliminaires d'encapsulation d'un principe actif au sein des agrégats formés par un tensioactif de la série F₈ PEGylée

laboratoire a conduit à choisir la formulation micellaire à 7 %_{mass.,(i)} de PTX par rapport au système micellaire **F₈H₁₂PEG2000** pour notre formulation.

Toutefois, les paramètres C.M. et d'E.E. ne sont pas reproductibles : ils varient à même quantité de formulation en fonction du protocole utilisé (mise en contact et relargage passif), et lorsque l'on augmente le volume de formulation d'un facteur 2,4 sur le même protocole de relargage passif. De plus, quelle que soit l'expérience menée, nous avons constaté un relargage passif d'au minimum 80 % du PTX chargé au bout de 30 min, s'apparentant au « burst-release » qui existe avec un relargage classique (*i.e.* relargage dans un système dilué comme le tampon PBS mimant le système physiologique).

Tous ces éléments nous indiquent que ce système micellaire n'est pas suffisamment efficace pour encapsuler le PTX. Il ne donne pas d'effet retard dans la libération du principe actif, ce qui limite son intérêt pour le traitement des tumeurs cancéreuses.

En parallèle des études de relargage, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés par nos collaborateurs de l'Institut de NeuroPhysiopathologie (équipe GliOME) à AMU. Les cellules A549 ont ainsi été choisies pour tester l'innocuité du vecteur PEGylé seul et pour comparer l'activité cytotoxique du PTX libre et de la formulation micelles-PTX étudiée sur les cellules A549. Les résultats obtenus confirment que le tensioactif seul est biocompatible à des concentrations en dessous et au-dessus de sa cmc estimée, jusqu'à 8 µM.

En revanche, le système Micelles-PTX ne montre pas d'amélioration de l'effet cytotoxique du PTX lorsqu'il est encapsulé en comparaison au PTX libre. Ceci est peu surprenant, dans la mesure où nos micelles ont montré un relargage très rapide du PTX en milieu aqueux. Il est fort probable que le PTX soit complètement sous forme libre dans les cultures cellulaires après moins d'une heure d'incubation.

Cependant, le temps de traitement de 72 h est inhérent au protocole des tests cellulaires, car il permet de s'assurer que le processus de mort cellulaire soit achevé et ne peut être réduit pour s'adapter à la cinétique de relargage très rapide du vecteur. Ce résultat indique toutefois que le processus d'encapsulation mis en œuvre n'altère pas l'activité du PTX.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion Générale

Le contexte général, dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse, montre le rôle majeur que jouent les tensioactifs comme outils de construction de nouveaux nanovecteurs pour la délivrance de principes actifs. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés dans une première partie de ce travail, à la classe des tensioactifs hybrides bicaténaires fluorocarbonés-hydrocarbonés (F-H). Ces tensioactifs présentent la particularité de combiner une chaîne perfluorocarbonée et une chaîne hydrocarbonée au sein d'une même structure chimique. Ils partagent certaines propriétés physico-chimiques avec leurs analogues perfluorocarbonés tels que : l'abaissement de la tension de surface de l'eau ou encore des cmc basses. Ils présentent également des propriétés uniques liées à leur hybridité. Les structures chimiques des hybrides F-H décrits dans la littérature, ainsi que leurs propriétés et applications, sont résumées dans le premier chapitre. Malgré un intérêt marqué dans le domaine biomédical pour la classe des tensioactifs non ioniques hybrides F-H, très peu d'études en lien avec le *drug delivery* ont été menées.

Nous avons ensuite décrit la synthèse de 10 nouvelles molécules à parti d'un acide aminé, la sérine, séparées en deux séries de têtes hydrophiles différentes, à motifs PEGylés et glucosylés. Malgré les difficultés rencontrées au cours de l'exploration des différentes voies de synthèse, nous avons réussi à synthétiser 4 blocs hybrides F-H à chaîne fluorocarbonée de 6 à 8 atomes de carbone, et à chaîne hydrocarbonée de 6 à 12 atomes de carbone. Par une réaction de cycloaddition de Huisgen 1,3-dipolaire, les différentes têtes polaires propargyles PEGylées ou glycosylées ont été greffées sur ces blocs hybrides dans des conditions douces, et avec des rendements très satisfaisants (entre 74 % et 89 %).

Par la suite, les agrégats formés par ces 10 tensioactifs hybrides F-H dans l'eau ont fait l'objet d'une étude physico-chimique approfondie.

Pour les tensioactifs PEGylés présentant une forte hydrosolubilité, différents paramètres tels que la concentration micellaire critique (cmc), la tension de surface ou encore la thermodynamique de micellisation, ont été étudiés par des techniques d'analyse à haute sensibilité (tensiométrie, titration calorimétrique isotherme, spectrofluorimétrie). Nous avons confirmé que leurs propriétés de surface sont similaires aux tensioactifs fluorocarbonés conventionnels (~entre 26 et 33 mN/m). L'impact des longueurs de chaîne fluorocarbonée sur ces paramètres, ainsi que sur les tailles d'agrégats formés par les dérivés F₆ et F₈ PEGylés, a

Conclusion Générale

été investigué par diffusion de la lumière. Globalement, les agrégats PEGylés présentent des diamètres hydrodynamiques, et des nombres d'agrégation qui augmentent avec l'hydrophobie des molécules. D'un côté, les dérivés F₆ PEGylés présentent des cmc basses (7–125 µM) et forment des micelles dont les tailles (entre 10 et 15 nm) peuvent s'apparenter à celles de micelles globulaires larges. De l'autre, les dérivés F₈ PEGylés présentent des cmc que nous avons estimées inférieures à 1 µM. Des difficultés de détermination de ce paramètre ont été rencontrées pour cette série. Leurs agrégats présentent des tailles plus disparates, entre 10 et 57 nm de diamètre, ce qui suggère un changement morphologique important au sein de la série. Ceci a pu être confirmé en microscopie électronique à transmission (MET). En effet, la taille de la tête, joue également un rôle clé dans la morphologie des agrégats ; et par conséquent, la présence de micelles globulaires pour les dérivés à tête polaire PEG2000 et de micelles cylindriques pour les dérivés à tête polaire PEG750 a pu être suggérée.

Pour les tensioactifs glucosylés (**F₆H₆_Glucose** et **F₆H₈_Glucose**), leur faible solubilité dans l'eau nous a amenée à les imaginer comme systèmes vésiculaires. Leurs tailles et formes ont été étudiées en diffusion de la lumière, par imagerie MET et par cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-ME). Nous avons observé des vésicules multi-lamellaires (MLV) hétérogènes en taille avec une organisation originale des chaînes hydrophobes, sous forme de phases hydrocarbonés/fluorocarbonés dans le cas de **F₆H₈_Glucose**. Pour le **F₆H₆_Glucose**, des vésicules uni-lamellaires (VUL) homogènes en taille, à 100 nm environ, ont été formées. Celles-ci ont montré une stabilité d'au moins 1 mois dans des conditions physiologiques, nous confortant dans notre choix de les utiliser ultérieurement comme vecteurs potentiels de principes actifs hydrophiles.

Au cours du dernier chapitre, nous avons choisi le dérivé F₈ PEGylé **F₈H₁₂PEG2000** comme système micellaire candidat, pour tester son efficacité d'encapsulation vis-à-vis du Paclitaxel (PTX), un actif hydrophobe très étudié dans la littérature. Nous avons essayé plusieurs méthodes d'encapsulation possibles et comparé différentes conditions expérimentales ; pour optimiser les paramètres d'encapsulation étudiés (charge médicamenteuse et efficacité d'encapsulation) par chromatographie en phase liquide à haute performance. Ainsi, la formulation à 7 % massique initial de PTX avec la méthode de *dispersion aqueuse d'un film organique sec*, a été choisie. Les résultats ont indiqué une capacité toutefois

Conclusion Générale

limitée à encapsuler le PTX au sein de nos micelles, ne dépassant pas 1 % massique de charge médicamenteuse, contrairement à des systèmes polymériques plus performants décrits dans la littérature. Notre système micellaire a, par ailleurs, montré un relargage trop rapide de la quasi-totalité de la charge en PTX en 30 min, s'apparentant à un effet de « burst-release », limitant l'intérêt de ces micelles pour une utilisation en *drug delivery*.

Les 1^{ers} tests cellulaires réalisés sur des cellules tumorales pulmonaires A549 ont montré des résultats préliminaires intéressants : d'une part, la toxicité limitée du tensioactif seul en dessous et au-dessus de sa cmc, avec une inhibition de viabilité cellulaire inférieure à 20 % pour des concentrations en vecteur allant jusqu'à environ 8 μ M. D'autre part, l'absence d'altération de l'activité pharmacologique du PTX chargé par rapport à la méthode d'encapsulation choisie. Il conviendrait de tester avec cette méthode les autres tensioactifs de la série, pour étudier l'influence de leur structure sur les paramètres d'encapsulation et le suivi cinétique du relargage passif de l'actif.

En complément des travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons commencé à explorer l'application des VUL de **F₆H₆_Glucose** en tant que nanovecteurs d'un anti-cancéreux hydrophile, la doxorubicine. L'une des pistes serait d'encapsuler cet actif au sein de nos vésicules, par une méthode de gradient de pH transmembranaire basée sur la variation de pH des milieux intra-extra vésiculaires, et permettant à l'actif de s'accumuler efficacement à l'intérieur des vésicules.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Synthèse et caractérisation des tensioactifs hybrides F–H

1.1 Outils de synthèse

Les composés de départ, les solvants de qualité de synthèse, et les réactifs utilisés tout au long des synthèses, sont disponibles commercialement et ont été utilisés tels quels. Le THF, le DMF et le DCM ont été séchés préalablement sur tamis moléculaire 4-Å et conservés sous atmosphère d'argon avant utilisation.

Le suivi réactionnel et la composition des produits bruts ont été suivis en routine par ccm (plaques de silice 60 F254, Merck). La détection des composés a été obtenue par exposition à la lumière UV (254 nm) et/ou après révélation dans une solution éthanoïque à 2 % de permanganate de potassium (KMnO₄), dans une solution éthanoïque à 5 % d'acide sulfurique (H₂SO₄) ou bien dans une solution éthanoïque à 2 % de ninhydrine. Celle-ci a été poursuivie par un chauffage à environ 150 °C jusqu'à apparition d'une coloration.

Les purifications des intermédiaires ont été rendues possibles par chromatographie flash sur gel de silice (40–63 µm) avec un système d'appareillage CombiFlash (Serlabo technologies, France). Les purifications des intermédiaires **28** et **29** et des tensioactifs hybrides F–H finaux ont été faites par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne de Sephadex LH-20 avec un éluant 100 % MeOH. Les fractions purifiées ont ensuite été lyophilisées en utilisant un lyophilisateur CHRIST Alpha 1-2 LD PLUS. Les points de fusion ont été déterminés avec un appareillage Electrotherma IA9100.

Les spectres RMN ont été déterminés par un spectromètre Bruker AC400 à des fréquences de 400, 100 et 375 MHz pour, respectivement, les analyses RMN ¹H, ¹³C and ¹⁹F. Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm par rapport au pic de calibration du solvant résiduel en RMN ¹H et ¹³C. Les abréviations utilisés pour la forme des signaux RMN sont : se, singulet élargi; s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet; dd, doublet de doublet.

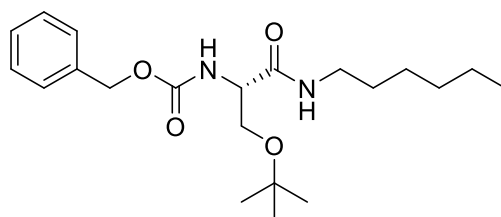
Les spectres de masse à haute résolution (HRSM) ont été déterminés par un spectromètre de masse Synapt G2-S (Waters) équipé d'un détecteur TOF pour les expériences d'électronébulisation positive (ESI+). Les spectres de masse (MALDI)-TOF/SM des tensioactifs PEGylés (spectromètre de masse couplé à une source d'ionisation laser assistée par une matrice) ont été enregistrés par un spectromètre de masse RapifleX (Bruker).

La pureté des tensioactifs hybrides F–H a été évaluée par CLHP (Shimadzu) à détection photodiodes. La colonne utilisée est une colonne XTerra RP18 (porosité 5 μm ; 100 \times 2,1 mm, 5 μm , Waters). Le gradient d'élution utilisé est MeCN/eau à 0,1 % de TFA (v/v) comme suivant : entre 0–2 min, élution isocratique à 2% d'acétonitrile ; entre 2–22 min, gradient d'élution de 2 % à 80 % de MeCN ; entre 22–26 min, élution isocratique à 80 % jusqu'à 35 min (fin de l'acquisition). De l'eau milli-Q (résistivité de 18.2 M Ω .cm, tension de surface de 71,45 mN/m à 25 °C) est utilisée comme solvant d'élution.

La caractérisation de tous les composés synthétisés au cours de ses travaux de thèse a été décrite en *section 1.2*.

1.2 Caractérisation des molécules synthétisées au cours de la thèse

(S)-benzyl-(3-(*tert*-butoxy)-1-(hexylamino)-1-oxopropan-2-yl) carbamate (**1a**).



À une solution de Z-Ser(*t*Bu)-OH (2 g; 6,78 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (30 mL), Et₃N (1,89 mL; 13,73 mmol; 2 équiv.) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 5 min à t.a. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C, puis 1-hexylamine (0,99 mL; 7,46 mmol; 1,1 équiv.) est incorporé. 10 min plus tard, PyBOP (4,22 g; 8,14 mmol; 1,2 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 30 min puis est laissé revenir à t.a. pendant 21 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée, puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du DCM (3 \times). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite.

Matériel et méthodes

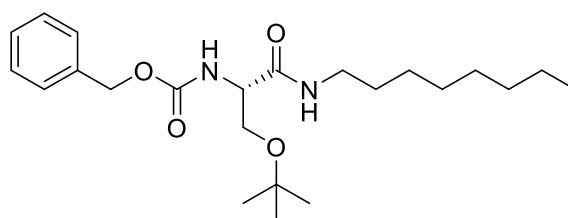
pour donner le composé **1a** (2,28 g; 89 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v).

R_f (cyclohexane/ AcOEt, 6:4 v/v) = 0,33. Tf: 94,4–94,8 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,37–7,29 (m, 5H); 6,55 (se, 1H); 5,73 (se, 1H); 5,11 (q, *J* = 5,1 Hz, 3H); 4,17 (m, 1H); 3,81 (m, 1H); 3,35 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H); 3,25 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,47 (m, 2H); 1,32–1,28 (m, 10H); 1,18 (s, 9H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 170,2; 156,2; 136,3; 128,7 (2 × CH_{Ar}); 128,4; 128,3 (2 × CH_{Ar}); 74,2; 67,2; 62,0; 54,7; 39,7; 31,6; 29,6; 27,6 (3 × CH₃); 26,6; 22,7; 14,1.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₁H₃₅N₂O₄ = 379,2597; trouvé = 379,2595.

(S)-benzyl-(3-(*tert*-butoxy)-1-(octylamino)-1-oxopropan-2-yl) carbamate (**1b**).



À une solution de Z-Ser(*t*Bu)-OH (2 g; 6,78 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (30 mL), Et₃N (1,89 mL; 13,73 mmol; 2 équiv.) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 5 min à t.a. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C, puis 1-octylamine (1,23 mL; 7,46 mmol; 1,1 équiv.) est incorporé. 10 min plus tard, PyBOP (4,22 g; 8,14 mmol; 1,2 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 30 min puis est laissé revenir à t.a. pendant 21 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée, puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du DCM (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **1b** (2,51 g; 91 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v).

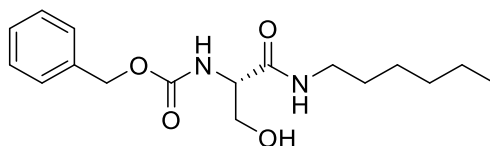
R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,36. Tf: 96,0–96,3 °C.

Matériel et méthodes

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,36–7,30 (m, 5H); 6,54 (se, 1H); 5,73 (se, 1H); 5,12 (q, *J* = 5,1 Hz, 3H); 4,17 (m, 1H); 3,81 (m, 1H); 3,36 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H); 3,26 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H); 1,48 (m, 2H); 1,28–1,26 (m, 10H); 1,18 (s, 9H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 170,2; 156,2; 136,3; 128,7 (2 × CH_{Ar}); 128,4; 128,3 (2 × CH_{Ar}); 74,2; 67,2; 62,0; 54,7; 39,7; 31,9; 29,6; 29,4; 29,3; 27,6 (3 × CH₃); 27,0; 22,8; 14,2.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₃H₃₉N₂O₄ = 407,2910; trouvé = 407,2918.

(S)- benzyl-(1-(hexylamino)-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl) carbamate (**2a**).



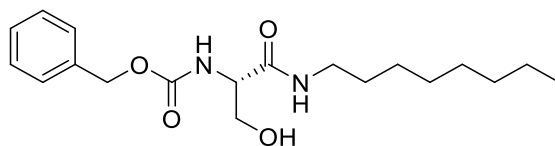
À une solution de **1a** (450 mg; 1,19 mmol; 1 équiv.) dans un mélange de 10 mL de DCM/TFA (1:1 v/v), est ajouté l'anisole (0,25 mL; 2,38 mmol; 2 équiv.) goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. pendant 24 h puis le TFA est co-éaporé avec Et₂O (3×). Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) pour donner le composé **2a** (263 mg; 69 %) sous forme de poudre blanche.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,11. Tf: 100,2–100,8 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CH₃OD): δ 7,96 (se, 1H); 7,38–7,30 (m, 5H); 5,10 (s, 2H); 4,17 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H); 3,75 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H); 3,19 (m, 1H); 1,49 (m, 2H); 1,31 (m, 6H); 0,90 (t, *J* = 6,3 Hz, 3H), **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 172,7; 158,4; 138,1; 129,5 (2 × CH_{Ar}); 129,0; 128,9 (2 × CH_{Ar}); 67,8; 63,3; 58,6; 40,5; 32,6; 30,3; 27,6; 23,6; 14,3.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₇H₂₇N₂O₄ = 323,1971; trouvé = 323,1977.

(*S*)-benzyl-(1-(octylamino)-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl) carbamate (**2b**).



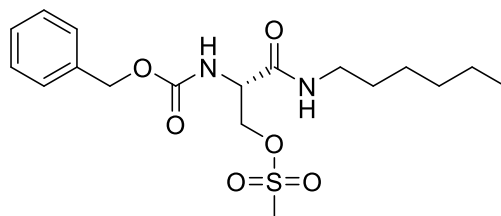
À une solution de **1b** (362 mg; 0,89 mmol; 1 équiv.) dans un mélange de 10 mL de DCM/TFA (1:1 v/v), est ajouté l'anisole (0,2 mL; 1,78 mmol; 2 équiv.) goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. pendant 17 h puis le TFA est co-évolué avec Et₂O (3×). Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) pour donner le composé **2b** (247 mg; 79 %) sous forme de poudre blanche.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,16. Tf: 104,1–104,6 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,39–7,31 (m, 5H); 6,52 (se, 1H); 5,81 (se, 1H); 5,13 (m, 2H); 4,16–4,12 (m, 2H); 3,65 (m, 1H); 3,23 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,48 (m, 2H); 1,27 (m, 10H); 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 171,1; 157,2; 136,1; 128,7 (2 × CH_{Ar}); 128,5; 128,2 (2 × CH_{Ar}); 67,5; 62,9; 55,0; 39,7; 31,9; 29,5; 29,3 (2 × CH₂); 26,9; 22,8; 14,2.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₉H₃₁N₂O₄ = 351,2284; trouvé = 351,2291.

(*S*)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-(hexylamino)-3-oxopropyl methanesulfonate (**3**).



À une solution de **2a** (98 mg; 0,31 mmol; 1 équiv.) solubilisé dans 5 mL d'un mélange anhydre de DCM/THF (2:1 v/v), est ajouté Et₃N (0,29 mL; 21 mmol; 6,8 équiv.). Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C puis est placé sous une atmosphère d'argon pendant 10 min. Le chlorure de méthanesulfonyle MsCl (0,15 mL; 1,93 mmol; 6,3 équiv.) est ensuite ajouté

Matériel et méthodes

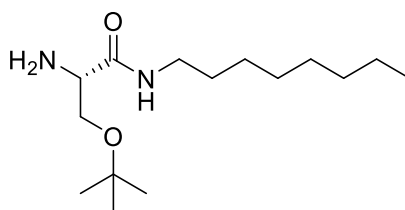
goutte-à-goutte à travers un septum. Le milieu réactionnel est ensuite laissé à 0 °C pendant 2 h. Puis le DCM et le THF sont évaporés du milieu sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées deux fois avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) pour donner le composé **3** (100 mg; 80 %) sous forme de poudre blanche.

R_f (cyclohexane/ AcOEt, 7:3 v/v) = 0,21. Tf: 98,6–99,3 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,40–7,31 (m, 5H); 6,25 (se, 1H); 5,60 (se, 1H); 5,13 (m, 2H); 4,66–4,62 (dd, *J*=4,2 Hz, *J*= 10,3 Hz, 1H); 4,51 (m, 1H); 4,37–4,34 (dd, *J*=4,8 Hz, *J*= 10,3 Hz, 1H); 3,25 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H); 3,01 (s, 3H); 1,48 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 1,32–1,25 (m, 6H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 167,69; 156,3; 135,8; 128,8 (2 × CH_{Ar}); 128,6; 128,4 (2 × CH_{Ar}); 68,9; 67,8; 54,0; 40,1; 37,5; 31,5; 29,5; 26,6; 22,6; 14,1.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₇H₃₅N₂O₆S = 401,1746; trouvé = 401,1746.

(S)-2-amino-3-(*tert*-butoxy)-*N*-octylpropanamide (**4**).



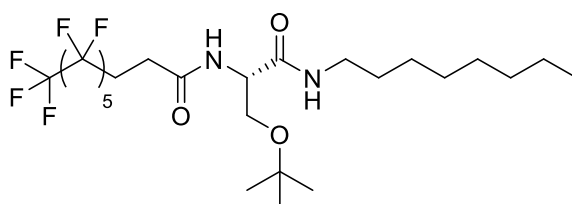
À une solution de **1b** (2 g; 4,91 mmol; 1 équiv.) dans le MeOH (50 mL) est ajouté le catalyseur Pd-C (159 mg; 8 %_{mass.}). Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 19 h à une pression de 6,6 bar de H_{2(g)} dans un hydrogénateur catalytique. La solution est ensuite filtrée sous célite et concentrée sous pression réduite. Le produit brut **4** est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement quantitatif (1,60 g) et est utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse sans étape de purification.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,11.

Matériel et méthodes

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 3,50 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H); 3,36 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 3,26–3,14 (m, 2H); 3,26 (m, 2H); 1,51 (m, 2H); 1,32–1,30 (m, 10H); 1,18 (s, 9H); 0,90 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD):** δ 175,45; 74,27; 65,31; 56,53; 40,31; 32,96; 30,46; 30,39; 30,35; 27,95; 27,72; 23,67; 14,36. **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z :** $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2 = 273,2542$; trouvé = 273,2551.

(*S*)-*N*-(3-(*tert*-butoxy)-1-(octylamino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9 tridecafluorononanamide (**5**).



À une solution de **4** (1,34 g; 4,91 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (30 mL), Et_3N (1,25 mL; 9,83 mmol; 2 équiv.) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 5 min à t.a. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C, puis le réactif 2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-acide perfluorononanoïque (2,14 g; 5,41 mmol; 1,1 équiv.) est ajouté en une seule portion. 10 min plus tard, PyBOP (3,07 g; 5,89 mmol; 1,2 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 30 min puis est laissé revenir à t.a. pendant 12 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ saturée, puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du DCM (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau et une solution de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ saturée, séchées sur $\text{MgSO}_{4(\text{s})}$ anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **5** (2,39 g; 77 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/ AcOEt , 8:2 v/v).

R_f (cyclohexane/ AcOEt , 8:2 v/v) = 0,30. Tf: 96,0–96,3 °C.

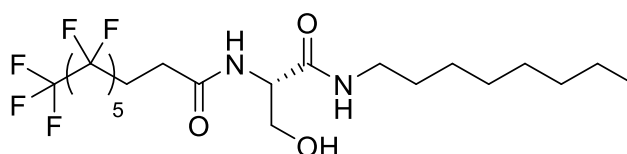
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 6,63 (m, 2H); 4,34 (m, 1H); 3,80–3,77 (dd, $J = 4,2$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 1H); 3,34–3,19 (m, 3H); 2,57–2,43 (m, 4H); 1,53–1,46 (m, 2H); 1,30–1,27 (m, 10H); 1,21 (s, 9H);

Matériel et méthodes

0,87 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)**: δ 170,07; 169,92; 74,56; 61,48; 53,11; 39,74; 31,91; 29,58; 29,34; 29,32; 27,58; 27,11; 27,02; 26,80; 22,74; 14,18. **RMN ^{19}F (375 MHz, CDCl_3)**: δ -80,8 (3F); -114,6 (2F); -121,9 (2F); -122,9 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{F}_{13}\text{N}_2\text{O}_3 = 647,2518$; trouvé = 647,2542.

(S)-4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoro-*N*-(3-hydroxy-1-(octylamino)-1-oxopropan-2-yl)nonanamide (**6**).



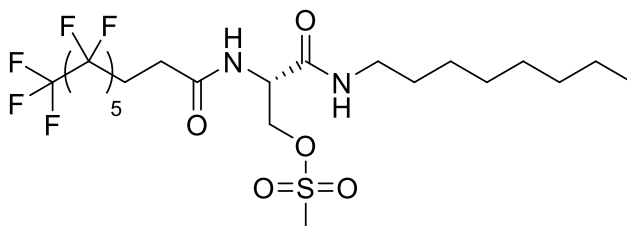
À une solution de **5** (2,39 g; 3,70 mmol; 1 équiv.) dans un mélange de 30 mL de DCM/TFA (6:1 v/v), est ajouté l'anisole (0,8 mL; 7,32 mmol; 2 équiv.) goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. pendant 32 h puis le TFA est co-éaporé avec Et_2O (3 \times). Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) pour donner le composé **6** (1,59 g; 72 %) sous forme de poudre blanche.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,15. Tf: 131,8–132,5 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,81 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,66 (se, 1H); 4,38 (m, 1H); 4,16–4,12 (dd, $J = 2,8$ Hz, $J = 11,5$ Hz, 1H); 3,62–3,58 (dd, $J = 4,7$ Hz, $J = 11,5$ Hz, 1H); 3,23 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H); 2,60–2,44 (m, 4H); 1,48 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 1,28–1,25 (m, 10H); 0,87 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)**: δ 171,03; 170,83; 62,74; 53,75 39,77; 31,91; 29,44; 29,31 (2 \times -CH₂); 27,11 (-CH₂); 26,98 (-CH₂); 26,76(-CH₂); 22,75 (-CH₂); 14,18 (-CH₃). **RMN ^{19}F (375 MHz, CDCl_3)**: δ -80,78 (3F); -114,58 (2F); -121,88 (2F); -122,86 (2F); -123,49 (2F); -126,12 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{F}_{13}\text{N}_2\text{O}_3 = 591,1892$; trouvé = 591,1897.

(*S*)-3-(octylamino)-3-oxo-2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanamido)propyl
methanesulfonate (**7**).



Le composé **6** (300 mg; 0,51 mmol; 1 équiv.) est solubilisé dans 15 mL d'un mélange anhydre de DCM/THF (2:1 v/v). Le milieu réactionnel est refroidi à -10 °C et Et₃N (0,36 mL; 2,54 mmol; 5 équiv.) est ajouté. Celui-ci ensuite placé sous une atmosphère d'argon pendant 10 min puis MsCl (0,1 mL; 1,27 mmol; 2,5 équiv.) est ajouté goutte-à-goutte à travers un septum. Le milieu réactionnel est ensuite laissé à -10 °C pendant 1 h. Puis le DCM et le THF sont évaporés du milieu sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de HCl_(aq) 1M, une solution de NaHCO_{3(aq)} saturée et une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **7** (329 mg; 94 %) qui est utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse sans étape de purification.

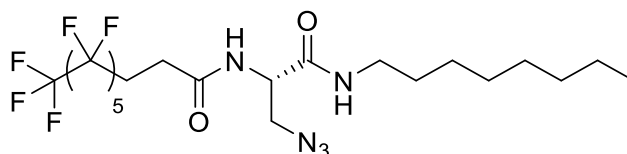
R_f (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v) = 0,48. Tf: 98,2–99,0 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,73 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 6,33 (se, 1H); 4,76 (m, 1H); 4,60–4,56 (dd, *J* = 4,9 Hz, *J* = 10,7 Hz, 1H); 4,38–4,34 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 10,7 Hz, 1H); 3,28–3,22 (m, 2H); 3,06 (s, 3H); 2,61–2,45 (m, 4H); 1,49 (t, *J* = 7,1 Hz 2H); 1,28–1,25 (m, 10H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 170,77; 167,56; 68,32; 52,28; 40,15; 37,68; 31,89; 29,29; 29,28; 27,12; 26,93; 26,61; 22,73; 14,16. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃):** δ -80,8 (3F); -114,5 (2F); -121,9 (2F); -122,9 (2F); -123,5 (2F); -126,12 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₁H₃₀F₁₃N₂O₅S = 669,1668; trouvé = 669,1667.

(*S*)-*N*-(3-azido-1-(octylamino)-1-oxopropan-2-yl)-4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononanamide (**8**).



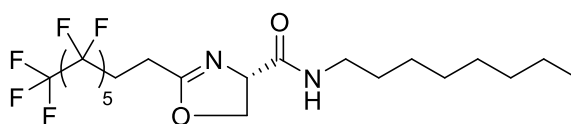
À une solution de **7** (50 mg; 0,07 mmol; 1 équiv.) dans le DMF anhydre (2 mL) est ajoutée une solution de NaN_3 (25 mg; 0,37 mmol; 5 équiv.) dans 1,6 mL de DMF anhydre, puis le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 70 °C. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, séchées sur MgSO_4 anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **8** (11 mg; 23 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v).

Rf (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) = 0,32. Tf: 112,0–112,2 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,82 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H); 6,37 (se, 1H); 4,58 (m, 1H); 4,54–4,49 (dd, $J = 6,9$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H); 3,74–3,70 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 12,3$ Hz, 1H); 3,33–3,19 (m, 2H); 2,60–2,43 (m, 4H); 1,51 (t, $J = 7,0$ Hz 2H); 1,29–1,26 (m, 10H); 0,87 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 170,42; 168,80; 52,61; 52,08; 40,15; 31,89; 29,44; 29,30; 29,29; 27,06; 26,96; 26,67; 22,73; 14,16. **RMN ^{19}F (375 MHz, CDCl_3):** δ -80,8 (3F); -114,6 (2F); -121,9 (2F); -122,9 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_{13}\text{N}_5\text{O}_2 = 616,1957$; trouvé = 616,1962.

(*S*)-*N*-octyl-2-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorooctyl)-4,5-dihydrooxazole-4-carboxamide (**9**).



Matériel et méthodes

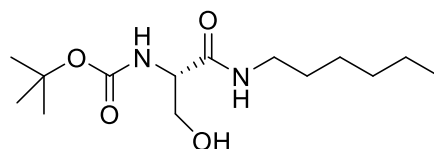
Le composé **9** (16 mg; 37 %) sous forme d'une poudre blanche, est obtenu comme un sous-produit de la réaction de substitution de la synthèse du composé **8**, après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) = 0,23. Tf: 77,7–78,8 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,47 (se, 1H); 4,63 (m, 1H); 4,55–4,45 (m, 2H); 3,33–3,17 (m, 2H); 2,65–2,44 (m, 4H); 1,50 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,29–1,25 (m, 10H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 171,22; 168,08; 70,92; 68,67; 39,38; 31,88; 29,55; 29,32; 29,28; 26,98; 22,72; 19,79; 14,16. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃):** δ -80,8 (3F); -114,8 (2F); -121,9 (2F); -122,8 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₀H₂₆F₁₃N₂O₂ = 573,1787; trouvé = 573,1787.

tert-Butyl *N*-[1-(hydroxyméthyl)-2-(hexylamino)-2-oxoéthyl]carbamate (**10a**).



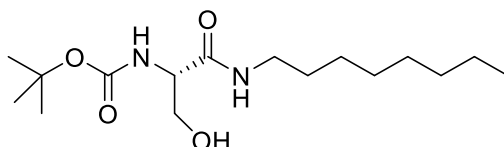
À une solution de Boc-L-sérine (2 g; 9,75 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (50 mL) est ajouté Et₃N (2,63 mL; 19,5 mmol; 2 équiv.) à 0 °C. Après 5 min d'agitation, 1-hexylamine (1,42 mL; 10,73 mmol; 1,1 équiv.) est incorporé. 10 min plus tard, PyBOP (6,09 g; 11,70 mmol; 1,2 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 1 h puis est laissé revenir à t.a. pendant 18 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée (40 mL), puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **10a** (2,57 g; 91 %) sous forme d'une huile transparente après purification sur chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,33.

Matériel et méthodes

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 4,07 (m, 1H); 3,72 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,28–3,12 (m, 2H); 1,51 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); 1,35–1,29 (m, 6H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD):** δ 173,01; 157,68; 80,81; 63,31; 58,19; 40,45; 32,65; 30,31; 28,63; 27,56; 23,61; 14,34. **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ calculé pour C₁₄H₂₉N₂O₄ = 289,2122; trouvé = 289,2128.

tert-Butyl *N*-[1-(hydroxyméthyl)-2-(octylamino)-2-oxoéthyl]carbamate (**10b**).

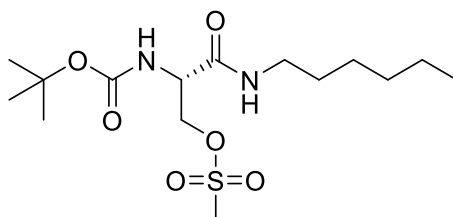


À une solution de Boc-L-sérine (2 g; 9,75 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (60 mL) est ajouté HOBt (1,32 g; 9,75 mmol; 1 équiv.) à 0 °C. Le pH du milieu réactionnel est ensuite ajusté à 8-9 avec le réactif *N*-méthylmorpholine. Après 5 min d'agitation, le 1-octylamine (1,77 mL; 10,73 mmol; 1,1 équiv.) est ajouté au milieu réactionnel. 10 min plus tard, DCC (2,21 g; 10,73 mmol; 1,1 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 1 h puis est laissé revenir à t.a. pendant 17 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée (40 mL), puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **10b** (2,45 g; 80 %) sous forme d'une poudre blanche après purification sur chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v) = 0,34. Tf: 58,5 –59,2 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 4,07 (m, 1H); 3,72 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,27–3,12 (m, 2H); 1,51 (m, 2H); 1,45 (s, 9H); 1,31 (m, 10H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD):** δ 172,96; 156,53; 79,63; 63,31; 58,11; 40,46; 32,97; 30,40; 30,35; 28,64; 27,90; 23,69; 14,38. **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ calculé pour C₁₆H₃₃N₂O₄ = 317,2435; trouvé = 317,2431.

tert-Butyl *N*-[1-(methylsulfonyloxy)-2-(hexylamino)-2-oxoethyl]carbamate (**11a**).



À une solution de Boc-L-sérine (500 mg; 2,43 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (10 mL) est ajoutée HOBt (328 mg ; 2,43 mmol ; 1 équiv.) à 0 °C. Le pH du milieu réactionnel est ensuite ajusté à 8-9 avec le réactif *N*-méthylmorpholine. Après 5 min d'agitation, le 1-hexylamine (0,32 mL ; 2,43 mmol ; 1 équiv.) est ajouté au milieu réactionnel. 10 min plus tard, DCC (527 mg ; 2,55 mmol ; 1,05 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à -10 °C pendant 1 h, puis est laissé revenir à t.a. pendant 18 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée (40 mL), puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé brut **10a** (542 mg; 1,88 mmol ; rendement = 77 %) réutilisé tel quel sans étape de purification. R_f (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v) = 0,23.

Le composé brut **10a** (300 mg ; 0,51 mmol ; 1 équiv.) est ensuite solubilisé dans du DCM anhydre (10 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à -10 °C et Et₃N (0,31 mL ; 2,26 mmol ; 1,2 équiv.) est ajouté, puis l'ensemble est placé dans une atmosphère d'argon pendant 10 min. MsCl (0,17 mL ; 2,26 mmol ; 1,2 équiv.) est ensuite ajouté au goutte-à-goutte à travers un septum. Le milieu réactionnel est laissé à -10 °C pendant 1 h 30, puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée (2×), séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) pour obtenir le composé **11a** (372 mg; 42 %) sous forme d'une poudre blanche.

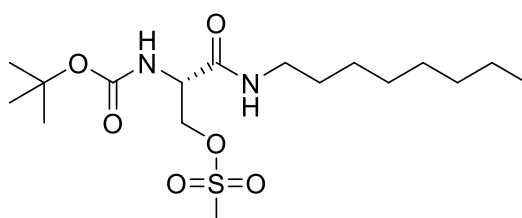
R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,25. Tf: 86,6–86,8 °C.

Matériel et méthodes

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,36 (m, 1H); 5,33 (m, 1H); 4,67–4,63 (dd, *J* = 4,2 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 4,45 (m, 1H); 4,36–4,33 (dd, *J* = 4,7 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 3,26 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 3,04 (s, 3H); 1,50 (m, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,32–1,26 (m, 6H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 168,19; 155,53; 81,33; 69,17; 53,55; 39,96; 37,43; 31,54; 29,50; 28,36; 26,59; 22,64; 14,12.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₅H₃₁N₂O₆S = 367,1897; trouvé = 367,1899.

tert-Butyl *N*-[1-(methylsulfonyloxy)-2-(octylamino)-2-oxoethyl]carbamate (**11b**).



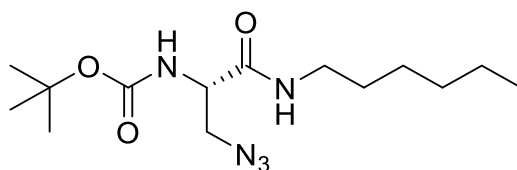
Le composé **11b** (519 mg, 54 %) est obtenu après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) sous forme d'une poudre blanche, à partir de 759 mg du composé **10b** (2,40 mmol) en suivant le protocole décrit pour la synthèse du composé **11a**.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,27. Tf: 92,8–93,2 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,34 (m, 1H); 5,31 (m, 1H); 4,67–4,64 (dd, *J* = 4,2 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 4,45 (m, 1H); 4,36–4,32 (dd, *J* = 4,7 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 3,26 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 3,05 (s, 3H); 1,50 (m, 2H); 1,47 (s, 9H); 1,29–1,26 (m, 10H); 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 168,19; 155,63; 81,36; 69,17; 53,58; 39,98; 37,44; 31,59; 29,56; 29,33; 29,30; 28,38; 27,06; 26,94; 22,76; 14,20.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₇H₃₅N₂O₆S = 395,2210; trouvé = 395,2215.

tert-Butyl *N*-[1-(methylazide)-2-(hexylamino)-2-oxoethyl]carbamate (**12a**).

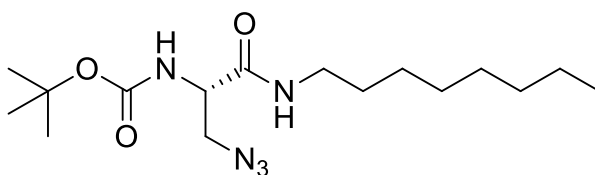


À une solution de **11a** (200 mg; 0,55 mmol; 1 équiv.) dans le DMF anhydre (5 mL) est ajouté $\text{NaN}_3(\text{s})$ (106 mg; 1,64 mmol; 3 équiv.) portion par portion. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 80 °C pendant 6 h. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, séchées sur $\text{MgSO}_4(\text{s})$ anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **12a** (122 mg; 71 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) = 0,31. Tf: 55,0–55,2 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6,22 (se, 1H); 5,23 (se, 1H); 4,21 (m, 1H); 3,87–3,82 (dd, *J* = 4,6 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,53–3,48 (dd, *J* = 5,9 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 1,50 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,35–1,25 (m, 6H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 169,30; 155,56; 80,98; 53,87; 52,30; 39,92; 31,55; 29,52; 28,40; 26,60; 22,66; 14,12. **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ calculé pour C₁₄H₂₈N₅O₃ = 314,2187; trouvé = 314,2214.

tert-Butyl *N*-[1-(methylazide)-2-(octylamino)-2-oxoethyl]carbamate (**12b**).



Le composé **12b** (167 mg ; 55 %) est obtenu après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) sous forme d'une poudre blanche, à partir de 200 mg du composé **11b** (0,51 mmol) en suivant le protocole décrit pour la synthèse du composé **11a**.

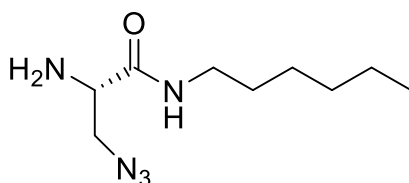
Matériel et méthodes

R_f (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) = 0,33. Tf: 57,2–58,0 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,25 (se, 1H); 5,25 (se, 1H); 4,22 (m, 1H); 3,87–3,82 (dd, *J* = 4,6 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,53–3,48 (dd, *J* = 5,9 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,25 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 1,50 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,29–1,26 (m, 10H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H), **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 169,29; 155,55; 80,95; 53,82; 52,29; 39,92; 31,90; 29,55; 29,33; 29,30; 28,40; 26,94; 22,76; 14,21.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₆H₃₂N₅O₃ = 342,2500; trouvé = 342,2521.

*H*₂N-Ser(N₃)-H₆ (**13a**).



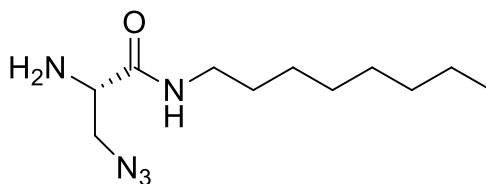
Le composé **12a** (1,37 g ; 4,26 mmol ; 1 équiv.) est solubilisé portion par portion à 0 °C dans 10 mL de mélange DCM/TFA (1:1 v/v). Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. pendant 3 h puis le DCM et le TFA sont co-évaporés avec Et₂O (3×) sous pression réduite. Le milieu résiduel est purifié par chromatographie flash (AcOEt/MeOH 9:1 v/v) pour donner le composé **13a** (1,25 g ; quantitatif) sous forme d'une huile jaune.

R_f (AcOEt/MeOH 9:1 v/v) = 0,20.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 3,95–3,92 (m, 1H); 3,84–3,72 (m, 2H); 3,28–3,18 (m, 2H); 1,57–1,50 (m, 2H); 1,39–1,28 (m, 6H); 0,91 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD)**: δ 167,95; 53,92; 52,66; 40,77; 32,59; 30,16; 27,59; 23,59; 14,31.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₉H₂₀N₅O = 214,1662; trouvé = 214,1667

H₂N-Ser(N₃)-H₈ (13b).



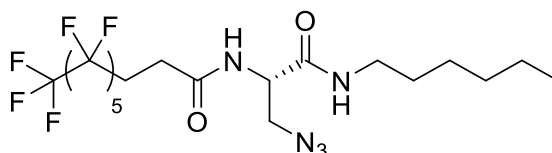
Le composé **13b** (1,03 g ; quantitatif) est obtenu après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) sous forme d'une huile jaune, à partir de 1,18 g du composé **12b** (0,51 mmol) en suivant le protocole décrit pour la synthèse du composé **13a**.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,12.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 3,67–3,59 (m, 3H); 3,28–3,16 (m, 2H); 1,53 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 1,33–1,30 (m, 10H); 0,90 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD):** δ 171,67; 54,95; 54,69; 40,61; 32,95; 30,36; 30,33; 30,27; 27,94; 23,68; 14,39.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₁H₂₄N₅O = 242,1975; trouvé = 242,1981.

F₆-Ser(N₃)-H₆ (14).



À une solution de **13a** (910 mg ; 4,27 mmol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (20 mL), Et₃N (1,20 mL ; 8,53 mmol ; 2 équiv.) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 5 min à t.a. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C, puis le réactif *2H,2H,3H,3H*-acide perfluorononanoïque (1,84 g ; 4,70 mmol ; 1,1 équiv.) est ajouté en une seule portion. 10 min plus tard, PyBOP (2,66 g ; 5,12 mmol ; 1,2 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 30 min puis est laissé revenir à t.a. pendant 8 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée, puis le THF est évaporé sous

Matériel et méthodes

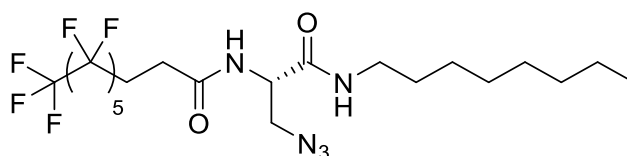
pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du DCM (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, une solution de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ et une solution de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ saturée, séchées sur $\text{MgSO}_{4(\text{s})}$ anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **14a** (1,91g ; 76 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v).

Rf (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,29. Tf: 109,5–109,8 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,58 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,16 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 4,51 (m, 1H); 3,78–3,74 (dd, $J = 4,7$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H); 3,52–3,47 (dd, $J = 7,0$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H); 3,34–3,21 (m, 2H); 2,59–2,44 (m, 4H); 1,58–1,48 (m, 2H); 1,35–1,25 (m, 6H); 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 170,29; 168,69; 52,57; 51,96; 40,11; 31,49; 29,41; 27,10; 26,67; 26,59; 22,62; 14,05. **RMN ^{19}F (375 MHz, CDCl_3):** δ -80,8 (3F); -114,6 (2F); -121,9 (2F); -122,9 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2 = 588,1639$; trouvé = 588,1641.

*F*₆-Ser(*N*₃)-H₈ (**8**).



Le composé **8** (754 mg; 71 %) est obtenu après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) sous forme d'une poudre blanche, à partir de 415 mg du composé **13b** (1,72 mmol) en suivant le protocole décrit pour la synthèse du composé **14**.

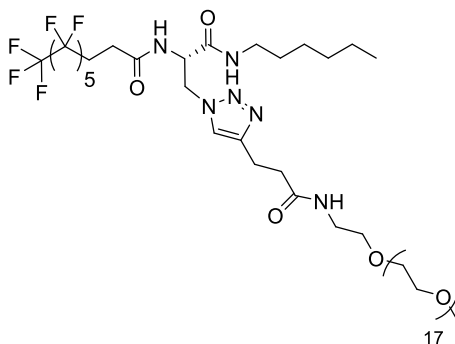
Rf (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,33. Tf: 112,0–112,2 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,63 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,20 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 4,51 (m, 1H); 3,77–3,73 (dd, $J = 4,7$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H); 3,53–3,48 (dd, $J = 7,0$ Hz, $J = 12,2$ Hz, 1H); 3,34–3,20 (m, 2H); 2,59–2,44 (m, 4H); 1,55–1,48 (m, 2H); 1,30–1,26 (m, 10H); 0,87 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 170,30; 168,70; 52,59; 51,97; 40,14; 31,90; 29,47; 29,31; 27,13;

Matériel et méthodes

26,96; 26,69; 22,75; 14,18, ^{19}F RMN (375 MHz, CDCl_3): δ -80,8 (3F); -114,5 (2F); -121,9 (2F); -122,9 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F). **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z**: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculées pour $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_{13}\text{O}_2 = 616,1952$; trouvé = 616,1962.

*F*₆H₆PEG750 (**15**).



À une solution de **14a** (200 mg ; 0,34 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG750-Propargyl (307 mg ; 0,34 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (10 mL), est ajouté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ (26 mg ; 0,10 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (40 mg ; 0,21 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (10 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 18 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite, et la résine Chelex[®]100 est ajoutée portion par portion dans le milieu aqueux. Celui-ci est ensuite agité vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite, puis lyophilisé après dilution dans l'eau milli-Q. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex[®] LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **15** (368 mg ; 75 %) sous forme d'une poudre blanche. R_f (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,48. Tf: 68–73 °C.

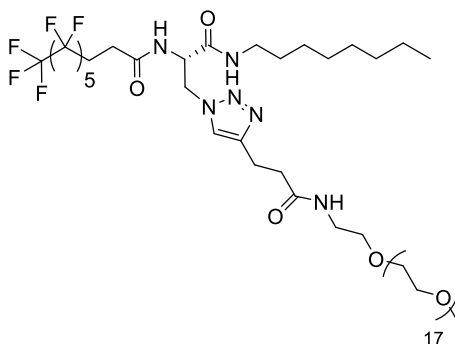
RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 8,08 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 7,91 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 7,66 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,56 (dd, $J = 5,4$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd,

Matériel et méthodes

$J=8,3$ Hz, $J=13,8$ Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 72H); 3,38 (t, $J=5,9$ Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, $J=5,8$ Hz, 2H); 3,02 (q, $J=6,5$ Hz, 2H); 2,78 (t, $J=7,7$ Hz, 2H); 2,47–2,32 (m, 6H); 1,34 (t, $J=6,5$ Hz, 2H); 1,26–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, $J=6,9$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,76; 69,69; 69,56; 69,09; 58,02; 52,99; 50,20; 38,63; 38,47; 34,76; 30,92; 28,77; 25,89; 25,73; 21,98; 21,19; 13,83. **RMN ^{19}F (375 MHz, DMSO- d_6)**: δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,2 (2F); -125,7 (2F). **CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min)** : 17,3 ; pureté de 97,1 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) m/z : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculées pour $\text{C}_{60}\text{H}_{104}\text{F}_{13}\text{N}_6\text{O}_{21}$: $\overline{M}_n = 1482,6586$ g/mol ; $\overline{M}_w = 1496,2350$ g/mol ; **PDI** = 1,009

$F_6H_8\text{PEG750}$ (**16**).



À une solution de **14b** (100 mg ; 0,16 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG750-Propargyl (147 mg ; 0,16 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (5 mL), est ajouté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ (12 mg ; 0,05 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (20 mg ; 0,1 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (5 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 24 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex[®]100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex[®]LH-20, 100 % MeOH). Les

Matériel et méthodes

fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **16** (203 mg ; 84 %) sous forme d'une poudre blanche.

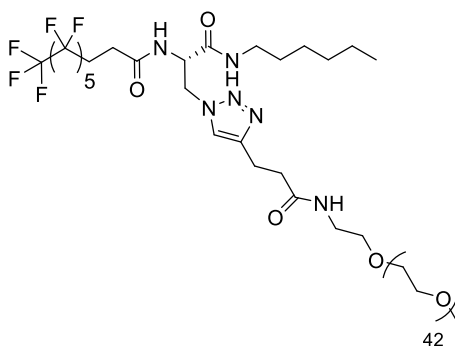
Rf (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,48. Tf: 75–83 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,91 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,69 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 70H); 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 2,45–2,36 (m, 6H); 1,33 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,30–1,23 (m, 10H); 0,85 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,76; 69,57; 69,09; 58,02; 52,99; 50,19; 38,63; 38,47; 34,76; 31,22; 28,77; 28,68; 28,61; 26,23; 25,72; 22,04; 21,19; 13,87. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,3 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,7 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) *t*_R (min) : 18,2 ; pureté de 95,4 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) *m/z* : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis [M + H]⁺ calculées pour C₆₂H₁₀₈F₁₃N₆O₂₁ : \overline{M}_n = 1511,9971 g/mol ; \overline{M}_w = 1524,4438 g/mol ; **PDI** = 1,008

F₆H₆PEG2000 (**17**).



À une solution de **14a** (85 mg ; 0,14 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG2000-Propargyl (296 mg ; 0,14 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (1 mL), est ajouté CuSO₄.5H₂O_(s) (11 mg ; 0,04 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (17 mg ;

Matériel et méthodes

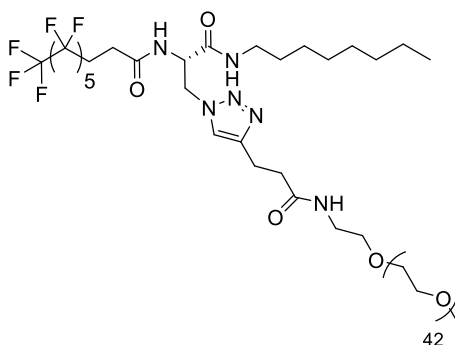
0,09 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (1 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 18 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex®100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex®LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **17** (322 mg ; 86 %) sous forme d'une poudre blanche.

Rf (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,12. Tf: 56,3–64,3 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,91 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 170H); 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 2,46–2,36 (m, 6H); 1,34 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 1,28–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,77; 69,57; 69,09; 58,03; 52,99; 50,20; 38,64; 38,47; 34,76; 30,93; 28,78; 25,89; 25,73; 21,98; 21,19; 13,83. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) *t*_R (min): 16,9 ; pureté de 98,2 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) *m/z* : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis [M + H]⁺ calculées pour C₁₁₀H₂₀₄F₁₃N₆O₄₆ : \overline{M}_n = 2574,0769 g/mol ; \overline{M}_w = 2600,0388 g/mol ; **PDI** = 1,010

F_6H_8 PEG2000 (**18**).

À une solution de **14b** (100 mg ; 0,16 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG2000-Propargyl (332 mg ; 0,16 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (2,5 mL), est ajouté $CuSO_4 \cdot 5H_2O_{(s)}$ (16 mg ; 0,05 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (23 mg ; 0,1 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (2,5 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 22 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex® 100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex® LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **18** (314 mg ; 74 %) sous forme d'une poudre blanche.

Rf (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,11. Tf: 57,7–70,0 °C.

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8,47 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 8,06 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H); 7,90 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, $J = 5,4$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 170H); 3,38 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, $J = 5,8$ Hz, 2H); 3,02 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,78 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 2,45–2,36 (m, 10H); 1,34 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 1,32–1,23 (m, 10H); 0,85 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,27; 69,77; 69,57; 69,10; 58,03; 52,99; 50,20; 38,64; 38,48;

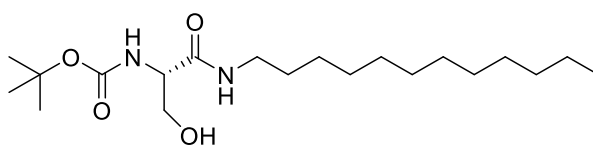
Matériel et méthodes

34,76; 31,23; 28,81; 28,69; 28,62; 26,24; 25,73; 22,06; 21,20; 13,89. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,7 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) :18,3, pureté de 97,6% à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) m/z : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis [M + H]⁺ calculées pour C₁₁₂H₂₀₈F₁₃N₆O₄₆ : \overline{M}_n = 2582,4595 g/mol ; M_w = 2609,6610 g/mol ; **PDI** =1,010

tert-butyl (1-(dodecylamino)-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl)carbamate (**19**).



À une solution de Boc-L-sérine (2 g ; 9,75 mmol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (60 mL) est ajouté HOBt (1,32 g ; 9,75 mmol ; 1 équiv.) à 0 °C. Le pH du milieu réactionnel est ensuite ajusté à 8-9 avec le réactif *N*-méthylmorpholine. Après 5 min d'agitation, le 1-dodécylamine (2,47 mL ; 10,73 mmol ; 1,1 équiv.) est ajouté au milieu réactionnel. 10 min plus tard, DCC (2,21 g ; 10,73 mmol ; 1,1 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 1 h, puis il est laissé revenir à t.a. pendant 17 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée (40 mL), puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **19** (2,86 g ; 76 %) sous forme d'une poudre blanche après purification sur chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v).

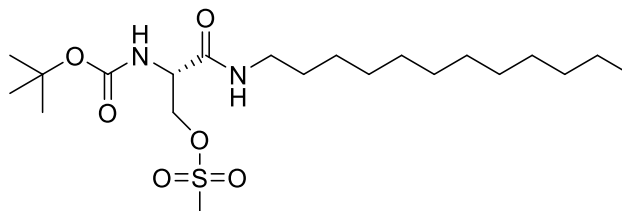
R_f (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v) = 0,39. T_f: 64,3–65,0 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : δ 4,08 (m, 1H); 3,72 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H); 3,26–3,12 (m, 2H); 1,51 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); 1,30 (m, 18H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD)** : δ 173,0; 157,7; 80,7; 63,3; 58,2; 40,5; 33,1; 30,77; 30,72; 30,71; 30,69; 30,5 (2×CH₂); 30,4;

Matériel et méthodes

28,7 (3×CH₃); 27,9; 23,7; 14,4. **HRSM (ESI/Q-TOF) m/z:** [M + H]⁺ calculé pour C₂₀H₄₁N₂O₄ = 373,3074; trouvé = 373,3069.

2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(dodécylamino)-3-oxopropyl méthanesulfonate (20).



À une solution de Boc-L-sérine (500 mg; 2,43 mmol; 1 équiv.) dans le THF anhydre (10 mL) est ajouté HOBt (328 mg ; 2,43 mmol ; 1 équiv.) à 0 °C. Le pH du milieu réactionnel est ensuite ajusté à 8-9 avec le réactif *N*-méthylmorpholine. Après 5 min d'agitation, le 1-dodécylamine (0,32 mL ; 2,43 mmol ; 1 équiv.) est ajouté au milieu réactionnel. 10 min plus tard, DCC (527 mg ; 2,55 mmol ; 1,05 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à -10 °C pendant 1 h, puis il est laissé revenir à t.a. pendant 18 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée (40 mL), puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé brut **19** (883 mg; 2,28 mmol ; 1 équiv.) réutilisé tel quel sans étape de purification. R_f (cyclohexane/AcOEt, 6:4 v/v) = 0,30. Le composé brut **19** (883 mg ; 2,28 mmol ; 1 équiv.) est ensuite solubilisé dans du DCM anhydre (10 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à -10 °C et Et₃N (0,30 mL ; 2,26 mmol ; 1,2 équiv.) est ajouté ; puis l'ensemble est placé dans une atmosphère d'argon pendant 10 min. MsCl (0,21 mL ; 2,26 mmol ; 1,2 équiv.) est ensuite ajouté au goutte-à-goutte à travers un septum. Le milieu réactionnel est laissé à -10 °C pendant 1 h 30, puis le THF est évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de NaCl_(aq) saturée (2×), séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression

Matériel et méthodes

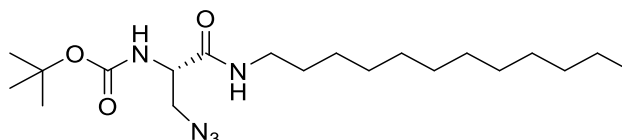
réduite. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) pour obtenir le composé **20** (532 mg; 49 %) sous forme d'une poudre blanche.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,31. Tf: 95,8-96,3 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,34 (m, 1H); 5,30 (m, 1H); 4,67–4,64 (dd, *J* = 4,2 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 4,45 (m, 1H); 4,36–4,32 (dd, *J* = 4,7 Hz, *J* = 10,2 Hz, 1H); 3,26 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 3,05 (s, 3H); 1,50 (m, 2H); 1,47 (s, 9H); 1,29–1,25 (m, 18H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 168,18; 155,54; 81,36; 69,16; 53,55; 39,98; 37,44; 32,05; 29,77; 29,75; 29,72; 29,65; 29,56; 29,48; 29,39; 28,37 (3×CH₃); 26,95; 22,82; 14,25.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₂₁H₄₃N₂O₆S = 451,2836; trouvé = 451,2853.

tert-butyl (3-azido-1-(dodecylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (**21**).



À une solution de **20** (2,53 g; 5,62 mmol; 1 équiv.) dans le DMF anhydre (60 mL) est ajouté NaN_{3(s)} (1,09 g; 16,86 mmol; 3 équiv.) portion par portion. Le milieu réactionnel est agité et chauffé à 70 °C pendant 15 h. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le milieu résiduel est extrait avec AcOEt (3×). Les organiques réunies sont lavées avec de l'eau, séchées sur Na₂SO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **21** (1,87 g; 83 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 8:2 v/v) = 0,26. Tf: 67,0-67,3 °C.

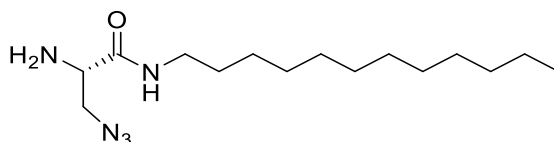
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,26 (m, 1H); 5,24 (m, 1H); 4,22 (m, 1H); 3,87–3,83 (dd, *J* = 4,5 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,53–3,48 (dd, *J* = 5,9 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,27 (q, *J* = 6,7 Hz, 2H); 1,51 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,29–1,25 (m, 18H); 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz,**

Matériel et méthodes

CDCl₃) : δ 169,29; 155,51; 80,99; 53,84; 52,30; 39,93; 32,05; 29,77; 29,75; 29,71; 29,65; 29,56; 29,48; 29,39; 28,40 (3 \times CH₃); 26,96; 22,82; 14,25.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₀H₄₀N₅O₃ = 398,3126; trouvé = 398,3133.

H₂N-Ser(N₃)-H₁₂ (**22**).

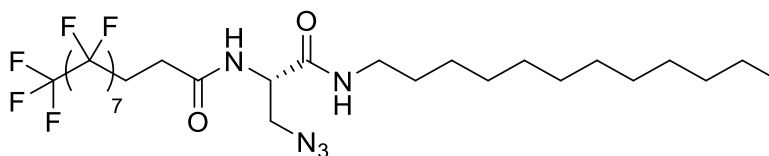


Le composé **21** (938 mg ; 2,36 mmol ; 1 équiv.) est solubilisé portion par portion à 0 °C dans un mélange DCM/TFA (1:1 v/v). Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. pendant 3 h puis les solvants sont co-évaporés avec Et₂O (3 \times). Le produit brut **22** est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement quantitatif (933 mg) et est utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse sans étape de purification.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 5:5 v/v) = 0,15.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) : δ 3,99–3,96 (m, 1H); 3,87–3,83 (dd, *J* = 4,3 Hz, *J* = 13,5 Hz, 1H); 3,79–3,74 (dd, *J* = 7,0 Hz, *J* = 13,4 Hz, 1H); 3,28–3,18 (m, 2H); 1,54 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 1,33–1,29 (m, 18H); 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD)** : δ 167,11; 53,74; 52,24; 40,82; 33,04; 30,750; 30,71; 30,69; 30,44; 30,37; 30,20; 27,92; 23,70; 14,40.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₁₅H₃₂N₅O = 298,2501; trouvé = 298,2615.

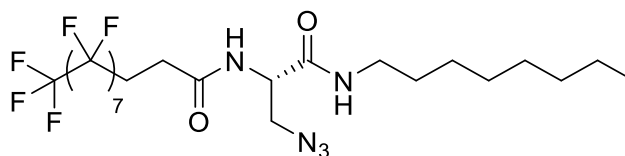
*F*₈-Ser(*N*₃)-*H*₁₂ (**23a**).

À une solution de **22** (933 mg ; 3,14 mmol ; 1 équiv.) dans un mélange THF/DMF anhydre (46 mL, 8:1 v/v), Et₃N (0,55 mL ; 6,27 mmol ; 2 équiv.) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 5 min à t.a. La réaction est ensuite refroidie à 0 °C, puis le réactif *2H,2H,3H,3H*-acide perfluorononanoïque (2 g ; 4,07 mmol ; 1,05 équiv.) est ajouté en une seule portion. 10 min plus tard, PyBOP (2,43 g ; 4,67 mmol ; 1,5 équiv.) est ajouté portion par portion. Le milieu réactionnel est maintenu à 0 °C pendant 30 min, puis il est laissé revenir à t.a. pendant 12 h. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de NH₄Cl_(aq) saturée, puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le milieu résiduel est ensuite extrait avec du AcOEt (3×). Les phases organiques réunies sont lavées avec des solution de NaHCO_{3(aq)} et NaCl_(aq) saturées, séchées sur MgSO_{4(s)} anhydre, filtrées et concentrées sous pression réduite pour donner le composé **23a** (3,54 g ; 54 %) sous forme d'une poudre blanche après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v).

R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,39. Tf: 115,4-116,8 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,56 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 6,14 (m, 1H); 4,51 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H); 3,78–3,74 (dd, *J* = 4,5 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,52–3,47 (dd, *J* = 7,0 Hz, *J* = 12,1 Hz, 1H); 3,27 (m, 2H); 2,56–2,46 (m, 2H); 1,51 (m, 2H); 1,28–1,25 (m, 18H); 0,87 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 170,26; 168,66; 80,99; 52,57; 51,93; 40,14; 32,05; 29,77 (2×CH₂); 29,72; 29,66; 29,48 (2×CH₂); 29,37; 27,15; 26,96; 26,70; 22,82; 14,23. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃)** : δ -80,8 (3F); -114,6 (2F); -121,7 (2F); -121,9 (4F); -122,7 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z : [M + H]⁺ calculé pour C₂₆H₃₅F₁₇N₅O₂ = 772,2514; trouvé = 772,2551.

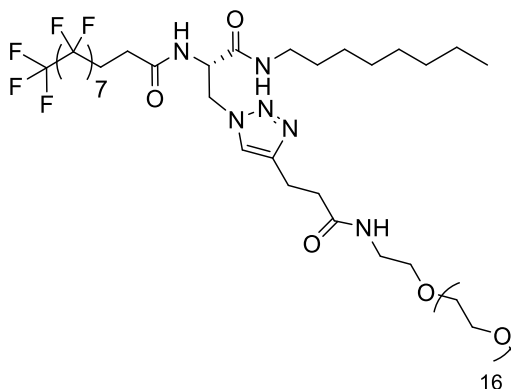
F₈-Ser(N₃)-H₈ (23b).

Le composé **23b** (1,28 g ; 60 %) est obtenu après purification par chromatographie flash (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) sous forme d'une poudre blanche, à partir de 725 mg du composé **13b** (3 mmol) en suivant le protocole décrit pour la synthèse du composé **23a**.

R_f (cyclohexane/AcOEt, 7:3 v/v) = 0,33. Tf: 111,3–113,4 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 6,57 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,15 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H); 4,51 (m, 2H); 3,78–3,74 (dd, *J* = 4,7 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,52–3,47 (dd, *J* = 7,0 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 3,27 (m, 2H); 2,59–2,44 (m, 2H); 1,51 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H); 1,30–1,26 (m, 18H); 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 170,27; 168,68; 52,57; 51,94; 40,13; 31,89; 29,47; 29,30 (2×CH₂); 27,13; 26,95; 26,69; 22,75; 14,17. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃)** : δ -80,7 (3F); -114,5 (2F); -121,7 (2F); -121,9 (4F); -122,7 (2F); -123,4 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₀H₂₇F₁₃N₅O₂ = 716,1888; trouvé = 716,1908.

F₈H₈PEG750 (24).

À une solution de **23b** (117 mg ; 0,16 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG750-Propargyl (150 mg ; 0,16 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (3,3 mL), est ajouté

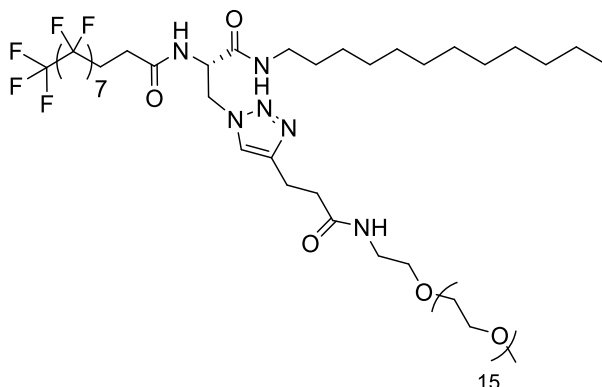
Matériel et méthodes

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ (12 mg ; 0,05 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (20 mg ; 0,1 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (1,7 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 20 h à t.a. sous atmosphère d'argon. . Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex[®]100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex[®]LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **24** (215 mg ; 83 %) sous forme d'une poudre blanche. R_f (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,11. Tf: 98–103°C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 8,06 (t, J = 5,7 Hz, 1H); 7,91 (d, J = 5,6 Hz, 1H); 7,66 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, J = 5,4 Hz, J = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, J = 8,4 Hz, J = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 74H); 3,38 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,23 (s, 3H); 3,18 (q, J = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, J = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, J = 7,7 Hz, 2H); 2,46–2,36 (m, 6H); 1,34 (t, J = 6,7 Hz, 2H); 1,22 (m, 10H); 0,85 (t, J = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,06; 169,53; 167,93; 145,76; 122,45; 71,25; 69,75; 69,55; 69,53; 69,08; 58,00; 52,99; 50,17; 38,61; 38,46; 34,76; 31,21; 28,79; 28,67; 28,60; 26,21; 26,72; 22,03; 21,18; 13,85. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,5 (2F); -121,7 (4F); -122,5 (2F); -123,2 (2F); -125,7 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) : 20,9 ; pureté de 96,6 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) m/z : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculées pour $\text{C}_{64}\text{H}_{107}\text{F}_{17}\text{N}_6\text{O}_{20}$: \overline{M}_n = 1590,6408 g/mol ; \overline{M}_w = 1598,8973 g/mol ; **PDI** = 1,005

*F*₈*H*₁₂PEG750 (**25**).

À une solution de **23a** (232 mg ; 0,30 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG750-Propargyl (276 mg ; 0,30 mol ; 1 équiv.) dans le THF anhydre (7,5 mL), est ajouté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ (23 mg ; 0,09 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (38 mg ; 0,18 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (2,5 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 16 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex® 100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex® LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **25** (428 mg ; 88 %) sous forme d'une poudre blanche.

R_f (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,12. Tf: 56,3–64,3 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,91 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 191H); 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 2,46–2,36 (m, 6H); 1,34 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 1,28–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,08;

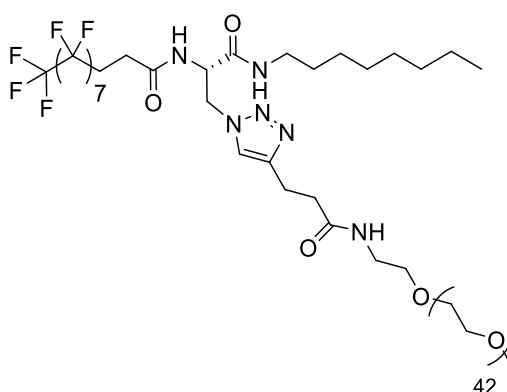
Matériel et méthodes

169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,77; 69,57; 69,09; 58,03; 52,99; 50,20; 38,64; 38,47; 34,76; 30,93; 28,78; 25,89; 25,73; 21,98; 21,19; 13,83. RMN ^{19}F (375 MHz, DMSO- d_6) : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) : 24,0 ; pureté de 98,7 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) m/z : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculées pour $\text{C}_{68}\text{H}_{115}\text{F}_{17}\text{N}_6\text{O}_{20}$: $\overline{M}_n = 1579,5037$ g/mol ; $\overline{M}_w = 1583,3888$ g/mol ; PDI = 1,002

$F_8H_8\text{PEG}2000$ (**26**).



À une solution de **23b** (114 mg ; 0,16 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG2000-Propargyl (325 mg ; 0,17 mol ; 1,1 équiv.) dans le THF anhydre (7,5 mL), est ajouté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ (12 mg ; 0,05 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (19 mg ; 0,1 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (2,5 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 15 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex[®]100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex[®]LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est

Matériel et méthodes

dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **26** (389 mg ; 89 %) sous forme d'une poudre blanche.

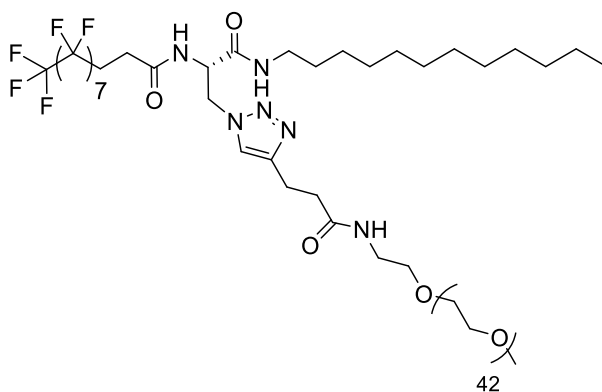
Rf (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,12. Tf: 56,3–64,3 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,91 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 191H); 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 2,46–2,36 (m, 6H); 1,34 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 1,28–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,77; 69,57; 69,09; 58,03; 52,99; 50,20; 38,64; 38,47; 34,76; 30,93; 28,78; 25,89; 25,73; 21,98; 21,19; 13,83. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) : 20,4 ; pureté de 96,4% à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) m/z : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis [M + H]⁺ calculées pour C₁₁₆H₂₁₁F₁₇N₆O₄₆ : \overline{M}_n = 2686,0645 g/mol ; \overline{M}_w = 2714,7375 g/mol ; PDI = 1,011

*F*₈H₁₂PEG2000 (**27**).



À une solution de **23a** (112 mg ; 0,15 mmol ; 1 équiv.) et du réactif commercial MeO-PEG2000-Propargyl (325 mg ; 0,16 mol ; 1,1 équiv.) dans le THF anhydre (7,5 mL), est ajouté CuSO₄·5H₂O_(s) (11 mg ; 0,04 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Le milieu réactionnel est ensuite purgé avec de l'argon pendant 5-10 min. Puis une solution d'ascorbate de sodium (17 mg ;

Matériel et méthodes

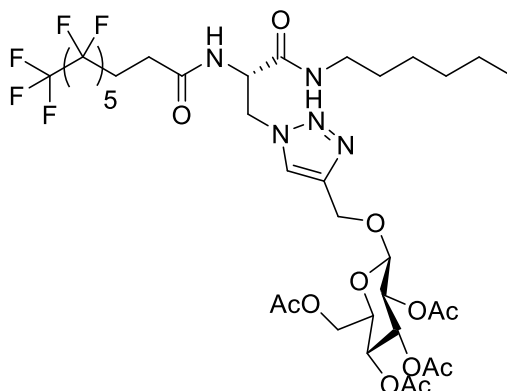
0,09 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (2,5 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 16 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex®100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 12 h pour retirer les traces de cuivre de la solution polymérique. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex®LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **27** (356 mg ; 88 %) sous forme d'une poudre blanche.

Rf (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,12. Tf: 56,3–64,3 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,07 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,91 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 4,70 (m, 1H); 4,62–4,57 (dd, *J* = 5,4 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 4,42–4,37 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 13,8 Hz, 1H); 3,69–3,41 (m, 191H); 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,24 (s, 3H); 3,19 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,02 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 2,78 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 2,46–2,36 (m, 6H); 1,34 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 1,28–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 171,08; 169,54; 167,94; 145,77; 122,46; 71,26; 69,77; 69,57; 69,09; 58,03; 52,99; 50,20; 38,64; 38,47; 34,76; 30,93; 28,78; 25,89; 25,73; 21,98; 21,19; 13,83. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) *t*_R (min) : 20,4 ; pureté de 96,4 % à 214 nm.

SM (MALDI-TOF) *m/z* : Moyennes \overline{M}_n and \overline{M}_w depuis [M + H]⁺ calculées pour C₁₂₀H₂₁₉F₁₇N₆O₄₆ : \overline{M}_n = 2758,9181 g/mol ; \overline{M}_w = 2785,6589 g/mol ; **PDI** = 1,010

$F_6H_6Glu(OAc)_4$ (**28**).

À une solution de **14a** (50 mg ; 0,09 mmol ; 1 équiv.) et de 2-Propynyl 2,3,4,6-*tetra*-O-acetyl- β -D-glucopyranoside¹⁷⁹ (36 mg ; 0,09 mmol ; 1,1 équiv.) dans le THF anhydre (0,67 mL), est ajouté $CuSO_4 \cdot 5H_2O(s)$ (6 mg ; 0,02 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Puis une solution d'ascorbate de sodium (10 mg ; 0,05 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (0,33 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 12 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex® 100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 3 h pour retirer les traces de cuivre dans le milieu. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex® LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **28** (74 mg ; 75 %) sous forme d'une poudre blanche.

Rf (AcOEt, 100 %) = 0,67. Tf: 162,5–162,8 °C.

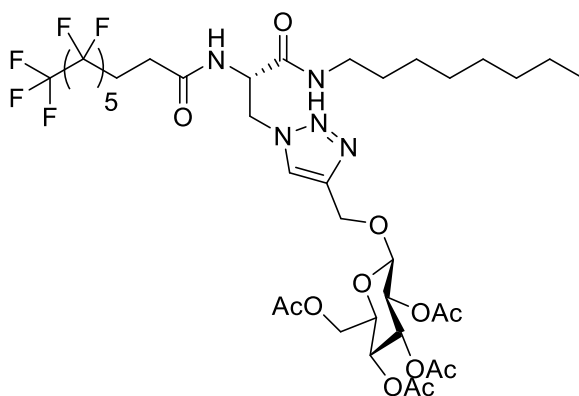
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,67 (s, 1H); 6,94 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 6,45 (t, J = 5,6 Hz, 1H); 5,20 (t, J = 9,5 Hz, 1H); 5,09 (t, J = 9,7 Hz, 1H); 4,99–4,95 (m, 1H); 4,94–4,79 (m, 4H); 4,66 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 4,60–4,56 (dd, J = 4,7 Hz, J = 13,8 Hz, 1H); 4,28–4,23 (dd, J = 4,6 Hz, J = 12,4 Hz, 1H); 4,20–4,16 (dd, J = 2,3 Hz, J = 12,3 Hz, 1H); 3,75–3,70 (m, 1H); 3,24–3,10 (m, 2H); 2,65–2,41 (m, 4H); 2,11 (s, 3H); 2,02 (m, 6H); 1,99 (s, 3H); 1,42 (t, J = 6,9 Hz, 2H); 1,30–1,23 (m, 6H); 0,87 (t, J = 6,4 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 170,9; 170,8; 170,3; 169,7; 169,5; 168,0; 125,2;

Matériel et méthodes

100,1; 72,8; 72,1; 71,5; 68,5; 62,9; 61,9; 53,2; 50,8; 40,0; 31,5; 29,3; 27,2; 26,8; 26,6; 22,6; 20,9 (3×CH₃); 20,8 (3×CH₃); 20,7 (3×CH₃); 20,7; 14,1. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃)** : δ -80,3 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,7 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₃₅H₄₅F₁₃N₅O₁₂ = 974,2852; trouvé = 974,2874.

*F*₆*H*₈*Glu(OAc)*₄ (**29**).



À une solution de **14b** (50 mg ; 0,08 mmol ; 1 équiv.) et du 2-Propynyl 2,3,4,6-*tetra*-O-acetyl-β-D-glucopyranoside¹⁷⁹ (34 mg ; 0,09 mmol ; 1,1 équiv.) dans le THF anhydre (0,67 mL), est ajouté CuSO₄.5H₂O_(s) (6 mg ; 0,02 mmol ; 0,3 équiv.) sous agitation. Puis une solution d'ascorbate de sodium (10 mg ; 0,05 mmol ; 0,6 équiv.) dans l'eau (0,33 mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est ensuite placé à l'abri de la lumière et laissé pendant 12 h à t.a. sous atmosphère d'argon. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite, et le résidu est solubilisé MeOH. Puis, la résine Chelex® 100 est ajoutée portion par portion dans la solution méthanolique. Celle-ci est ensuite agitée vigoureusement pendant 3 h pour retirer les traces de cuivre dans le milieu. Le milieu est ensuite filtré et concentré sous pression réduite. Le produit brut est par la suite purifié par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex® LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **29** (94 mg ; 87 %) sous forme d'une poudre blanche.

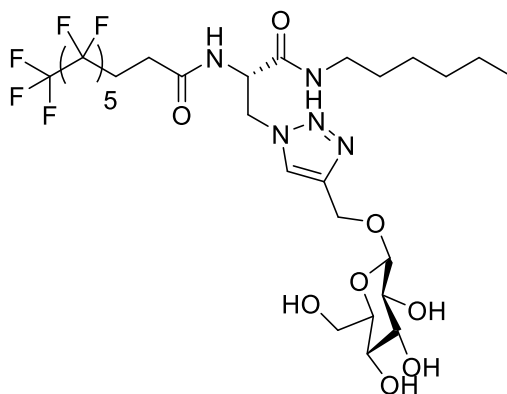
R_f (AcOEt, 100 %) = 0,71. Tf: 172,3–172,6 °C.

Matériel et méthodes

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,67 (s, 1H); 6,95 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 6,47 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 5,20 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H); 5,09 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H); 4,99–4,95 (m, 1H); 4,94–4,79 (m, 4H); 4,66 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 4,61–4,56 (dd, *J* = 4,9 Hz, *J* = 13,9 Hz, 1H); 4,28–4,23 (dd, *J* = 4,6 Hz, *J* = 12,4 Hz, 1H); 4,20–4,16 (dd, *J* = 2,4 Hz, *J* = 12,3 Hz, 1H); 3,75–3,70 (m, 1H); 3,24–3,10 (m, 2H); 2,63–2,41 (m, 4H); 2,10 (s, 3H); 2,02 (m, 6H); 1,99 (s, 3H); 1,42 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 1,30–1,24 (m, 10H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 170,9; 170,8; 170,3; 169,6; 169,5; 168,0; 144,4; 125,1; 100,1; 72,8; 72,1; 71,4; 68,5; 63,0; 61,9; 53,2; 50,7; 40,0; 31,9; 29,3 (2×CH₂); 29,2; 27,1; 26,9 ; 26,5 ; 22,7 ; 20,9 (3×CH₃); 20,8 (3×CH₃); 20,7 (3×CH₃); 14,1. **RMN ¹⁹F (375 MHz, CDCl₃)** : δ -80,8 (3F); -114,5 (2F); -121,8 (2F); -122,8 (2F); -123,5 (2F); -126,1 (2F).

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₃₇H₄₉F₁₃N₅O₁₂ = 1002,3165; trouvé = 1002,3179.

*F*₆H₆_Glucose (**30**).



À une solution de **28** (314 mg ; 0,32 mmol ; 1 équiv.) dans le MeOH (3 mL) est ajouté le méthanolate de sodium MeONa (18 mg ; 0,33 mmol ; 1 équiv.). La réaction est laissée à t.a. pendant 24 h sous agitation. Après la conversion complète de **28**, la résine IRC50 est ajoutée portion par portion au milieu réactionnel, puis la solution est agitée vigoureusement pendant 30 min pour obtenir un pH acide à ~4. Le milieu réactionnel est ensuite filtré puis la résine est rincée deux fois avec du MeOH chaud. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie d'exclusion (Sephadex[®] LH-20, 100 % MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans

Matériel et méthodes

de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **30** (224 mg ; 86 %) sous forme d'une poudre blanche.

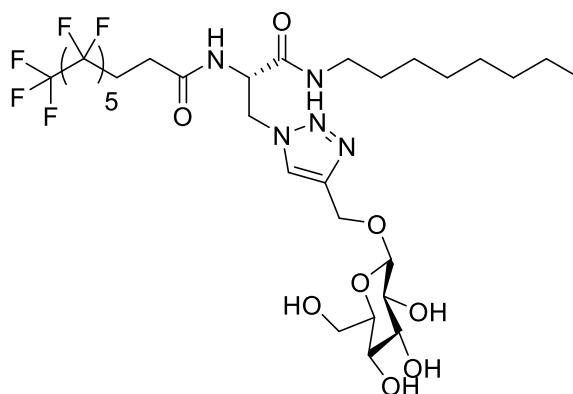
R_f (AcOEt/MeOH/eau, 7:2:1 v/v) = 0,71. Tf: 149,9–155,1 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,50 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 8,08 (m, 1H); 7,98 (s, 1H); 5,00–4,98 (m, 1H); 4,93–4,90 (m, 2H); 4,82–4,78 (dd, *J* = 3,3 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 4,76–4,70 (m, 1H); 4,68–4,58 (m, 3H); 4,55–4,52 (m, 1H); 4,49–4,43 (dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 13,7 Hz, 1H); 4,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 3,72–3,68 (dd, *J* = 6,2 Hz, *J* = 11,6 Hz, 1H); 3,49–3,43 (m, 1H); 3,16–3,10 (m, 2H); 3,07–2,99 (m, 3H); 2,98–2,94 (m, 1H); 2,47–2,33 (m, 4H); 1,35 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 1,28–1,20 (m, 6H); 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 169,6; 167,9; 143,5; 124,8; 102,0; 76,9; 76,7; 73,4; 70,1; 61,3; 61,1; 52,9; 50,3; 38,7; 30,9; 28,8; 25,9; 25,7 (2×CH₃); 21,9; 13,8. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,7 (2F); -123,2 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) : 14,5 ; pureté de 96,1 % à 214 nm.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₇H₃₇F₁₃N₅O₈ = 806,2429; trouvé = 806,2434.

*F*₆H₈_Glucose (**31**).



À une solution de **29** (131 mg ; 0,13 mmol ; 1 équiv.) dans le MeOH (3 mL) est ajouté MeONa (7 mg ; 0,13 mmol ; 1 équiv.). La réaction est laissée à t.a. pendant 12 h sous agitation. Après la conversion complète de **29**, la résine IRC50 est ajoutée portion par portion au milieu réactionnel, puis la solution est agitée vigoureusement pendant 30 min pour obtenir un pH acide à ~4. Le milieu réactionnel est ensuite filtré puis la résine est rincée deux fois avec du

MeOH chaud. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie d'exclusion (Sephadex® LH-20, 100% MeOH). Les fractions pures collectées sont évaporées sous pression réduite, puis le résidu est dilué dans de l'eau milli-Q et lyophilisé pour donner le composé **31** (94 mg ; 87 %) sous forme d'une poudre blanche.

R_f (AcOEt/MeOH, 9:1 v/v) = 0,22. Tf: 175,9–176,2 °C.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8,50 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 8,08 (m, 1H); 7,98 (s, 1H); 5,00–4,99 (m, 1H); 4,93–4,90 (m, 2H); 4,82–4,78 (dd, *J* = 3,2 Hz, *J* = 12,2 Hz, 1H); 4,75–4,70 (m, 1H); 4,68–4,58 (m, 3H); 4,56–4,52 (m, 1H); 4,49–4,43 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 13,7 Hz, 1H); 4,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 3,72–3,67 (dd, *J* = 6,2 Hz, *J* = 10,1 Hz, 1H); 3,48–3,43 (m, 1H); 3,16–3,10 (m, 2H); 3,07–2,99 (m, 3H); 2,98–2,94 (m, 1H); 2,47–2,33 (m, 4H); 1,34 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 1,29–1,23 (m, 10H); 0,85 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ 169,6; 167,9; 143,5; 124,8; 102,0; 76,9; 76,7; 73,3; 70,0; 61,3; 61,1; 52,9; 50,3; 38,7; 31,2; 28,8; 28,7; 28,6; 26,2; 25,7 (2×CH₃); 22,0; 13,9. **RMN ¹⁹F (375 MHz, DMSO-*d*₆)** : δ -80,2 (3F); -113,6 (2F); -121,7 (2F); -122,6 (2F); -123,1 (2F); -125,8 (2F).

CLHP (XTerra, Waters, RP18) t_R (min) : 15,8 ; pureté de 96,9 % à 214 nm.

HRSM (ESI/Q-TOF) m/z: [M + H]⁺ calculé pour C₂₉H₄₁F₁₃N₅O₈ = 834,2742; trouvé = 834,2757.

1.3 Détermination des paramètres de polymérisation des dérivés PEGylés

❖ Degrés moyens de polymérisation en nombre \overline{DP}_n et en masse \overline{DP}_w

Les tensioactifs hybrides F–H PEGylés possèdent des chaînes polymériques PEG-OMe qui peuvent avoir des distributions de longueur de chaînes différentes avec un nombre de motifs moyen d'oxyde d'éthylène à déterminer en nombre \overline{DP}_n et en masse \overline{DP}_w avec les équations suivantes **(M.1)** et **(M.2)** :

$$\overline{DP}_n = \frac{\sum_i i \times N_i}{\sum_i N_i} \quad \text{(M.1)}$$

$$\overline{DP_w} = \frac{\sum_i i^2 \times N_i}{\sum_i i \times N_i} \quad (\text{M.2})$$

Où i représente le degré de polymérisation et N_i le nombre de molécules ayant le même degré de polymérisation i . Chaque pic de rapport m/z de la molécule au degré de polymérisation i est espacé d'environ 44 g/mol. Les pics secondaires espacés d'environ 22 et 38 g/mol sont caractéristiques d'un complexe avec le sodium Na ou le potassium K respectivement. Les degrés de polymérisation i sont attribués pour chaque pic de rapport m/z par rapport au calcul théorique de la masse molaire du tensioactif hybride F-H s'il contenait 100% de molécules N_i au degré de polymérisation i .

L'intensité des pics étant proportionnel au nombre de molécules N_i , il est alors possible de remplacer N_i dans les équations (M.1) et (M.2) par l'intensité donnée par le spectre MALDI-TOF pour chaque pic (cf. Figure M-1).

EB201\0_I7\1
SA

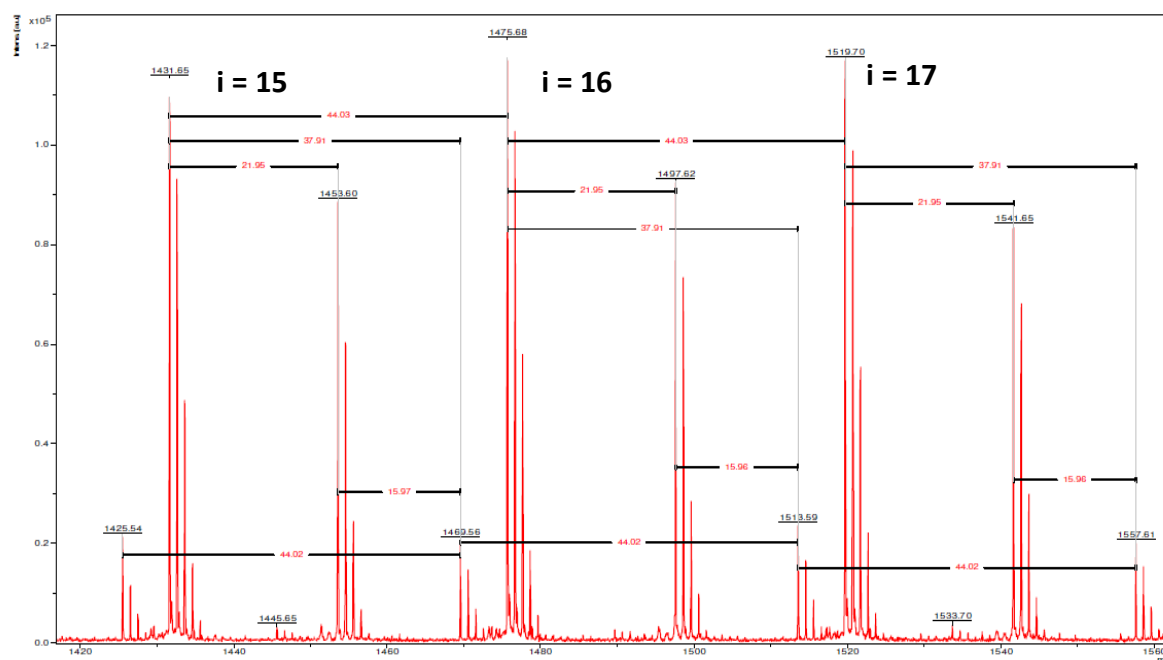


Figure M-1. Identification des pics de rapport m/z avec leur degré de polymérisation i associé du tensioactif hybride F-H $F_6H_8PEG750$.

Il est également possible de corroborer ces résultats avec la RMN, en divisant par 4 protons d'un motif oxyde d'éthylène, le nombre total de protons des pics correspondant à la répétition de ce motif (*cf. Figure M-2*).

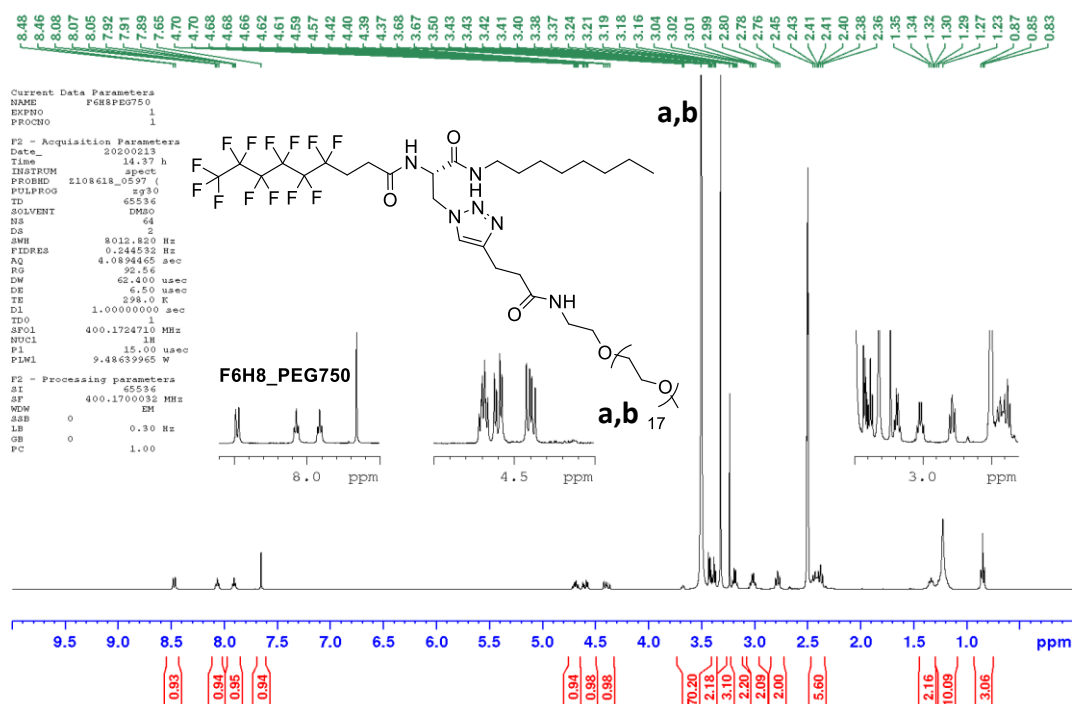


Figure M-2. Identification des protons H_a et H_b de la chaîne PEG pour le calcul du \overline{DP}_n du tensioactif hybride F-H $F_6H_8PEG750$.

On obtient un \overline{DP}_n d'environ 17,6 pour le tensioactif $F_6H_8PEG750$. Les résultats pour chaque tensioactif figurent en *Tableau M-1* :

Tensioactifs	$F_6H_6PEG750$	$F_6H_8PEG750$	$F_6H_6PEG2000$	$F_6H_8PEG2000$
\overline{DP}_n	16,8	16,8	41,6	41,1
\overline{DP}_n RMN	18,0	17,6	42,4	42,5
\overline{DP}_w	17,4	17,4	42,4	42,0
Tensioactifs	$F_8H_8PEG750$	$F_8H_{12}PEG750$	$F_8H_8PEG2000$	$F_8H_{12}PEG2000$
\overline{DP}_n	16,3	14,8	41,2	41,6
\overline{DP}_n RMN	17,2	14,9	42,5	48,3
\overline{DP}_w	16,7	15,0	42,2	42,5

Tableau M-1. Résultats pour le \overline{DP}_n et le \overline{DP}_w des tensioactifs hybrides F-H PEGylés.

Les résultats de \overline{DP}_n avec les techniques de RMN et de spectrométrie de masse MALDI-TOF permettent de confirmer un degré de polymérisation de 17 et de 42 pour les dérivés PEG750 et PEG2000 des tensioactifs de la série F₆. Le \overline{DP}_w permet de rendre compte des variations possibles du degré de polymérisation i liées à la masse molaire M_i de chaque entité N_i et va dans le sens des résultats trouvés pour le \overline{DP}_n .

Pour la série F₈, les résultats de \overline{DP}_n sont également similaires entre chaque technique excepté pour **F₈H₁₂PEG2000** avec 48 motifs trouvés en RMN contre 42 par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Bien que nous n'ayons pas plus d'explications sur la provenance de cette valeur en RMN qui a été calculée pour un seul lot, cette différence de \overline{DP}_n est minime. De plus, les résultats pour les dérivés PEG2000 sont similaires en spectrométrie de masse MALDI-TOF, ces valeurs semblent donc plus fiables à prendre en compte. Le \overline{DP}_w permet d'appuyer les résultats trouvés pour le \overline{DP}_n avec environ 17 motifs pour **F₈H₈PEG750**, 15 motifs pour **F₈H₁₂PEG750**, et 42 motifs pour les dérivés PEG2000. La diminution du nombre de motifs pour **F₈H₁₂PEG750** pourrait être issue de la procédure de purification du lot par Sephadex LH-20.

❖ Détermination des masses moyennes en nombre \overline{M}_n , en masse \overline{M}_w et de l'indice de polydispersité PDI

Pour compléter l'étude de ces tensioactifs PEGylés, il est utile de s'intéresser à la polydispersité de l'échantillon analysé par MALDI-TOF. Ainsi, l'indice de polydispersité (PDI) rend compte de la distribution plus ou moins étendue sur le spectre MALDI-TOF des composés N_i de masses M_i définies qui constitue l'entité polymoléculaire qu'est notre tensioactif hybride F–H PEGylé. Le PDI est défini comme le rapport de la masse moléculaire moyenne en nombre \overline{M}_n sur celle en poids \overline{M}_w en équation **(M.3)** :

$$\text{PDI} = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad \text{(M.3)}$$

\overline{M}_n correspond à la moyenne pondérée des masses molaires M_i par le nombre de molécules N_i ayant le même degré de polymérisation i . Tandis que \overline{M}_w représente la moyenne pondérée des masses molaires M_i par la masse totale des molécules N_i ayant le même degré de polymérisation i . Elles sont ainsi calculées à partir des équations suivantes **(M.4)** et **(M.5)** :

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i \times M_i}{\sum_i N_i} \quad (\text{M.4})$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i \times M_i^2}{\sum_i N_i \times M_i} \quad (\text{M.5})$$

Les calculs ont pu être réalisés à partir des données d'intensité de chaque rapport m/z à une masse M_i définie. Les résultats pour \overline{M}_n , \overline{M}_w et le PDI de chaque échantillon de tensioactif hybride F–H figurent en *Tableau M-2*. Pour un polymère possédant un PDI égal à 1, cela signifie que toutes les entités polymoléculaires N_i le constituant possèdent le même degré de polymérisation i et donc $\overline{M}_n = \overline{M}_w$. Il serait alors considéré comme polymère idéal.

MALDI-TOF	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG750	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG2000
\overline{M}_n	1482,7	1512,0	2574,1	2582,5
\overline{M}_w	1496,2	1524,4	2600,0	2609,7
PDI	1,009	1,008	1,010	1,011
MALDI-TOF	F ₈ H ₈ PEG750	F ₈ H ₁₂ PEG750	F ₈ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₁₂ PEG2000
\overline{M}_n	1590,6	1579,5	2686,1	2758,9
\overline{M}_w	1598,9	1583,4	2717,7	2785,7
PDI	1,005	1,002	1,011	1,010

Tableau M-2. Résultats pour le \overline{M}_n , le \overline{M}_w et le PDI pour les tensioactifs hybrides F–H PEGylés.

Les données finales d'indice de polydispersité pour chaque tensioactif révèlent que les différentes têtes PEG greffées sont très peu polydisperses avec un PDI de 1,01.

2. Caractérisation des agrégats de tensioactifs hybrides F–H

2.1 La tensiométrie de surface (TS)

Les cmc , γ_{cmc} et ΔG°_{mic} ont été mesurées pour chaque tensioactif hybride F–H PEGylé et les Γ_{max} , A_{min} ont été mesurées pour la série F₆ automatiquement par un tensiomètre Krüss K100 (Hambourg, Allemagne) *via* la méthode du plateau de Wilhelmy à 25 °C.

Matériel et méthodes

Pour la série F₆, une solution stock de tensioactif est préparée dans une fiole jaugée de 25 mL dans l'eau milli-Q (26 µM ; 48 µM ; 137 µM et 377 µM pour **F₆H₈PEG750**, **F₆H₈PEG2000**, **F₆H₆PEG750** et **F₆H₆PEG2000** respectivement). Pour la série F₈, une solution stock de tensioactif est préparée dans une fiole jaugée de 100 mL à 100 mg/L. A partir de cette solution stock, 10 à 15 solutions de tensioactif de 0,001 mg/L à 100 mg/L sont préparées dans une fiole jaugée de 20 mL.

Toutes les solutions d'échantillons sont laissées une nuit à température ambiante afin de permettre une stabilisation des solutions colloïdales. Puis 10 mL (série F₈) ou 20 mL (série F₆) de la solution stock choisie sont prélevés précisément avec une pipette jaugée et sont transvasés dans un cristalliseur adapté placé dans l'enceinte du tensiomètre. La tension de surface γ est mesurée à l'aide de la plaque de Wilhelmy qui est brûlée à la flamme avant chaque utilisation.

Pour la série F₆, la solution stock est graduellement diluée automatiquement par un volume constant à l'aide de dosimètres contrôlés par le logiciel Krüss. Après chaque dilution, la solution résultante est agitée 90 sec à l'aide d'un barreau aimanté avant de commencer la mesure de la tension de surface.

Pour la série F₈, plusieurs mesures successives de la tension de surface γ sont effectuées toutes les 2 min pour chaque concentration préparée individuellement.

Chaque point est réalisé avec une valeur moyennée de tension de surface γ de 8 mesures avec une déviation standard égale ou inférieure à $\pm 0.5\text{mN/m}$. L'acquisition de la courbe de γ en fonction du logarithme népérien de la concentration est réalisée avec 20–30 concentrations différentes sur le logiciel Krüss pour la série F₆, et est réalisée avec 15 concentrations sur le logiciel Excel pour la série F₈. Des régressions linéaires sont faites sur les deux régions distinctes présentes sur la courbe (pour la pente et le plateau) où le point d'intersection de ces droites est la valeur de cmc. Dans le cas de la série F₆, le logiciel Krüss calcule automatiquement les autres paramètres tels que γ_{cmc} , Γ_{max} , A_{min} et ΔG°_{mic} . Dans le cas de la série F₈, γ_{cmc} et ΔG°_{mic} ont été déterminées par les équations des régressions linéaires et par l'équation **(III.3)** du Chapitre III respectivement. Les expériences ont été dupliquées pour chaque tensioactif de la série F₆ et ont été faites une fois pour la série F₈.

2.2 La titration calorimétrique isotherme (TCI)

Les expériences en microcalorimétrie à haute sensibilité ont été réalisées à 25 °C avec un microcalorimètre iTC200 (Malvern Instruments, Malvern, UK) pour les dérivés en F₆H₆, et sur un microcalorimètre VP-ITC pour les dérivés en F₆H₈ et F₈H₈ (Malvern Instruments, Malvern, UK). Toutes les solutions stocks ont été préparées dans l'eau milli-Q, à une concentration de 0,12 mM ; 0,3 mM ; 0,6 mM et 2 mM pour **F₆H₈PEG750**, **F₆H₈PEG2000**, **F₆H₆PEG750** et **F₆H₆PEG2000** respectivement et à 15 μM, 10 μM pour **F₈H₈PEG2000** et **F₈H₈PEG750** respectivement.

Pour les expériences de démicellisation, 70 μL (iTC200) ou 500 μL (VP-ITC) d'une solution aqueuse stock de tensioactif sont prélevés par la seringue de l'appareil. Simultanément, les cuves de référence et de démicellisation sont remplies avec de l'eau milli-Q. Un équilibrage de 10 à 20 min est réalisé avant chaque expérience pour obtenir le thermogramme de référence dans l'eau pure. Le temps entre chaque injection est choisi suffisamment long (entre 200 et 300 sec) pour permettre à chaque pic de démicellisation de revenir à son état d'équilibre initial. La seringue contenant la solution stock de tensioactif est ensuite introduite dans la cuve de démicellisation. 20 injections sont réalisées et pilotées par le logiciel de microcalorimétrie connecté à l'appareil pour délivrer successivement 2 μL (iTC200) ou 15 μL (VP-ITC) de solution dans la cuve de démicellisation.

La normalisation des thermogrammes bruts obtenus et l'intégration des pics sont réalisées automatiquement par le logiciel NITPIC¹⁹. Les isothermes résultantes ont été normalisées par rapport à la concentration molaire de chaque tensioactif au cours de l'expérience. L'ajustement linéaire par la méthode des moindres carrés des isothermes et la détermination de la cmc et des paramètres thermodynamiques, tels que ΔG°_{mic} , ΔH°_{mic} et $-T\Delta S^{\circ}_{mic}$, ont été déterminés automatiquement par le logiciel D/STAIN²⁰. Pour chaque tensioactif, les expériences ont été au moins dupliquées.

2.3 La spectrofluorimétrie

Les expériences de spectrofluorimétrie ont été réalisées avec un spectrofluorimètre FluoTime 300 (Pico Quant, Berlin, Allemagne). Les cmc des tensioactifs PEGylés ont été déterminés en utilisant un agent fluorescent lipophile, le Rouge Nil.

Les solutions stocks de tensioactifs à 1 ou 2 mM et de Rouge Nil à 1 μM sont préparées séparément dans de l'eau milli-Q la veille des expériences et sont conservées à l'abri de la lumière avant utilisation. Pour la solution stock de Rouge Nil à 1 μM , celle-ci est préparée par dilution dans l'eau milli-Q d'un volume précis de solution méthanolique de Rouge Nil à 2,6 mM.

Les solutions d'échantillons sont préparées à différentes concentrations en tensioactif en gardant la concentration en Rouge Nil constante (0,5 μM). Un blanc sans tensioactif à 0,5 μM de rouge Nil est préparé. Les échantillons et le blanc sont ensuite gardés à l'abri de la lumière toute une nuit à température ambiante avant l'acquisition. Les échantillons sont ensuite placés dans une cuve en quartz de dimension 3 mm \times 3 mm et la fluorescence résultante du Rouge Nil est mesurée par le spectrofluorimètre. La température dans la cuve est thermostatée à 25 °C durant l'acquisition.

L'appareillage est contrôlé par le logiciel EasyTau (PicoQuant, Berlin, Allemagne) pour l'acquisition des spectres d'émission du Rouge Nil. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 466 nm et la gamme de longueurs d'onde d'émission est fixée entre 500 et 750 nm pour le Rouge Nil. Pour chaque concentration testée, 3 spectres sont enregistrés de façon à moyenner les intégrations de l'intensité (entre 500 et 750 nm) faites automatiquement avec le logiciel à une précision de 12 chiffres après la virgule. L'intégration de l'intensité moyennée pour chaque concentration est utilisée pour déterminer la quantité de Rouge Nil incorporée dans les micelles. Les fentes d'émission et d'excitation ont été fixées avec une bande passante de 5 nm.

2.4 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les distributions de taille des particules hydrodynamiques ont été déterminées à l'aide d'un Zetasizer Nano-S model 1600 (Malvern) équipé d'un détecteur laser He-Ne ($\lambda=633$ nm, 4 mW). Les solutions micellaires ont été préparées dans une gamme de concentrations de 1 à 50 g/L pour la série F₆ et de 1 à 10 g/L pour la série F₈. Ces solutions ont été filtrées sur un filtre Millipore® 0,22 μm à membrane de cellulose, centrifugées 1 h (7500 rpm, 25 °C) puis ont été laissées à température ambiante dans un eppendorf fermé pendant 12 h, avant d'être transférées dans une cuve en quartz de volume 1 mL. La fonction de corrélation dépendante du temps, pour l'intensité de lumière diffusée, a été mesurée à un angle de 173° (détecteur de rétrodiffusion). Toutes les mesures ont été tripliquées à (25 ± 0.5) °C, avec un nombre de scans de l'échantillon par mesure, déterminé automatiquement par l'appareil. L'analyse en CONTIN a été utilisée pour évaluer les fonctions d'autocorrélation.

Les diamètres hydrodynamiques (D_H) des particules colloïdales ont été estimés automatiquement par le logiciel par rapport à leur coefficient de diffusion (D), en utilisant la relation de Stokes-Einstein (**III.10**) décrite dans le Chapitre III. Ces D_H ont été rapportés sur le logiciel Excel en fonction de la concentration micellaire étudiée. L'extrapolation à 0, obtenue après régression linéaire, permet d'obtenir les valeurs de D_H à dilution infinie. Les barres d'erreurs ont été déterminées automatiquement par le logiciel Zetasizer pour chaque point.

2.5 La chromatographie d'exclusion stérique – diffusion statique de la lumière (CES-SLS)

❖ Préparation des solutions tampons pour l'élution des échantillons par CES-SLS

Une solution stock aqueuse (40 mM TRIS, 200 mM NaCl) est préparée à pH = 7,4 en ajustant le pH avec $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 3M ou $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 3M, puis elle est filtrée sous vide sur un filtre millipore 0,22 μm . Pour chaque tensioactif, la solution tampon finale de CES-SLS est faite en diluant 125 mL de la solution stock initiale dans une solution micellaire aqueuse. Cette dernière, comportant le tensioactif à étudier pour obtenir un volume final de 250 mL de

Matériel et méthodes

solution, est ensuite filtrée sur un filtre millipore 0,22 μm (20 mM TRIS, 200 mM NaCl, pH=7.4) pour atteindre une concentration finale en tensioactif à environ $3 \times$ la cmc. Toutes les solutions tampons de CES-SLS sont ensuite stockées à 25 °C avant utilisation comme éluant.

❖ Détermination des incréments d'indice de réfraction $\partial n/\partial c$

Pour déterminer le $\partial n/\partial c$ de chaque tensioactif étudié, une gamme de concentrations allant de 0 à 10 mM pour chaque tensioactif est préparée dans l'eau. Les indices de réfractons n sont déterminés pour chaque concentration en utilisant un réfractomètre Abbemat (Anton Paar, Graz, Autriche) à 25 °C. $\partial n/\partial c$ (mL/g) est calculé comme le coefficient de pente de la droite issue de la régression linéaire des points de variations de l'indice de réfraction Δn ($n - n_0$), avec n_0 l'indice de réfraction de l'eau à 25 °C mesuré par le réfractomètre) en fonction de la concentration en tensioactif (cf. Figure M-3).

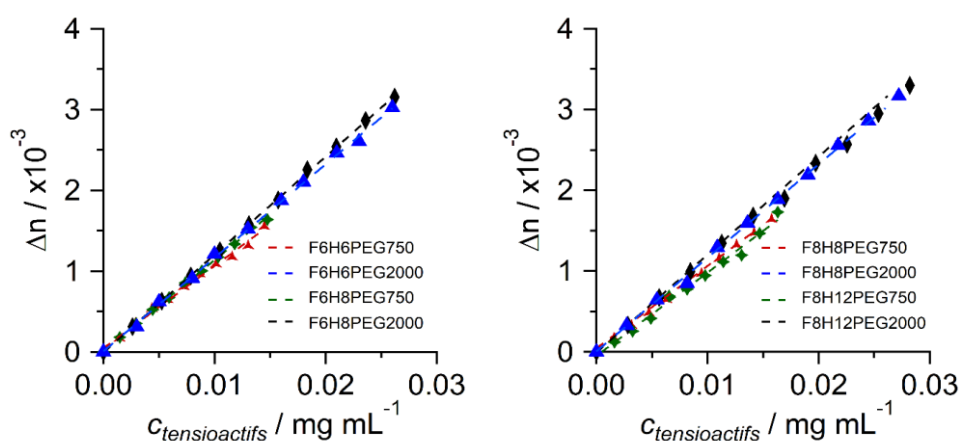


Figure M-3. Représentation graphique de la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en tensioactif.

Ces valeurs de $\partial n/\partial c$ figurent dans le *Tableau M-3* :

Résultats	F ₆ H ₆ PEG2000	F ₆ H ₆ PEG750	F ₆ H ₈ PEG2000	F ₆ H ₈ PEG750
$\partial n/\partial c$ (mL/g)	0,116	0,106	0,121	0,114
MALDI-TOF	F ₈ H ₈ PEG2000	F ₈ H ₈ PEG750	F ₈ H ₁₂ PEG2000	F ₈ H ₁₂ PEG750
$\partial n/\partial c$ (mL/g)	0,116	0,104	0,116	ND

Tableau M-3. Valeurs de $\partial n/\partial c$ obtenues pour chaque tensioactif hybride F–H PEGylé.

$\partial n/\partial c$ est ensuite entré manuellement dans les paramètres d'acquisition du logiciel OmniSEC (Malvern) avant chaque expérience avec le tensioactif étudié. Il permettra de déterminer avec le signal IR, la concentration effective de l'échantillon pour le calcul de M_w .

❖ Préparation des échantillons avant injection

Les solutions micellaires analysées sont préparées à 2,5 mM pour tous les dérivés PEG2000 (**F₆H₆PEG2000**, **F₆H₈PEG2000**, **F₈H₈PEG2000** et **F₈H₁₂PEG2000**) et 5 mM pour les dérivés PEG750 (**F₆H₆PEG750**, **F₆H₈PEG750** et **F₈H₈PEG750**). Le volume d'injection pour chaque échantillon a été fixé à 50 μ L.

❖ Conditions expérimentales lors de l'acquisition

L'élution des échantillons a été faite sur le système OmniSEC system (Malvern) avec une colonne haute performance Superdex 75 10/300 GL (10x300–310 mm) provenant de GE HealthCare. Cette colonne contient une matrice composite d'agarose réticulée et de dextran, permettant un intervalle de séparation des composés élués entre 3–70 kg/mol. L'équilibrage avant chaque expérience est réalisée avec une solution tampon CES-SLS du tensioactif à étudier préparée au préalable (3 volumes colonne, 4 h d'équilibrage) à un débit de 0,1 mL/min.

Les détecteurs (indice de réfraction *IR*, ultraviolet *UV*, diffusion de la lumière *LS*) sont ensuite purgés avec un débit de 0,5 mL/min et ce débit sera également utilisé pour chaque expérience. Pour chaque expérience avec un tensioactif, deux injections répliquées sont réalisées consécutivement avec 35 min d'acquisition pour chaque réplicat.

L'acquisition des profils d'élution à détection triple (*IR*, *UV*, *LS*) est faite avec l'aide du logiciel OmniSEC (Malvern), en normalisant les signaux des détecteurs par rapport aux signaux issus de la période d'équilibrage avec l'éluant seul. La calibration de la méthode de calcul du logiciel a été faite avec un échantillon de protéine de référence (sérum bovin, BSA) ayant un pic d'élution et une masse molaire bien définis. Les masses molaires en poids M_w des particules sont directement calculées sur le logiciel par la dérivée des signaux de détection, en se référant à l'équation de Rayleigh (III.12) de la diffusion de la lumière décrite dans le Chapitre III.

2.6 La microscopie (MET) et cryo-microscopie (Cryo-ME) électronique à transmission

Les images MET et Cryo-ME ont été réalisées par nos collaborateurs de l'université de Halle-Wittenberg en Allemagne, dans l'équipe du Dr. Annette Meister (Equipe ZIK HALOmem & Institut de Biochimie et Biotechnologie).

❖ Microscopie électronique à transmission (MET) par technique de coloration négative

Pour la série F₈ PEGylée, les solutions de tensioactifs ont été faites à 0,1 g/L dans l'eau milli-Q.

Pour la série glucosylée, les solutions aqueuses de **F₆H₆_Glucose** et **F₆H₈_Glucose** ont été préparées respectivement à des concentrations de 1 g/L et 0,75 g/L. Ces dernières sont ensuite incubées à 30 °C pendant 2 h sous agitation, puis sont vortexées 3 min à température ambiante pour s'assurer de la solubilisation complète du tensioactif en solution. On obtient à ce stade une solution légèrement trouble qui présente des tailles de populations hétérodisperses en DLS. Pour obtenir des populations monodisperses de VUL, la technique d'extrusion sur les échantillons a été appliquée (*cf. Schéma M-1*).

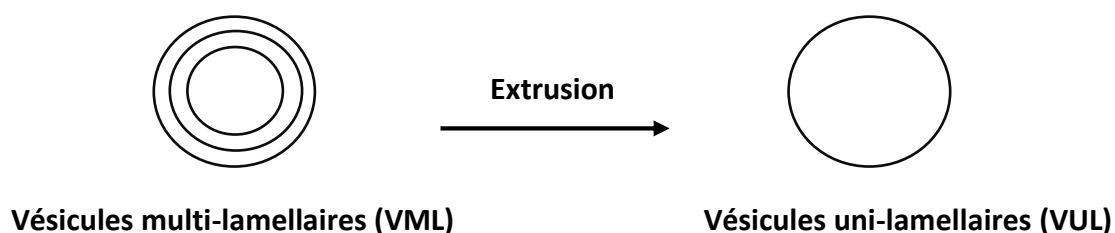


Schéma M-1. Obtention d'une population monodisperse de VUL formées à partir d'une solution initiale hétérodisperse de VML après utilisation de la méthode d'extrusion.

L'extrusion est réalisée à l'aide de deux seringues poussoirs connectées entre-elles par un dispositif central où se trouve une membrane en polycarbonate porosité 100 nm faisant office de séparation (*cf. Figure M-4*).

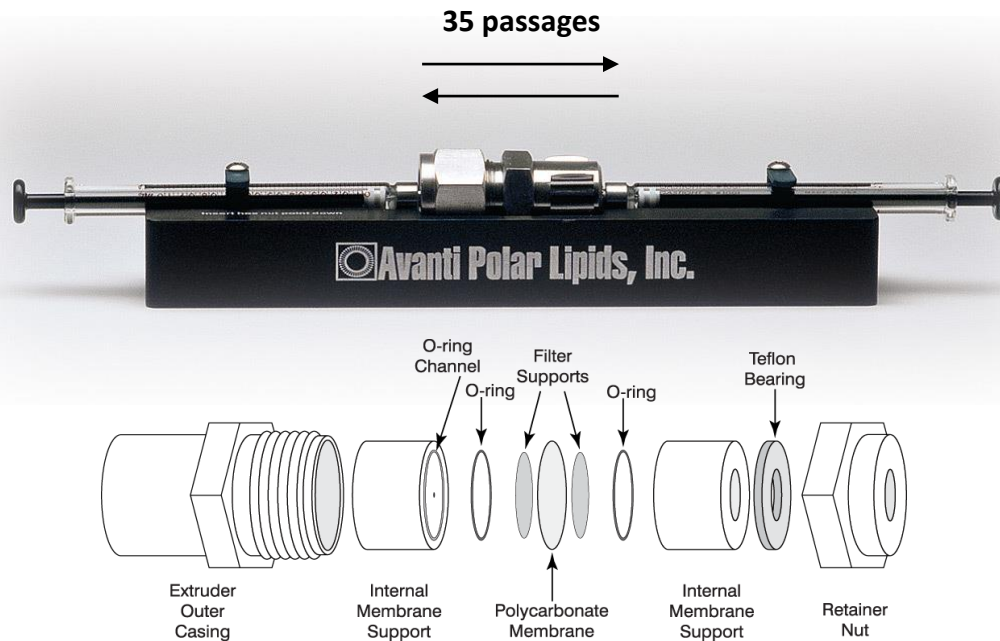


Figure M-4. Photo d'un montage d'extrusion comportant les deux seringues poussoirs avec le dispositif central qui contient la membrane en polycarbonate de porosité 100 nm.

Cette membrane est protégée par 2 filtres et supports de filtre pour éviter toute rupture de la membrane. Le principe consiste à faire passer 1 mL de chaque échantillon prélevé initialement dans une première seringue à travers la membrane dans la seconde seringue réceptrice. Le but est d'apporter suffisamment d'énergie au système pour homogénéiser les tailles et formes de vésicules de l'échantillon par rapport à la porosité de 100 nm.

Au bout de 35 passages consécutifs, l'échantillon final est recueilli dans la seringue réceptrice et il est ensuite analysé directement en DLS dans une cuve de quartz de 1 mL à 25 °C pour s'assurer au préalable d'une taille de population homogène à ~100 nm.

Protocole de dépôt des échantillons sur grille et visualisation des images MET

Les grilles de microscopie ont été préparées en chargeant 5 μ L de suspensions de dérivés PEGylés F₈ (0,1 mg/mL) sur des grilles de carbone continu Quantifoil® qui ont été traitées par décharge lumineuse pour les rendre plus hydrophiles, augmenter leur mouillabilité et faciliter l'application des échantillons aqueux dessus (300 mesh; Quantifoil Micro Tools GmbH,

Großlöbichau, Allemagne). L'excès de liquide a été épongé avec une bande de papier filtre après 30 s, suivi de deux étapes de lavage et de coloration avec 5 µL de solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 2 % (masse/volume). Les dérivés glucosylés ont été préparés en étalant 5 µL de la suspension sur une grille Cu recouverte d'un film Formvar (PLANO, Wetzlar, Allemagne). Les échantillons ont été séchés et examinés au microscope électronique à transmission EM 900 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Allemagne) et les micrographies ont été enregistrées à l'aide d'une caméra SSCCD SM-1k-120 slow-scan charge coupled device (TRS, Moorenweis, Allemagne).

❖ Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-ME)

Les solutions aqueuses des dérivés glucosylés ont été préparées à des concentrations de 0,1 mg/mL et extrudés sur membrane de porosité 100 nm. Pour observer les échantillons en imagerie Cryo-ME, 5 µL de solution d'échantillon sont déposés sur une grille de cuivre recouverte d'un film à trous carbonaté (C-flat™, Protochips Inc., Raleigh, NC). L'excès de solution est épongé avec du papier filtre, puis l'ensemble est congelé par immersion rapide dans de l'éthane liquide (-88,6°C) à l'aide d'un système EM GP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne). Les échantillons sont ensuite observés avec un microscope LIBRA 120 PLUS (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Allemagne) opérant à 120 kV. Le microscope est équipé d'un système de cryotransfert Gatan 626 permettant de préserver l'échantillon congelé à basse température. Les images ont été prises avec une caméra Dual-Speed on axis SSCCD BM-2k-120 (TRS, Moorenweis, Allemagne).

2.7 Etude de la stabilité des VUL formées par F₆H₆_Glucose en DLS

L'étude de la stabilité des VUL formés par le tensioactif F₆H₆_Glucose en DLS a été réalisée dans le laboratoire du Prof. Dr. Keller (Kaiserslautern, Allemagne). Le modèle d'appareil utilisé est le Nanosizer ZS90 (Malvern) équipé d'un laser He-Ne ($\lambda=633$ nm, 4 mW) avec un angle de détection de 90°.

❖ Préparation des solutions tampon

Les solutions tampons (eau Milli-Q et PBS) ont été utilisées pour préparer les échantillons de VUL formés par **F₆H₆_Glucose**. Le tampon salin PBS (0,137 M NaCl, 1,34 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) est préparé à pH = 7,4 en ajustant le pH avec HCl_(aq) 3M ou NaOH_(aq) 3M et est filtrée sous vide sur filtre millipore® 0,22 µm. Toutes les solutions tampons sont ensuite stockées à 25 °C avant utilisation.

❖ Préparation des échantillons

Les VUL de **F₆H₆_Glucose** ont été préparées à une concentration de 1 g/L dans l'eau milli-Q et le tampon PBS selon le protocole de microscopie décrit précédemment. Les échantillons sont ensuite analysés directement en DLS dans une cuve de quartz de 1 mL à 25 °C ou chauffé à 37 °C avant d'être analysé en DLS pour vérifier la monodispersité de populations dans chaque échantillon. Les paramètres d'acquisition des mesures ont été configurés sur le logiciel Zetasizer (Malvern) en mode automatique avec 2 sec de pause entre chaque mesure. Pour le suivi dans le temps, les échantillons sont conservés dans des eppendorfs fermés, soit à 25 °C soit dans un incubateur thermostaté à 37 °C, pour être réanalyser ultérieurement en DLS en fonction du temps choisi.

3. Encapsulation du paclitaxel par les micelles F₈ PEGylées

Le PTX a été gracieusement fourni par nos collaborateurs du Département de Pharmacie à Marseille (Equipe GlioME-Institut de neuropathologie-Hôpital de La Timone) et est stocké à 4 °C au réfrigérateur avant chaque utilisation. Une solution stock de PTX dans l'éthanol est préparée à 1 g/L, puis elle est placée dans un bain à ultrasons jusqu'à complète solubilisation. Celle-ci est conservée au réfrigérateur à 4 °C. L'eau milli-Q (résistivité de 18,2 MΩ cm, tension de surface de 71,45 mN/m à 25 °C) a été utilisée dans la préparation des échantillons et comme solvant d'élution en CLHP. Tous les solvants organiques (EtOH, MeOH) utilisés lors de la préparation des échantillons et de l'analyse CLHP sont de qualité analytique.

3.1 Préparation des échantillons par dispersion aqueuse dans un film organique sec

❖ Protocole de mise en contact

Le tensioactif **F₈H₁₂PEG2000** est solubilisé dans un volume précis de solution éthanolique de PTX à 1 g/L dans un vial de 8 mL. Ce volume est à déterminer au préalable suivant la valeur de %_{mass.,(i)} de PTX choisie (*i.e.* 5, 7 ou 10 %_{mass.}) Ce vial est ensuite séché sous un flux d'azote à 25 °C pendant 1 h pour former un film sec. Le film est ensuite réhydraté avec de l'eau milli-Q à 60 °C jusqu'à atteindre une concentration en tensioactif égale à 1 g/L, et il est agité à 25 °C en continu à différents temps de mise en contact. Au bout de 15 min, 30 min et 1 h 30, un volume d'environ 700 µL est prélevé de la solution pour être filtré sur membrane de cellulose 0,45 µm. Le filtrat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 10 000 rpm à 25 °C. 400 µL de surnageant sont ensuite prélevés puis lyophilisés toute une nuit. Les échantillons tripliqués pour l'analyse en CLHP sont ensuite solubilisés avec 200 µL de MeOH qualité CLHP, puis vortexés pour assurer la complète déstabilisation des micelles chargées en PTX avant leur injection. Des échantillons supplémentaires ont été faits dans les mêmes conditions pour contrôler avant et après lyophilisation/réhydratation dans l'eau la stabilité de taille des micelles chargées en DLS.

❖ Protocole de suivi de relargage passif

Le tensioactif **F₈H₁₂PEG2000** est solubilisé dans un volume précis de solution éthanolique de PTX à 1 g/L dans un vial de 8 mL. Ce volume est à déterminer au préalable pour obtenir une formulation micellaire à 7 %_{mass.,(i)} de PTX après réhydratation du film. Ce vial est ensuite séché sous un flux d'azote à 25 °C pendant 1 h pour former un film sec. Ce film est ensuite réhydraté avec de l'eau milli-Q à 60 °C jusqu'à atteindre une concentration en tensioactif égale à 1 g/L, et est agité à 25 °C en continu pendant 15 min. Puis, l'échantillon est filtré sur membrane de cellulose 0,45 µm, le filtrat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 10 000 rpm à 25 °C. Immédiatement, 400 µL de surnageant sont prélevés, puis lyophilisés toute une nuit, pour constituer le $t_0 = 0$ min du relargage. Le reste de la solution surnageante est

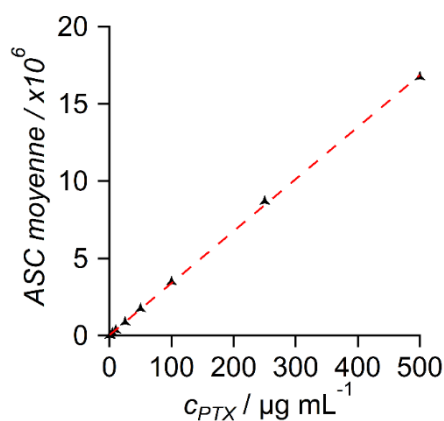
remise sous agitation continue à 25 °C pendant 72 h. À différents temps d'acquisition choisis (*i.e.* 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h) un volume d'environ 700 µL est prélevé de la solution pour être filtré sur membrane de cellulose 0,45 µm. Le filtrat est ensuite centrifugé pendant 10min à 10 000 rpm à 25 °C. 400 µL de surnageant sont ensuite prélevés, puis lyophilisés toute une nuit. Les échantillons tripliqués pour l'analyse en CLHP sont ensuite resolubilisés avec 200 µL de MeOH de qualité analytique, puis vortexés pour assurer la complète déstabilisation des micelles chargées en PTX avant leur injection. Un échantillon supplémentaire à $t_0 = 0$ min a été fait dans les mêmes conditions pour contrôler, avant et après lyophilisation/réhydratation dans l'eau, la stabilité de taille des micelles chargées en DLS.

3.2 Paramètres chromatographiques de la CLHP

L'appareil de CLHP utilisé pour toutes les expériences avec le PTX est un modèle 2690/5 Alliance Waters (Milford, US) avec une boucle d'injection de 100 µL, un système de contrôle par ordinateur sur le logiciel Empower 3 et un détecteur UV visible W2998. La séparation chromatographique a été effectuée avec une colonne C₁₈ SunFire[®] (porosité 3,5 µm ; 4,6×150 mm, Waters) thermostatée à 35 °C. Le gradient d'élution utilisé est MeCN/eau avec un débit de 1,2 ml/min comme suivant : entre 0–2 min, élution isocratique à 30 % de MeCN ; entre 2–22 min, gradient d'élution de 30 % à 80 % de MeCN ; entre 22–26 min, élution isocratique à 80 % d'acétonitrile ; entre 26–31 min, gradient d'élution de 80 % à 30 % d'acétonitrile ; entre 31–40 min, élution isocratique à 30 % de MeCN (fin de l'acquisition). La détection des pics sur le chromatogramme a été faite à $\lambda_{\max} = 227$ nm pour le PTX. Le volume d'injection est fixé à 20 µL et chaque injection est tripliquée consécutivement pour chaque échantillon.

3.3 Courbe de calibration pour le PTX en CLHP

Pour quantifier le PTX par CLHP dans les échantillons, des solutions standards de PTX dans MeOH ont été préparées par dilutions successives dans une gamme de concentration de 0,25 à 500 µg/mL (10 points) à partir d'une solution mère de PTX à 1 g/L dans MeOH. 20 µL d'échantillon sont injectés pour l'acquisition et chaque injection d'échantillon est tripliqué consécutivement. Pour chaque injection, le pic du PTX est élué à un temps de rétention ≈14,8 min et il est intégré automatiquement par le logiciel Empower pour obtenir l'aire sous la courbe après acquisition du chromatogramme. La courbe de calibration est exploitée graphiquement sur le logiciel Excel en représentant l'aire moyenne des triplicats d'injections en fonction de la concentration massique en PTX dans l'échantillon (µg/mL). Les écart-types standards pour l'aire moyenne sont également calculées par rapport aux triplicats d'injections (cf. Figure M-5).



C_{PTX} (µg/mL)	ASC moyenne	Ecart-type standard
0,25	9474	39
0,5	17790	16
1	35312	445
5	170479	1480
10	345427	801
25	865900	2078
50	1737455	6271
100	3489153	26015
250	8684121	3031
500	16731810	201901

Figure M-5. Courbe de calibration du PTX dans le MeOH (à gauche) et tableau de résultats (à droite) pour chaque concentration après acquisition des chromatogrammes sur la CLHP.

La régression linéaire permet d'obtenir l'équation de droite $y=33764 x$, où y représente l'aire moyenne sous la courbe et x la concentration en PTX associée. Le coefficient de corrélation obtenu r^2 est de 0,9996.

3.4 Quantification du PTX dans chaque échantillon

La quantification du PTX dans les micelles est effectuée en calculant l'aire moyenne sous la courbe de l'échantillon par intégration du pic de rétention du PTX pour chaque injection tripliquée. La concentration en PTX chargé dans les micelles ($C_{\text{PTX chargé}}$) est ensuite retrouvée par l'équation de la courbe de calibration $y = 33764 x$. La valeur obtenue est ensuite divisée par 2 pour retrouver la valeur réelle de $C_{\text{PTX chargé}}$. Les échantillons ont été eux-mêmes tripliqués pour obtenir les valeurs moyennées de $C_{\text{PTX chargé}}$, des paramètres C.M. et E.E. (%mass.) avec un écart-type standard défini.

3.5 Tests cellulaires effectués

Les tests cellulaires ont été réalisés par nos collaborateurs du Département de Pharmacie à Marseille (Equipe GliOME-Institut de neuropathologie-Hôpital de La Timone). Des aliquotes lyophilisées de 1 mL d'une formulation de micelles chargées en PTX (**F₈H₁₂PEG2000-PTX**) ont été préparées pour ces tests dans notre laboratoire. La formulation micellaire a été préparée à 7 %_{mass.,(i)} de PTX, par la méthode de *dispersion solide* avec un volume de départ de 8,2 mL de solution micellaire à 1 g/L. Les paramètres C.M. et E.E. ont été déterminés par CLHP de contrôle respectivement à 2,97 et 4,54 %_{mass.} (avec $C_{\text{PTX chargé}} = 3,18 \mu\text{g/mL}$).

❖ Culture cellulaire

Les cellules cancéreuses pulmonaires humaines (A549) sont cultivées dans un milieu de culture RPMI (Gibco), complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) et 1 % (v/v) de streptomycine/pénicilline (Gibco). Les cellules sont maintenues en culture dans une étuve à 37°C, contenant une atmosphère humidifiée et enrichie avec 5 % de CO₂. Le passage et l'ensemencement des cellules sont réalisés par rinçage avec un tampon PBS, puis décollement des cellules grâce à la trypsine (0,05 % Trypsin/EDTA 1 X) pendant 5 min à 37 °C et centrifugation.

❖ Test de viabilité cellulaire

Les cellules sontensemencées sur des plaques de culture 96 puits avec une densité de 5000 cellules par puits, puis elles sont traitées, 24 h après l'ensemencement, par différentes concentrations de tensioactif **F₈H₁₂PEG2000** ou de formulation de micelles-PTX (**F₈H₁₂PEG2000**-PTX), obtenues après reconstitution avec de l'eau milli-Q filtrée sur 0,2 µm d'un aliquot lyophilisé, et dilution dans du milieu de culture. Afin d'évaluer l'innocuité du tensioactif, les cellules A549 sont traitées par 0,36 ; 0,72 ; 3,6 ; 7,2 ; 18 et 36 µM de tensioactif. Afin d'évaluer l'activité pharmacologique des micelles-PTX, les cellules A549 sont traitées par différentes concentrations de micelles-PTX correspondant à 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 75 nM de PTX. Pour maintenir une concentration stable en tensioactif, les différentes concentrations de micelles-PTX sont obtenues par dilution dans une solution de **F₈H₁₂PEG2000** à 7,2 µM.

Après 72 h de traitement, la viabilité cellulaire est évaluée par un test colorimétrique, le test au MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant du MTT à une concentration de 0,5 mg/mL et les cellules sont remises à l'étuve pendant 2 h. Après remplacement du MTT par du DMSO, l'absorbance de la plaque est lue au POLARstar® BMG LABTECH à 600 nm. Chaque expérience est répétée de façon indépendante, 3 fois minimum. Le pourcentage de viabilité cellulaire est obtenu par la formule **(IV.1)**.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- (1) Résultats du nombre de citations du terme “drug delivery” par an. [en ligne] In : *PubMed.gov*. Disponible sur : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=drug%20delivery&sort=&timeline=expanded> (consulté le 12/01/2021)
- (2) Piquard, L. Le devenir du médicament dans l’organisme : un voyage en plusieurs étapes. In : *Actu Soins Magazine* [en ligne] (Publié le 09/06/2017) Disponible sur : https://www.actusoins.com/288281/devenir-medicament-lorganisme-voyage-plusieurs-etapes.html#Les_autres_voies_d%E2%80%99elimination (consulté le 17/01/2021)
- (3) Kalepu, S. et Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, 5 (5), 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- (4) Le Dall, J. *Etude de l’interaction de dendrimères phosphorés avec les monocytes humains: recherche de récepteur (s)*. [en ligne] Thèse de doctorat : biologie cellulaire, Université Paul Sabatier - Toulouse III, **2015**. 166p. Format PDF. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01320806>
- (5) Wakaskar, R. R. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J. Drug Target.* **2018**, 26 (4), 311–318. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1367006>
- (6) Drouin, M. *Utilisation de nanoparticules d’or plasmoniques pour le relargage contrôlé de médicaments et la détection d’ATP en milieu cellulaire*. [en ligne] Mémoire de maîtrise, chimie, Université de Laval, Québec (CA), **2017**. 124p. Format PDF. Disponible sur : <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/27896> (consulté le 16/01/2021)
- (7) Couvreur, P. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères. In *La chimie et la santé*. [en ligne] EDP Sciences **2010**, pp 105–124. Disponible sur : <https://www.mediachimie.org/ressource/lesnanom%C3%A9dicaments-une-approche-intelligente-pour-le-traitement-des-maladies%C3%A9v%C3%A8res> (consulté le 16/01/2021)
- (8) Morales, J. O., Peters, J. I., Williams, R. O. Surfactants: their critical role in enhancing drug delivery to the lungs. *Ther. Deliv.* **2011**, 2 (5), 623–641. <https://doi.org/10.4155/tde.11.15>.
- (9) Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., Marangoni, D. G. 2 Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.* **2003**, 99, 3–48. <https://doi.org/10.1039/B208499F>.
- (10) Dauvergne, J. *Synthèse et étude physico-chimique de nouveaux tensioactifs utilisables pour la cristallisation 2D sur film lipidique et l’étude des protéines membranaires*. [en ligne] Thèse de doctorat, chimie, Avignon Université, **2010**. 318p. Format PDF. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00496704> (consulté le 16/01/2021)
- (11) Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525–1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- (12) Durand, G., Abela, M., Ebel, C., Breyton, C. New amphiphiles to handle membrane proteins: “Ménage à Trois” between Chemistry, Physical Chemistry and Biochemistry. In *Membrane proteins production for structural analysis*, Springer, 2014, p. 205–251.

Bibliographie

- (13) Lu, Y., Zhang, E., Yang, J. *et al.* Strategies to improve micelle stability for drug delivery. *Nano Res.* **2018**, *11*, 4985–4998. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2152-3>
- (14) Kondo, Y., Miyazawa, H., Sakai, H. *et al.* First anionic micelle with unusually long lifetime: self-assembly of fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (23), 6516–6517. <https://doi.org/10.1021/ja0178564>
- (15) Rangel-Yagui, C. O., Pessoa-Jr, A., Tavares, L. C. Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*(2), 147-163. [https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS8\(2\)/C.Rangel-Yagui/solubilization.htm](https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS8(2)/C.Rangel-Yagui/solubilization.htm)
- (16) Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*(1), n° 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- (17) Ge, X., Wei, M., He, S. *et al.* Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (2), 55. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055>
- (18) Aramaki, K., Yamada, J., Tsukijima, Y. *et al.* Formation of bilayer membrane and niosomes by double-tailed polyglyceryl-type nonionic surfactant. *Langmuir* **2015**, *31* (39), 10664–10671. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02454>
- (19) Morille, M. *Thérapie génique à l'aide de nanocapsules lipidiques PEGylées*. [en ligne] Thèse de doctorat, sciences pharmaceutiques, Université d'Angers, **2009**. Format PDF. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00459201> (consulté le 16/01/2021)
- (20) Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv.* **2011**, *63* (3), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- (21) Riess, J. G. Highly fluorinated systems for oxygen transport, diagnosis and drug delivery. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *84* (1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)02696-C](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)02696-C)
- (22) Krafft, M. P. et Riess, J. G. Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie* **1998**, *80*(5-6), 489–514. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)80016-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)80016-4)
- (23) Krafft, M. P. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv.* **2001**, *47* (2–3), 209–228. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00107-7).
- (24) Kovalchuk, N. M., Trybala, A., Starov, V. *et al.* Fluoro- vs hydrocarbon surfactants: Why do they differ in wetting performance? *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *210*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.003>
- (25) Chaudier, Y. *Synthèses, Études physico-chimiques et biologiques de nouveaux tensioactifs hybrides hydrofluorocarbonés*. Thèse de doctorat, chimie, Avignon Université, **2002**. 229p.

Bibliographie

- (26) Kissa, E. *Fluorinated Surfactants : synthesis, properties, applications*, Surfactant Science Series. New York : Marcel Dekker **1994**, 50, 463p.
- (27) Sadtler, V. M., Giulieri, F., Krafft, M. P. *et al.* Micellization and adsorption of fluorinated amphiphiles: questioning the 1 CF₂≈1.5 CH₂ rule. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1952–1957.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19981002\)4:10<1952::AID-CHEM1952>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19981002)4:10<1952::AID-CHEM1952>3.0.CO;2-V)
- (28) Sagisaka, M., Fujii, T., Ozaki, Y. *et al.* Interfacial properties of branch-tailed fluorinated surfactants yielding a water/supercritical CO₂ microemulsion. *Langmuir* **2004**, 20 (7), 2560–2566. <https://doi.org/10.1021/la036074g>
- (29) Eastoe, J., Paul, A., Downer, A. *et al.* Effects of fluorocarbon surfactant chain structure on stability of water-in-carbon dioxide microemulsions. Links between aqueous surface tension and microemulsion stability. *Langmuir* **2002**, 18 (8), 3014–3017.
<https://doi.org/10.1021/la015576w>
- (30) Riess, J. G. Blood substitutes and other potential biomedical applications of fluorinated colloids. *J. Fluorine Chem.* **2002**, 8. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(02\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(02)00017-9)
- (31) Abla, M., Durand, G., Pucci, B. Glucose-based surfactants with hydrogenated, fluorinated, or hemifluorinated tails: synthesis and comparative physical-chemical characterization. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (21), 8142–8153. <https://doi.org/10.1021/jo801379e>
- (32) Abla, M., Durand, G., Pucci, B. Propyl-ended hemifluorinated surfactants: synthesis and self-assembling properties. *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (7), 2084–2093.
<https://doi.org/10.1021/jo102245c>
- (33) Boussambe, G. N. M., Guillet, P., Mahler, F. *et al.* Fluorinated diglucose detergents for membrane-protein extraction. *Methods* **2018**, 147, 84–94.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.025>
- (34) Sontake, A. R. et Wagh, S. M. The phase-out of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and the global future of aqueous film forming foam (AFFF), innovations in fire fighting foam. *Chem. Eng. Sci.* **2014**, 2 (1), 11–14. <https://doi.org/10.12691/ces-2-1-3>
- (35) Riess, J. G. Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8 (3), 259–266.
[https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00047-5)
- (36) Krafft, M. P. Fluorine in medical microbubbles – Methodologies implemented for engineering and investigating fluorocarbon-based microbubbles. *J. Fluorine Chem.* **2015**, 177, 19–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2015.02.013>
- (37) Peyre, V. Segregation phenomena in micelles from mixtures of fluorinated and hydrogenated surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14 (5), 305–314.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.05.010>
- (38) Houde, M., Martin, J. W., Letcher, R. J. *et al.* Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: a review. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40 (11), 3463–3473.
<https://doi.org/10.1021/es052580b>

Bibliographie

- (39) Sagisaka, M., Ono, S., James, C. *et al.* Effect of fluorocarbon and hydrocarbon chain lengths in hybrid surfactants for supercritical CO₂. *Langmuir* **2015**, *31* (27), 7479–7487. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01737>
- (40) Kondo, Y. et Yoshino, N. Hybrid fluorocarbon/hydrocarbon surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10* (3–4), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.003>
- (41) Guo, W., Li, Z., Fung, B. M. *et al.* Hybrid surfactants containing separate hydrocarbon and fluorocarbon chains. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (16), 6738–6742. <https://doi.org/10.1021/j100195a038>
- (42) Myers, D. *Surfactant Science and Technology*, VCH Publishers, Inc. **1988**, 351p.
- (43) Miyazawa, H., Igawa, K., Kondo, Y. *et al.* Synthesis and solution properties of sulfate-type hybrid surfactants with a benzene ring. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *124* (2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2003.08.007>
- (44) Yoshino, N., Hamano, K., Omiya, Y. *et al.* Syntheses of hybrid anionic surfactants containing fluorocarbon and hydrocarbon chains. *Langmuir* **1995**, *11* (2), 466–469. <https://doi.org/10.1021/la00002a016>
- (45) Takahashi, Y., Nasu, Y., Aramaki, K. *et al.* Unusual viscoelastic behavior of aqueous solutions of fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactant and its morphological transformations. *J. Fluorine Chem.* **2013**, *145*, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2012.11.002>
- (46) Kondo, Y., Hamasaki, M., Tobita, K. *et al.* Synthesis and solution properties of hydrocarbon surfactants structurally analogous to hybrid surfactants. *J. Oleo Sci.* **1999**, *48* (7), 707–711, 726. <https://doi.org/10.5650/jos1996.48.707>
- (47) Tobita, K., Sakai, H., Kondo, Y. *et al.* Temperature-induced critical phenomenon of hybrid surfactant as revealed by viscosity measurements. *Langmuir* **1998**, *14* (17), 4753–4757. <https://doi.org/10.1021/la9801007>
- (48) Abe, M., Tobita, K., Sakai, H. *et al.* Thermoresponsive viscoelasticity of concentrated solutions with a fluorinated hybrid surfactant. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *167* (1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(99\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00482-3)
- (49) Ito, A., Kamogawa, K., Sakai, H. *et al.* Anomalous behavior of fluorocarbon-hydrocarbon hybrid surfactant in its aqueous solution. *J. Oleo Sci.* **1996**, *45* (5), 479–482. <https://doi.org/10.5650/jos1996.45.479>
- (50) Saeki, A., Sakai, H., Kamogawa, K. *et al.* Solubilization of oily compounds into fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactant admicelles formed on alumina surfaces. *Langmuir* **2000**, *16* (26), 9991–9995. <https://doi.org/10.1021/la000356o>
- (51) Peresyphkin, A., Clavel, C., Menger, F. M. Ambidextrous ‘hybrid’ fluorinated zwitterionic geminis: self-assembly in both organic and aqueous media. *Mendeleev Commun.* **2007**, *17* (2), 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2007.03.009>

Bibliographie

- (52) Diouf, A., Taffin de Givenchy, E., Dieng, S. Y. *et al.* Surface properties of new cationic semi-fluorinated hybrid surfactants. *J. Fluorine Chem.* **2014**, *161*, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2014.02.004>
- (53) Miyazawa, H., Yokokura, H., Ohkubo, Y. *et al.* Synthesis of phosphate-type fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactants and their adsorption onto calcium hydroxyapatite. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126* (3), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2004.10.016>
- (54) Ohno, A., Kushiyama, A., Kondo, Y. *et al.* Synthesis and properties of gemini-type hydrocarbon–fluorocarbon hybrid surfactants. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129* (7), 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2008.03.007>
- (55) Mohamed, A., Ardyani, T., Sagisaka, M. *et al.* Economical and efficient hybrid surfactant with low fluorine content for the stabilisation of water-in-CO₂ microemulsions. *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *98*, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.012>
- (56) Mohamed, A., Ardyani, T., Bakar, S. A. *et al.* Effect of surfactant headgroup on low-fluorine-content CO₂-philic hybrid surfactants. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *116*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.04.018>
- (57) Kang, E., Sohn, E.-H., Jung, G. Y. *et al.* Synthesis, interfacial property, and application of new hybrid anion surfactant containing fluorocarbon and hydrocarbon chains. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *67*, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.016>
- (58) Miyazawa, H., Kondo, M., Yoshino, N. Synthesis and solution properties of sulfate-type hybrid surfactants with an ethylene spacer. *J. Oleo Sci.* **2005**, *54* (3), 167–178. <https://doi.org/10.5650/jos.54.167>
- (59) Oda, R., Huc, I., Danino, D. *et al.* Aggregation properties and mixing behavior of hydrocarbon, fluorocarbon, and hybrid hydrocarbon–fluorocarbon cationic dimeric surfactants. *Langmuir* **2000**, *16* (25), 9759–9769. <https://doi.org/10.1021/la0008075>
- (60) Liu, B., Yang, M., Li, H. Synthesis of gold nanoflowers assisted by a CH–CF hybrid surfactant and their applications in SERS and catalytic reduction of 4-nitroaniline. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *520*, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.01.087>
- (61) Aydogan, N., Aldis, N., Guvenir, O. Interfacial and bulk properties of the new fluorocarbon–hydrocarbon hybrid unsymmetrical bolaform Surfactant. *Langmuir* **2003**, *19* (26), 10726–10731. <https://doi.org/10.1021/la0351921>
- (62) Saito, N., Itoyama, S., Takahashi, R. *et al.* Synthesis and surface activity of photoresponsive hybrid surfactants containing both fluorocarbon and hydrocarbon chains. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *582*, 638–646. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.08.054>
- (63) Morishima, K., Sugawara, S., Yoshimura, T. *et al.* Structure and rheology of wormlike micelles formed by fluorocarbon–hydrocarbon-type hybrid gemini surfactant in aqueous solution. *Langmuir* **2017**, *33* (24), 6084–6091. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00902>
- (64) Yang, M., Hao, J., Li, H. Syntheses and aggregation behavior of pyridine-based CH–CF hybrid surfactants. *J. Fluorine Chem.* **2014**, *165*, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2014.06.001>

Bibliographie

- (65) Inoue, T., Nakashima, N., Sugihara, G. *et al.* Micelle formation of phosphate-type hybrid surfactants in aqueous solution. *J. Oleo Sci.* **2005**, *54* (2), 95–103. <https://doi.org/10.5650/jos.54.95>
- (66) Takahashi, Y., Kondo, Y., Schmidt, J. *et al.* Self-assembly of a fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactant: dependence of morphology on surfactant concentration and time. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (42), 13319–13325. <https://doi.org/10.1021/jp1028273>
- (67) Eastoe, J., Yan, C., Mohamed, A. Microemulsions with CO₂ as a solvent. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17* (5), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.006>
- (68) Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S. *et al.* Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.* **2009**, *95* (2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>
- (69) Sagisaka, M., Iwama, S., Ono, S. *et al.* Nanostructures in water-in-CO₂ microemulsions stabilized by double-chain fluorocarbon solubilizers. *Langmuir* **2013**, *29* (25), 7618–7628. <https://doi.org/10.1021/la400376g>
- (70) Dupont, A., Eastoe, J., Murray, M. *et al.* Hybrid fluorocarbon–hydrocarbon CO₂-philic Surfactants. 1. Synthesis and properties of aqueous solutions. *Langmuir* **2004**, *20* (23), 9953–9959. <https://doi.org/10.1021/la048447z>
- (71) Harrison, K., Goveas, J., Johnston, K. P. *et al.* Water-in-carbon dioxide microemulsions with a fluorocarbon-hydrocarbon hybrid Surfactant. *Langmuir* **1994**, *10* (10), 3536–3541. <https://doi.org/10.1021/la00022a028>
- (72) Eastoe, J., Gold, S., Steytler, D. C. Surfactants for CO₂. *Langmuir* **2006**, *22* (24), 9832–9842. <https://doi.org/10.1021/la060764d>
- (73) Omoto, N., Nihei, T., Kurata, S. *et al.* Modification effect of novel phosphate type hybrid surfactant-modification effect of surfactants for hydroxyapatite plate. *Jpn. J. Conserv. Dent.* **2005**, *48*, 128–136. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10014496592>
- (74) Commission Européenne. *Règlement (UE) 2017/1000 de La Commission Du 13 Juin 2017 modifiant l'annexe XVII Du Règlement (CE) N° 1907/2006 Du Parlement Européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que Les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne l'acide pentadécafluorooctanoïque (PFOA), ses sels et les substances apparentées au PFOA (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.).* [en ligne] Journal officiel de l'Union Européenne n° L150 du 14/06/2017, 14–18. Disponible sur : <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/1000/oj/fra> (consulté le 17/01/2021)
- (75) Takahashi, Y., Koizumi, N., Kondo, Y. Active demulsification of photoresponsive emulsions using cationic–anionic surfactant mixtures. *Langmuir* **2016**, *32* (3), 683–688. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03912>
- (76) Peng, Y., Lu, F., Tong, Q.-X. One-Step synthesis, wettability and foaming properties of high-performance non-ionic hydro-fluorocarbon hybrid surfactants. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *433*, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.012>

Bibliographie

- (77) Chevallier, E., Monteux, C., Lequeux, F. *et al.* Photofoams: Remote control of foam destabilization by exposure to light using an azobenzene surfactant. *Langmuir* **2012**, *28* (5), 2308–2312. <https://doi.org/10.1021/la204200z>
- (78) Diguët, A., Guillermic, R.-M., Magome, N. *et al.* Photomanipulation of a droplet by the chromocapillary effect. *Angew. Chem. Int.* **2009**, *48* (49), 9281–9284. <https://doi.org/10.1002/anie.200904868>
- (79) Legrand, F., Breyton, C., Guillet, P. *et al.* Hybrid fluorinated and hydrogenated double-chain surfactants for handling membrane proteins. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (2), 681–688. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02137>
- (80) Xiao, Q., Rubien, J. D., Wang, Z. *et al.* Self-sorting and coassembly of fluorinated, hydrogenated, and hybrid janus dendrimers into dendrimersomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (38), 12655–12663. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b08069>
- (81) Bonnet, C., Guillet, P., Igonet, S. *et al.* Hybrid double-chain maltose-based detergents: synthesis and colloidal and biochemical evaluation. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (17), 10606–10614. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00873>
- (82) Miyazawa, H., Wakatsuki, Y., Kondo, Y. *et al.* Synthesis and solution properties of nonionic hybrid surfactants with a benzene ring. *J. Oleo Sci.* **2005**, *54* (6), 361–368. <https://doi.org/10.5650/jos.54.361>
- (83) Williams, T. D., Jay, M., Lehmler, H.-J. *et al.* Solubility enhancement of phenol and Phenol derivatives in perfluorooctyl bromide. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87* (12), 1585–1589. <https://doi.org/10.1021/js980156l>
- (84) Abła, M., Durand, G., Breyton, C. *et al.* A diglucosylated fluorinated surfactant to handle integral membrane proteins in aqueous solution. *J. Fluorine Chem.* **2012**, *134*, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.05.015>
- (85) Abła, M., Unger, S., Keller, S. *et al.* Micellar and biochemical properties of a propyl-ended fluorinated surfactant designed for membrane–protein study. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *445*, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.066>
- (86) Kalhapure, R. S., Kathiravan, M. K., Akamanchi, K. G. *et al.* Dendrimers – from organic synthesis to pharmaceutical applications: an update. *Pharm. Dev. Tech.* **2015**, *20* (1), 22–40. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.862264>
- (87) Fuchs, S.; Pla-Quintana, A.; Mazères, S. *et al.* Cationic and fluorescent “janus” dendrimers. *Org. Lett.* **2008**, *10* (21), 4751–4754. <https://doi.org/10.1021/ol801698k>
- (88) Percec, V., Imam, M. R., Peterca, M. *et al.* Self-organizable vesicular columns assembled from polymers dendronized with semifluorinated janus dendrimers act as reverse thermal actuators. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 4408–4420. <https://doi.org/10.1021/ja2118267>
- (89) Peterca, M., Imam, M. R., Ahn, C.-H. *et al.* Transfer, amplification, and inversion of helical chirality mediated by concerted interactions of C₃-supramolecular dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (7), 2311–2328. <https://doi.org/10.1021/ja110753s>

Bibliographie

- (90) Discher, B. M., Won, Y.-Y., Ege, D. S. *et al.* Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **1999**, *284* (5417), 1143–1146. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1143>
- (91) Barzen-Hanson, K. A., Roberts, S. C., Choyke, S. *et al.* Discovery of 40 classes of per- and polyfluoroalkyl substances in historical aqueous film-forming foams (AFFFs) and AFFF-impacted groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (4), 2047–2057. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05843>
- (92) Pabon, M. et Corpart, J.-M. Les tensioactifs fluorés dans les mousses extinctrices. [en ligne] *L'actualité Chimique* n°26 Juillet **1999**, 3–9. Disponible sur : <https://www.lactualitechimique.org/Les-tensioactifs-fluores-dans-les-mousses-extinctrices> (consulté le 17/01/2021)
- (93) Bordes, R. et Holmberg, K. Amino acid-based surfactants – do they deserve more attention? *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.013>
- (94) Le Devedec, F. *Développement de tensioactifs à base d'acides biliaires PEGylés pour des applications pharmaceutiques.* [en ligne] Thèse de doctorat, chimie, Université de Montréal, Québec (CA), **2013**. 240p. Format PDF. Disponible sur : <http://hdl.handle.net/1866/10130> (consulté le 17/01/2021)
- (95) Herzberger, J., Leibig, D., Langhanki, J. *et al.* “Clickable PEG” via anionic copolymerization of ethylene oxide and glycidyl propargyl ether. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (12), 1882–1887. <https://doi.org/10.1039/C7PY00173H>
- (96) Pang, J., Wu, F., Liao, C. *et al.* Terminal acetylated/acrylated poly(ethylene glycol) fabricated drug carriers: design, synthesis, and biological evaluation. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (6), 1956–1964. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00420>
- (97) Savić, S., Tamburić, S., Savić, M. M. From conventional towards new – natural surfactants in drug delivery systems design: current status and perspectives. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7* (3), 353–369. <https://doi.org/10.1517/17425240903535833>
- (98) Ma, P. et Mumper, R. J. Paclitaxel nano-delivery systems: a comprehensive review. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2013**, *4* (2):1000164. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000164>
- (99) Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R., Aroua, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2013**, *27*, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>
- (100) Goddard-Borger, E. D. et Stick, R. V. An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2011**, *13* (9), 2514. <https://doi.org/10.1021/ol2007555>
- (101) Jung, M. E. et Yi, S. W. Synthesis of threo- β -aminoalcohols from aminoaldehydes via chelation-controlled additions. Total synthesis of L-threo sphingosine and safingol. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (32), 4216–4220. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.05.153>

Bibliographie

- (102) Sydnes, L. K., Pereira, P. F. F., Sandberg, M., Øvrebø, H. H. Reduction of cyclopropanecarboxylic acids by borane, a chemoselective reduction sensitive to steric interactions and reaction conditions. *J. Chem. Res.* **2001**, 133–134. <https://doi.org/10.3184/030823401103169423>
- (103) Jeon, J., Lee, J. H., Kim, J.-W. *et al.* *syn*-Selective dihydroxylation of γ -amino- α,β -unsaturated (Z)-esters from D-serine: stereoselective synthesis of D-iminolyxitol. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, 18 (20), 2448–2453. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.10.004>
- (104) Cho, S.-D., Park, Y.-D., Kim, J.-J. *et al.* Facile reduction of carboxylic acids, esters, acid chlorides, amides and nitriles to alcohols or amines Using $\text{NaBH}_4/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. *ChemInform* **2004**, 35 (34). <https://doi.org/10.1002/chin.200434044>
- (105) Montalbetti, C. A. G. N. *et al.* Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
- (106) Ginsburg, S. *et al.* Factors affecting the competitive formation of oxazolines and dehydroalanines from serine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86 (21), 4716–4720. <https://doi.org/10.1021/ja01075a037>
- (107) Tornøe C.W. *et al.* Peptidotriazoles: Copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions on solid-phase. In: *Lebl M., Houghten R.A. Peptides: The wave of the future. American Peptide Symposia, Springer Dordrecht* **2001**, 7, 263–264. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0464-0_119
- (108) Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int.* **2001**, 40 (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- (109) Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. *et al.* A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int.* **2002**, 41 (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)
- (110) Meldal, M. *et al.* Recent fascinating aspects of the CuAAC click reaction. *Trends Chem.* **2020**, 2 (6), 569–584. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2020.03.007>
- (111) Barra, M., Roy, O., Traïkia, M. *et al.* Click glycoconjugation of per-azido- and alkynyl-functionalized β -peptides built from aspartic acid. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (13), 2941–2955. <https://doi.org/10.1039/b923275c>
- (112) Takayama, Y., Kusamori, K., Nishikawa, M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. *Molecules* **2019**, 24 (1), 172. <https://doi.org/10.3390/molecules24010172>
- (113) Jiang, X., Hao, X., Jing, L. *et al.* Recent applications of click chemistry in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2019**, 14 (8), 779–789. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1614910>
- (114) Worrell, B. T., Malik, J. A., Fokin, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science* **2013**, 340 (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>

Bibliographie

- (115) Haldón, E., Nicasio, M. C., Pérez, P. J. Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (37), 9528–9550. <https://doi.org/10.1039/C5OB01457C>
- (116) Oldham, E. D., Seelam, S., Lema, C. *et al.* Synthesis, surface properties, and biocompatibility of 1,2,3-triazole-containing alkyl β -D-xylopyranoside surfactants. *Carbohydr. Res.* **2013**, *379*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.06.020>
- (117) Oldham, E.D., Nunes, L.M., Varela-Ramirez, A. *et al.* Cytotoxic activity of triazole-containing alkyl β -D-glucopyranosides on a human T-cell leukemia cell line. *Chem. Cent. J.* **2015**, *9*, 3. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0072-1>
- (118) Ehsan, M., Das, M., Stern, V. *et al.* Steroid-based amphiphiles for membrane protein study: the importance of alkyl spacers for protein stability. *ChemBioChem* **2018**, *19* (13), 1433–1443. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800106>
- (119) Fors Instruments®. *Mesure de tension superficielle et interfaciale de liquides. [en ligne] In : Fors instruments.* Disponible sur : <http://fors-instruments.com/mesure-tension-superficielle.html> (consulté le 20/01/2021)
- (120) Bresler, M. R. et Hagen, J. P. Surfactant adsorption: a revised physical chemistry lab. *J. Chem. Educ.* **2008**, *85* (2), 269. <https://doi.org/10.1021/ed085p269>
- (121) Malvern Panalytical. *MicroCal ITC200. [en ligne] In : Malvern Panalytical.* Disponible sur : <https://www.malvernpanalytical.com/en/support/product-support/microcal-range/microcal-itc-range/microcal-itc200> (consulté le 20/01/2021)
- (122) Song, C., Zhang, S., Huang, H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>
- (123) Keller, S., Vargas, C., Zhao, H. *et al.* High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 5066–5073. <https://doi.org/10.1021/ac3007522>
- (124) Tso, S.-C., Mahler, F., Höring, J. *et al.* Fast and robust quantification of detergent micellization thermodynamics from isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (1), 1154–1161. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04281>
- (125) Höring, J. *Micellization thermodynamics of fluorinated and hydrogenated surfactants.* Mémoire de master, biophysique, Institut universitaire de technologie de Kaiserslautern (Allemagne), **2019**. 62p.
- (126) Kurniasih, I. N., Liang, H., Mohr, P. C. *et al.* Nile red dye in aqueous surfactant and micellar solution. *Langmuir* **2015**, *31* (9), 2639–2648. <https://doi.org/10.1021/la504378m>
- (127) Shi, H. X., Zhou, H. M., Shen, H. M. *et al.* Surfactivity of a series of nonionic fluorocarbon surfactant – perfluorooctyl polyethylene glycol ether. *Open J. Adv. Mater. Res.* **2015**, *1101*, 261–267. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1101.261>

Bibliographie

- (128) Guillet, P., Mahler, F., Garnier, K. *et al.* Hydrogenated diglucose detergents for membrane-protein extraction and stabilization. *Langmuir* **2019**, 35 (12), 4287–4295. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02842>
- (129) Wang, R., Song, L., Guo, Y. *et al.* Synthesis and structure–activity relationships of nonionic surfactants with short fluorocarbon chains. *J. Mol. Liq.* **2020**, 321, 114486. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114486>
- (130) Malvern. Size theory- chapter 11. [en ligne] In : *Zetasizer nano series user manual0485* **2013**, 1.1, 1–8. Format PDF. Disponible sur: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0485EN> (consulté le 20/01/2021)
- (131) Chergui, K. *Illustration du principe de la DLS*, 25 février 2020. [en ligne] In : *Wikipédia*. Disponible sur: <https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Illustration du principe de la DLS.png> (consulté le 20/01/2021) sous licence CC-BY-SA 4.0
- (132) Mainard, M. et Jacob, D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* **2016**, No. 83, 40–44. <https://doi.org/10.1051/photon/20168340>
- (133) Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Ann. Phys.* **1905**, 322 (8), 549–560. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- (134) Barnett, C. E. Some applications of wave-length turbidimetry in the infrared. *J. Phys. Chem.* **1942**, 46 (1), 69–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19053220806>
- (135) Mie, G. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, 330 (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>
- (136) Gimpl, K., Klement, J., Keller, S. Characterising protein/detergent complexes by triple-detection size-exclusion chromatography. *Biol. Proced. Online* **2016**, 18 (1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0031-9>
- (137) Zimm, B. H. Molecular theory of the scattering of light in fluids. *J. Chem. Phys.* **1945**, 13 (4), 141–145. <https://doi.org/10.1063/1.1724013>
- (138) Zimm, B. H. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering, preliminary results on polystyrene solutions. *J. Chem. Phys.* **1948**, 16 (12), 1099–1116. <https://doi.org/10.1063/1.1746740>
- (139) Simha, R. The influence of brownian movement on the viscosity of solutions. *J. Phys. Chem.* **1940**, 44 (1), 25–34. <https://doi.org/10.1021/j150397a004>
- (140) Ito, A., Sakai, H., Kondo, Y. *et al.* Micellar solution properties of fluorocarbon–hydrocarbon hybrid surfactants. *Langmuir* **1996**, 12 (24), 5768–5772. <https://doi.org/10.1021/la960240l>
- (141) Vuorte, M., Määttä, J., Sammalkorpi, M. Simulations study of single-component and mixed n-Alkyl-PEG micelles. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122 (18), 4851–4860. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00398>

Bibliographie

- (142) Kuntsche, J. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **2011**, 417(1–2),120–137. <https://doi.org/10.1016/j.iijpharm.2011.02.001>.
- (143) Meister, A. et Blume, A. (Cryo)transmission electron microscopy of phospholipid model membranes interacting with amphiphilic and polyphilic molecules. *Polymers* **2017**, 9(10), 521. <https://doi.org/10.3390/polym9100521>
- (144) Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W. *et al.* Hydrogen ion buffers for biological research*. *Biochemistry* **1966**, 5 (2), 467–477. <https://doi.org/10.1021/bi00866a011>
- (145) Chou, P.-L., Huang, Y.-P., Cheng, M.-H. *et al.* Improvement of paclitaxel-associated adverse reactions (ADRs) via the use of nano-based drug delivery systems: a systematic review and network meta-analysis. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 1731–1743. <https://doi.org/10.2147/IJN.S231407>
- (146) Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E. *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus Brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (9), 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- (147) Alqahtani, F. Y., Aleanizy, F. S., El Tahir, E., *et al.* Chapter three-Paclitaxel. In : *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. [en ligne] Harry G. Brittain **2019**, 44, 205–238. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.001>
- (148) Mangatal, L., Adeline, M.-T., Guénard, D. *et al.* Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues. *Tetrahedron* **1989**, 45 (13), 4177–4190. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81313-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81313-2)
- (149) Liebmann, J. E., Cook, J. A., Lipschultz, C. *et al.* Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *Br. J. Cancer* **1993**, 68, 1104–1109. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.488>
- (150) Calligaris, D. et Lafitte, D. Chemical Inhibitors: the challenge of finding the right target. *Chem. & Bio.* **2011**, 18 (5), 555–557. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.05.003>
- (151) Burt, H. M., Oktabab, A. M. C., Arsenaultb, A. L. *et al.* Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). *Cancer Lett.* **1995**, 88(1), 73–79. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)03614-o](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)03614-o)
- (152) Dordunoo, S. K. et Burt, H. M. Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1996**, 133 (1–2), 191–201. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04443-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04443-2)
- (153) Konno, T., Watanabe, J., Ishihara, K. Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, 65A (2), 209–214. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10481>
- (154) Hamada, H., Ishihara, K., Masuoka, N. *et al.* Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, 102(4), 369–371. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.369>
- (155) Tian, J. et Stella, V. J. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97(3), 1224–1235. <https://doi.org/10.1002/jps.21112>.

Bibliographie

- (156) Tian, J. et Stella, V. J. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions III: degradation under acidic pH conditions and overall kinetics. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (3), 1288–1298. <https://doi.org/10.1002/jps.21910>
- (157) MacEachern-Keith, G. J., Wagner Butterfield, L. J., Incorvia Mattina, M. J. Paclitaxel stability in Solution. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (1), 72–77. <https://doi.org/10.1021/ac9606822>
- (158) Liu, P., Situ, J.-Q., Li, W.-S. *et al.* High tolerated paclitaxel nano-formulation delivered by poly (lactic-co-glycolic acid)-g-dextran micelles to efficient cancer therapy. *Nanomedicine* **2015**, *11* (4), 855–866. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.002>
- (159) Saravanakumar, G., Min, K. H., Min, D. S. *et al.* Hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan as a carrier of paclitaxel: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *J. Control. Release* **2009**, *140* (3), 210–217. <https://doi.org/10/d3hzt8>
- (160) Li, L., Liang, N., Wang, D. *et al.* Amphiphilic polymeric micelles based on deoxycholic acid and folic acid modified chitosan for the delivery of paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*(10), 3132. <https://doi.org/10.3390/ijms19103132>
- (161) Mu, L., Elbayoumi, T. A., Torchilin, V. P. Mixed micelles made of poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine conjugate and d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as pharmaceutical nanocarriers for camptothecin. *Int. J. Pharm.* **2005**, *306* (1–2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.026>
- (162) Wang, C., Wang, Y., Wang, Y. *et al.* Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414* (1), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.014>
- (163) Lu, Y., Yue, Z., Xie, J. *et al.* Micelles with ultralow critical micelle concentration as carriers for drug delivery. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0234-x>
- (164) Chabaud, E., Barthélémy, P., Mora, N. *et al.* Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants. *Biochimie* **1998**, *80* (5–6), 515–530. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)80017-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)80017-6)
- (165) Zhang, X., Jackson, J. K., Burt, H. M. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int. J. Pharm.* **1996**, *132* (1–2), 195–206. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04386-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04386-1)
- (166) Wang, Y., Wang, C., Gong, C. *et al.* Polysorbate 80 coated poly (ϵ -caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly (ϵ -caprolactone) micelles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *434* (1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.015>
- (167) Yoncheva, K., Calleja, P., Agüeros, M. *et al.* Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436* (1–2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.030>
- (168) Šmejkalová, D., Nešporová, K., Hermannová, M. *et al.* Paclitaxel isomerisation in polymeric micelles based on hydrophobized hyaluronic acid. *Int. J. Pharm.* **2014**, *466* (1–2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.024>

Bibliographie

- (169) Li, S., Fu, Y., Zu, Y. *et al.* Determination of paclitaxel and other six taxoids in *Taxus* species by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49* (1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.006>
- (170) Wei, Z., Hao, J., Yuan, S. *et al.* Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Int. J. Pharm.* **2009**, *376* (1–2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.030>
- (171) Danhier, F., Magotteaux, N., Ucakar, B. *et al.* Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for paclitaxel. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *73* (2), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.06.015>
- (172) Zhang, L., Liu, Z., Kong, C. *et al.* Improving drug delivery of micellar paclitaxel against non-small cell lung cancer by coloadng itraconazole as a micelle stabilizer and a tumor vascular manipulator. *Small* **2018**, *14* (51), 1802112. <https://doi.org/10.1002/smll.201802112>
- (173) Wang, Z.-Y., Zhang, H., Yang, Y. *et al.* Preparation, characterization, and efficacy of thermosensitive liposomes containing paclitaxel. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (4), 1222–1231. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1122674>
- (174) He, Z., Wan, X., Schulz, A. *et al.* A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity. *Biomaterials* **2016**, *101*, 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.002>
- (175) Furman, C., Carpentier, R., Barczyk, A. *et al.* Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the quantification of paclitaxel in different PLGA nanocarriers. *Electrophoresis* **2017**, *38* (19), 2536–2541. <https://doi.org/10.1002/elps.201600552>
- (176) Merck. Protocol Guide : MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. [en ligne] In : Merck. Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html> (consulté le 04/01/2021)
- (177) Baati, T., Al-Kattan, A., Esteve, MA. *et al.* Ultrapure laser-synthesized Si-based nanomaterials for biomedical applications: in vivo assessment of safety and biodistribution. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 25400. <https://doi.org/10.1038/srep25400>
- (178) Correard, F., Roy, M., Terrasson, V. *et al.* Delaying anticancer drug delivery by self-assembly and branching effects of minimalist dendron–drug conjugates. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (41), 9586–9591. <https://doi.org/10.1002/chem.201801092>
- (179) Mereyala, H. B. et Gurralla, S. R. A highly diastereoselective, practical synthesis of allyl, propargyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosides and allyl, propargyl heptaacetyl- β -D-lactosides. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307* (3), 351–354.

