



HAL
open science

Etude Structure/Activité de nouveaux vecteurs membranaires à base de Cyclodextrines Amphiphiles

Florian Nolay

► **To cite this version:**

Florian Nolay. Etude Structure/Activité de nouveaux vecteurs membranaires à base de Cyclodextrines Amphiphiles. Autre. Université de Picardie Jules Verne, 2015. Français. NNT : 2015AMIE0015 . tel-03653348

HAL Id: tel-03653348

<https://theses.hal.science/tel-03653348>

Submitted on 27 Apr 2022

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

Spécialité : Chimie Organique

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 547)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Florian Nolay

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Etude Structure/Activité de nouveaux vecteurs
membranaires à base de Cyclodextrines Amphiphiles*

Soutenue le 21 Septembre 2015, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Éric Monflier, Professeur	Rapporteur
M ^{me} Ewa Rogalska, Professeur	Rapporteur
M ^{me} Véronique BONNET, Maître de conférences	Directrice
M ^{me} Sandrine Morandat, Maître de conférences	Directrice
M ^{me} Florence Djedaïni-Pilard, Professeur	Directrice
M ^{me} Catherine Sarazin, Professeur	Examineur



Remerciements

Je tiens à remercier le Conseil Régional de Picardie pour le financement apporté à ce projet ainsi que l'intérêt qu'ils y ont porté. Cette thèse a été effectuée au sein du laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources(LG2A) FRE 3517 CNRS à l'Université de Picardie Jules Vernes, dirigé par José Kovensky. Je tiens donc à le remercier pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces trois années de dur labeur.

Je remercie les membres du jury, le Professeur Eric Monflier de l'Université d'Artois à Lens et le Professeur Ewa Rogalska de l'Université de Lorraine, en tant que rapporteur de ces modestes travaux qui ont pris trois ans de ma vie. Je tiens aussi à remercier le Professeur Catherine Sarazin pour avoir accepté de présider ce jury.

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction de personnes exceptionnelles et de qualité que sont le Professeur Florence Djedaïni-Pilard, les Maître de conférences (HDR) Véronique Bonnet et Sandrine Morandat qui ont dépensé énormément de temps afin d'encadrer ce projet et afin de me transmettre leurs connaissances, ce qui m'a été très bénéfique et je tiens donc à les remercier tout particulièrement. Elles ont su m'adresser leurs conseils judicieux, leur aide et leur soutien à tout moment, je les remercie encore pour cela.

Cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est sans cette étroite collaboration entre des équipes de chimistes, physicochimistes et biologistes qui ont mené un travail d'orfèvre. Pour cela je tiens à remercier le Professeur Laurence Tilloy-Fenart et le Docteur Fabien Gosselet pour les études *in vitro* menées sur leur modèle de Barrière Hémato-Encéphalique.

Un remerciement plus spécifique pour Emmanuel Sévin, ingénieur d'études, pour tout le travail qu'il a soulevé avec ses petits bras de judoka !!! Il a apporté un travail époustouflant au point où je pensais même que c'était sa thèse qu'il préparait tant il était impliqué, sérieux, motivé et rigoureux. A côté de ses grandes qualités professionnelles, c'est un grand plaisantin avec de grandes qualités humoristiques, euh non non lol, avec de grandes qualités humaines qui m'a permis de me sentir autant à l'aise dans leur laboratoire de biologie que dans mon laboratoire de chimie et ceci malgré l'étrangeté de leur labo qui est d'un calme un peu trop calme comparé à nos labos avec des hôtes aspirantes silencieuses comme un Boeing 747.

Remerciements

Mais bon, il faudrait peut être juste lui dire d'aller un peu moins à « Action » (pour ceux qui connaissent) et de laisser les gens faire aussi des bonnes affaires lol.

Les études physicochimiques ont nécessité une bonne formation par des formateurs hors pair dont le tout nouveau Docteur Thierry-Johan Robin que j'ai connu comme thésard m'a accordé une bonne formation sur de tous nouveaux appareils que je n'avais jamais vu de ma vie. Ceci a été très enrichissant pour moi tant du point de vue scientifique qu'humain. On aura passé de bons moments, notamment sur mario kart où il a voulu me montrer ses « talents » mais bon comme beaucoup, Thierry, n'est pas du tout mauvais joueur mis à part lorsqu'il perd lol. J'attends la prochaine partie !! car maintenant il se défile lol.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse comme le Docteur David Lesur pour la Spectrométrie de masse et la LCMS, le Docteur Dominique Cailleu qui nous permet d'utiliser une RMN toujours au top. Je remercie également Carole Darguesse pour sa disponibilité et son professionnalisme.

Je remercie l'ensemble des professeurs, maître de conférences et chargés de recherche du LG2A et de l'UTC de Compiègne pour leur accueil et leur sympathie.

Je tiens à remercier tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires qui m'ont permis de passer un bon moment au sein des deux laboratoires (à Amiens et Compiègne).

Je remercie particulièrement Abed « du bled » pour son aide et ses bons conseils tant scientifiques que bons plans ainsi que pour sa bonne humeur et pour avoir patienté face à mes taquineries à répétition qui moi me faisait bien rire et lui aussi lorsqu'il avait vu clair dans mon jeu car sinon il s'énervait quand même pas mal. Merci pour ton soutien et tes encouragements.

Je remercie aussi Karim Fahsi pour ses conseils avisés et réfléchies concernant la bonne conduite d'une thèse. Mais si seulement, j'avais suivi tes conseils, j'aurais évité pas mal de galère. Je remercie également Alaa eddine et Mehdi pour leur soutien, leur sympathie et de m'avoir rappelé les galères de 1^{ère} année de thèse qui m'a permis de réaliser le chemin

Remerciements

parcouru jusqu'ici. Je remercie Alaa qui veillait à ma condition physique en essayant de me motiver à aller jouer au foot le week end, ce que j'ai fait (une fois en trois ans !!), merci beaucoup mais...en fait je n'ai pas d'excuse lol. Je remercie Cédric pour nos discussions scientifiques ou non empreintes de bons conseils. Je remercie également Mathieu pour le très très gros travail qu'il a fourni durant son stage de M2, en fait c'est simple, je n'ai jamais vu un M2 ayant autant de recul, d'expérience et d'initiatives. On aura aussi bien rigoler et aussi peur, hein Mathieu !! ton coup de la fumée orange !!garde le pour toi la prochaine fois mdrrr !!! Je remercie Yong pour tout ce qu'il a pu apporter comme innovations scientifiques et aussi pour m'avoir permis de bien plaisanter. Yong est encore plus facile à taquiner qu'Abed, qu'est-ce que j'ai pu l'embêter, mais apparemment il ne m'en veut pas car on est encore en contact.

Un remerciement chaleureux et de tout mon cœur à ma famille qui m'ont toujours poussé à aller toujours plus loin avec un soutien indescriptible ainsi que ma toute nouvelle petite famille, avec plus particulièrement ma femme qui m'a soutenue et supportée (quel courage lol). Comme je te disais « nous sommes venues à deux à Amiens et nous en repartirons à quatre, comme le temps passe vite ». J'espère être toujours à la hauteur de leurs attentes.

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. LES CYCLODEXTRINES	4
A. <i>De la cellulose aux cyclodextrines</i>	4
B. <i>Structures et propriétés</i>	5
C. <i>Obtention de dérivés amphiphiles</i>	7
1) Les composés amphiphiles.....	7
2) Méthodes d'obtention des différents types de cyclodextrines amphiphiles	7
II. ETUDES PHYSICOCHIMIQUES.....	10
A. <i>Les modèles membranaires biomimétiques</i>	10
1) Les monocouches de Langmuir	10
a) La balance de Wilhelmy	11
b) Principe de formation des monocouches lipidiques	12
c) Les isothermes de compression.....	14
d) Propriétés thermodynamiques de mélanges binaires à l'interface air-eau	16
i Miscibilité du mélange	16
ii Idéalité du mélange	17
iii Variations d'énergie libre du mélange	18
e) Etude du caractère membranotrope de composés d'intérêt	18
2) Méthodes de caractérisation couplées aux monocouches de Langmuir	20
a) Les techniques microscopiques	21
i La microscopie à l'angle de Brewster (BAM)	21
ii La microscopie de fluorescence	26
b) Les techniques spectroscopiques	28
i La spectroscopie UV-Visible.....	28
ii Les spectroscopies infra-rouge	30
iii Diffraction des rayons X à l'angle rasant (GIXD)	32
iv Réflectivité des neutrons et des rayons X	33
3) Les liposomes.....	35
a) Méthodes de préparation.....	36
b) Utilisation des liposomes comme modèles membranaires	38
i Mesure de la fusion membranaire	39
ii Etude de l'ordre lipidique	44
4) Les bicouches lipidiques supportées.....	47
a) Méthode de transfert Langmuir-Blodgett	48
b) Méthode de la fusion de vésicules	49
c) Méthode combinée du transfert de Langmuir-Blodgett et de la fusion de vésicules.....	50
5) La Microscopie à Force Atomique.....	52
a) Principe	52
b) Les modes de fonctionnement	53
B. <i>Formation et caractérisation de nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles</i>	54

1)	Formation des nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles.....	55
2)	Caractérisation des nanoparticules.....	57
a)	Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)	58
b)	Le potentiel Zéta	58
c)	La microscopie électronique.....	60
C.	<i>Influence de la structure des cyclodextrines amphiphiles sur leurs propriétés physicochimiques</i>	61
1)	Influence de la structure sur la concentration d'agrégation critique (CAC)	61
2)	Influence de la structure sur le comportement interfacial	64
3)	Influence de la structure sur la taille et la morphologie des autoassemblages	67
4)	Influence de la structure sur l'encapsulation de principes actifs	71
5)	Influence de la structure sur la complexation et les propriétés de délivrance	73
III.	ETUDES SUR MODELE DE BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	77
A.	<i>Modèles in vitro</i>	78
1)	Les microvaisseaux cérébraux isolés.....	78
2)	Les modèles cellulaires	78
a)	Les cultures endothéliales	79
b)	Les cultures sur filtre	79
3)	Les modèles non cellulaires	80
B.	<i>Modèles in vivo</i>	81
1)	Les méthodes d'études invasives.....	81
2)	Les méthodes d'études non invasives.....	84
	RESULTATS ET DISCUSSIONS	86
I.	VOIE DE SYNTHESE ET PRODUITS OBTENUS	86
A.	<i>Synthèse des phosphoramidyl-β CDs</i>	86
B.	<i>Synthèse des phosphoramidyl-γ CDs</i>	95
C.	<i>Synthèse des phosphoramidyls glucoses</i>	97
II.	ETUDES PHYSICOCHIMIQUES DES COMPOSES SYNTHETISES.....	99
A.	<i>Etude du caractère tensioactif</i>	99
1)	Détermination de la Concentration d'Agrégation Critique (CAC)	99
2)	Isothermes de compression des phosphoramidyls-β CDs.....	101
3)	Isothermes de compression des phosphoramidyls-β CDs en mélange avec la POPC	106
B.	<i>Etude du caractère membranotrope</i>	110
1)	Détermination de la concentration de travail.....	110
2)	Etude de l'interaction de nos composés sur un modèle simplifié.....	112
3)	Importance de la tête polaire CD et des chaînes aliphatiques.....	114
4)	Du modèle simplifié au modèle biomimétique	116
5)	Interaction des vésicules mixtes avec la monocouche.....	120
C.	<i>Etude du caractère fusogène</i>	122
1)	Sur modèle simplifié	122
2)	Sur modèle biomimétique	125

3)	Compréhension du mécanisme de fusion.....	130
a)	Etude de l'ordre lipidique.....	130
b)	Par ajout croissant de cholestérol.....	131
D.	<i>Etude du relargage de l'Atazanavir.....</i>	133
E.	<i>Etudes en AFM sur bicouches supportées.....</i>	134
1)	Etude de l'insertion des β -C12 et C14 dans des SLBs.....	134
2)	Etude de l'interaction des β -C12 et C14 avec une SLB de PC/SM/Chol.....	139
F.	<i>Imagerie des agrégats et des nanoparticules de β-C12 et C14 par TEM.....</i>	140
1)	Images et analyses élémentaires des agrégats de β -C12 et C14.....	140
2)	Images et analyses élémentaires des nanoparticules de β -C12 et C14.....	142
III.	ETUDES D'INTEGRITE ET DE TRANSPORT SUR MODELE DE BHE <i>IN VITRO</i>	145
A.	<i>Présentation du modèle in vitro.....</i>	145
B.	<i>Etudes d'intégrité sur le modèle de BHE in vitro.....</i>	146
C.	<i>Estimation de la perméabilité de la BHE.....</i>	149
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	152
	EXPERIMENTAL PART.....	156
I.	MATERIALS AND METHODS.....	156
A.	<i>Chemical products and solvents.....</i>	156
B.	<i>Chromatography.....</i>	156
1)	Thin Layer Chromatography (TLC).....	156
2)	Adsorption chromatography.....	156
a)	Manual method.....	156
b)	Automatic method.....	156
3)	Ion exchange chromatography.....	157
4)	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS).....	157
C.	<i>Compounds characterization.....</i>	157
1)	Mass Spectrometry.....	157
a)	Sample preparation.....	157
b)	Equipment.....	158
2)	Nuclear Magnetic Resonance (NMR).....	158
D.	<i>Buffer solutions.....</i>	159
1)	TRIS buffer pH 7.4.....	159
2)	Phosphate buffer pH 7.4.....	159
3)	Ringer-Hepes buffer pH 7.4.....	159
E.	<i>Nanoparticles preparation and characterization.....</i>	160
1)	Preparation.....	160
2)	Characterization.....	160
a)	Dynamic Light Scattering (DLS).....	160
b)	Transmission Electron Microscopy (TEM).....	161

F.	<i>Surface tension measurement</i>	161
1)	CAC determination (Critical Aggregation Concentration)	161
2)	Determination of the effective concentration for the Maximum Insertion Pressure (MIP) study.....	161
3)	The MIP determination	161
G.	<i>Isotherms of compression coupled with the BAM</i>	162
1)	Brewster Angle Microscopy (BAM)	162
2)	Amphiphilic CDs alone	162
3)	Amphiphilic CDs with POPC at different molar ratio.....	162
H.	<i>Fusogenicity study</i>	162
1)	CD/POPC vesicle preparation.....	162
2)	Probe fluorescent (R18) vesicle preparation.....	163
3)	Fluorescence measurements	163
I.	<i>Lipidic order study</i>	163
1)	Vesicles preparation with the Laurdan and Prodan	163
2)	Fluorescence measurements	164
J.	<i>Characterization of the insertion of amphiphilic CDs in a bilayer by AFM</i>	164
1)	Vesicle preparation	164
2)	AFM Measurements.....	165
K.	<i>Calibration curve of Atazanavir fluorescence intensity in Ringer-Hepes</i>	165
L.	<i>In vitro drug release</i>	167
M.	<i>Blood brain barrier in vitro model experiments</i>	167
1)	General procedure	167
2)	Determination of the toxicity of the compound on the BBB <i>in vitro</i> model	167
3)	Estimation of the Blood-brain barrier permeability.....	168
4)	Uptake of ³ H-Atazanavir.....	168
II.	COMPOUNDS DESCRIPTION	169
	REFERENCES	209

AFM : Atomic Force Microscopy
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CAC : Concentration d'Agrégation Critique
CCM : Chromatographie sur couche mince
CD : Cyclodextrine
CMC : Concentration Micellaire Critique
COSY : COrrélation SpectroscopY
DIC : *N,N*-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA : Diisopropyléthylamine
DLS : Dynamic Light Scattering
DMF : *N,N*-Diméthylformamide
DMPC : Dimyristoyl-phosphatidylcholine
DPPC :
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EIA : Enzyme Immunoassay
eq: équivalent
ESI : Electrospray Ionisation
Et₃N : Triéthylamine
EtOH : Ethanol
Fmoc : Fluorénylméthoxy-carbonyle
FT-IR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy
HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HRMS : High Resolution Mass Spectrometry
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
LCMS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LUV : Large Unilamellar Vesicle
m : multiplet
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MDR : Multi-Drug Resistance
Me : Méthyl
MeOH : Méthanol
MLV : Multilamellar Large Vesicle
MS : Mass Spectrometry
NMR : Nuclear Magnetic Resonance
Pe : Perméabilité
P-gp : P-glycoprotéine
PI : Indice de polydispersité
PPh₃ : Triphénylphosphine
ppm: partie par million/parts per million
QELS : Quasi-Elastic Light Scattering
Q-TOF : Quadrupole/Time of Flight
R_f : Rapport frontal
rg: Rayon de giration
rh: Rayon hydrodynamique
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
s : singulet
STEM :
SUV : Small Unilamellar Vesicle

Abréviations

t: triplet

TA : Température ambiante

TEM : Transmission Electron Microscopy

TLC : Thin Layer Chromatography

Ts : Tosyle

V : Volume

ΔG_{ex} : variation d'énergie libre du mélange

Liste des Figures

Figure 1 : Figure schématisant le rejet et le passage de principes actifs vis-à-vis de la BHE	1
Figure 2: Extrait de l'Académie des Sciences écrit par M.A. Villiers concernant les propriétés des cristaux indésirables	4
Figure 3 : Représentation de l'organisation d'une molécule amphiphile en solution aqueuse et à l'interface air-eau	7
Figure 4 : Représentation des différents types de cyclodextrines amphiphiles	8
Figure 5 : Formation d'une monocouche à l'interface air-eau	14
Figure 6 : Isotherme de compression du phospholipide DPPC à 21°C	15
Figure 7 : Exemple d'insertion d'une molécule d'intérêt dans une monocouche de POPC à 21°C	19
Figure 8 : Représentation du BAM en fonctionnement (d'après ⁶⁰).....	22
Figure 9 : Premières images de BAM d'une monocouche du phospholipide DMPE ⁵⁸	23
Figure 10 : Isotherme de compression de DMPA pur (trait plein), du mélange DMPA : MB en ratio molaire 5 : 1 (tiret et point) et 1 : 1 (tiret) ⁶³	24
Figure 11 : Images de BAM de la monocouche mixte DMPA : bleue de méthylène (1 : 1 en mol) ⁶³	25
Figure 12 : Images en BAM de la monocouche de TBdSC à l'interface air-eau à 20°C ⁶⁴	26
Figure 13 : Isotherme de NCer à 22°C. Les isothermes stoppées, à 20 et 35 mN/m, sont celles réalisées pour dépôt sur mica ⁷⁰	27
Figure 14 : Images de microscopie de fluorescence de NCer à 22°C ⁷⁰	27
Figure 15 : Spectre de réflexion UV de la monocouche du mélange NC-TPP/octadénoate de méthyle sur phase aqueuse de NaX et eau	29
Figure 16 : Spectre FTIR du complexe [Ru(bipy)2CIL]PF6 (bipy = 2,2'-bipyridine)(R1) ⁷²	31
Figure 17 : Pics de Bragg observés à l'interface air-eau de la monocouche de LSFD à $\pi = 6,3$ mN/m ⁷⁶	33
Figure 18 : Changement de conformation de la CD à l'interface.....	35
Figure 19 : Phases polymorphiques et formes moléculaires dynamiques correspondantes aux différents composants lipidiques ⁸¹	37
Figure 20 : Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille (d'après ⁸⁰).....	37
Figure 21 : Principe du transfert d'énergie par résonance appliqué au couple NBD/Rh ⁹⁰	41
Figure 22 : Représentation de l'insertion du Laurdan (■) et du Prodan (■) au sein d'une bicouche lipidique de DPPC.....	46
Figure 23 : Représentation de la technique de transfert de monocouche Langmuir-Blodgett.....	48
Figure 24 : Mécanismes de la rupture des vésicules pour la formation de SLBs ¹⁰⁷	49
Figure 25 : Formation de SLB par combinaison le procédé de Langmuir-Blodgett et de la fusion de vésicules..	50
Figure 26 : Le dispositif expérimental microscopie à force atomique (AFM) utilisé pour examiner des bicouches lipidiques supportées ¹¹⁸	52
Figure 27 : Courbe typique force-distance qui peut être mesuré sur SLBs ¹¹⁷	53
Figure 28 : Etude de la stabilité des nanoparticules de β -CD C6 à 40°C formées avec utilisation de l'agitation magnétique à 600 rpm). L'axe de droite représente le diamètre des nanoparticules (\square) et l'axe de gauche l'indice de polydispersité (\diamond).....	56
Figure 29 : Principe de mesure d'un échantillon par DLS ¹²⁶	58
Figure 30 : Représentation de la bicouche électrique autour d'une nanoparticule ¹³¹	59

Liste des Figures

Figure 31 : Représentation de l'électrophorèse laser Doppler ¹³¹	59
Figure 32 : Image de TEM des nanosphères de γ -CD C6 non chargées (à gauche) et chargées en progestérone (à droite).....	60
Figure 33 : Image de TEM des nanosphères de β -CD C10 non chargées (a) et chargées en artémisinine (b)	61
Figure 34 : Détermination de la CAC ou CMC du composé testé	62
Figure 35 : Isothermes de compression des TASC, TBSC et TBdSC ainsi que leur module de compressibilité à 20°C ⁷⁹	64
Figure 36 : Tracé de la pression interfaciale huile-eau en fonction de la densité moléculaire des CDs amphiphile déposées (1) β -CD-C6, (2) 6-O-CAPRO- β -CD, (3) 6-N-CAPRO- β -CD, (4) 6-N-MYRISTO- β -CD, (5) BRANCHED- β -CD	66
Figure 37 : Images de cryo-TEM des nanoparticules de β -CD C6 (a, b), C8 (c, d), C10 (e, f) et C14 (g, h).....	69
Figure 38 : Images de TEM des α - (a), β -(b) et γ -CD C10 (c) ¹³⁴	70
Figure 39 : Taille (axe de gauche ; sous forme de barre) et Potentiel Zeta (axe de droite ; sous forme de carrés noirs et de lignes) des paCDs à N/P = 5 (barres grises) et N/P = 10 (barres noires) ¹³⁷	75
Figure 40 : Image de TEM du complexe de 3 α à N/P = 10 (à gauche) et une représentation schématique de l'arrangement proposé alternatif de la pADN dans les bicouches de paCD ¹³⁷	75
Figure 41 : Efficacité de la transfection de gène (axe gauche ; barres) et la viabilité cellulaire (axe droit ; carrés et lignes) des complexes préparés à partir des paCDs à N/P = 5 (barres grises) et N/P = 10 (barres noires).....	76
Figure 42 : Structure in vivo des capillaires cérébraux ¹³⁸	77
Figure 43 : Les deux principales méthodes d'isolement de cellules endothéliales à partir de micro- vaisseaux (à gauche) et de capillaires cérébraux (à droite).....	79
Figure 44 : Modèle in vitro basé sur la soloculture (à gauche) et basé sur la coculture entre cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et cellules gliales de rats. D'après ¹³⁸	80
Figure 45 : Les principales méthodes d'études invasives de la BHE in vivo ¹³⁸	82
Figure 46 : Spectre RMN ¹ H du composé 5) après purification sur résine échangeuse d'ion.....	87
Figure 47 : Spectre RMN ¹ H de (6) dans le CHCl ₃	88
Figure 48 : Spectre RMN ³¹ P de (6).....	89
Figure 49 : Spectre RMN ¹ H de la phosphoramidyl β -C18:1 dans le CHCl ₃	92
Figure 50 : Spectre RMN ¹ H de la phosphoramidyl β -C12 dans le CHCl ₃	93
Figure 51 : Spectre HRMS de la phosphoramidyl β -C12.....	94
Figure 52 : Spectre LCMS de la phosphoramidyl β -C12	95
Figure 53 : Spectre RMN ¹ H de la γ -C12 dans CHCl ₃	97
Figure 54 : Spectre RMN ¹ H du Glc-C14 dans le CHCl ₃	99
Figure 55 :Détermination de la CAC de la phosphoramidyl β -C12 à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	100
Figure 56 : Isotherme de compression des phosphoramidyls β -CDs à 21°C sur l'eau pure.....	102
Figure 57 : Hypothèse pour l'organisation des molécules au sein de la monocouche durant la compression	103
Figure 58 : Tracé du module d'élasticité de la β -C12	104
Figure 59 : Images BAM des β -C12, C14, C16 et C18 :1 à différentes pression de surface sur une sous phase d'eau pure thermostatée à 21°C	105

Liste des Figures

Figure 60 : Isothermes de compression du mélange phosphoramidyl β -C12 avec la POPC.....	106
Figure 61 : Représentation de l'aire moléculaire en fonction du % molaire de β -C12/POPC	107
Figure 62 : ΔG_{ex} des β -C12 en mélange avec la POPC sur une sous phase d'eau pure à 21°C	108
Figure 63 : Représentation du K_s en fonction du % en β -C12/POPC	109
Figure 64 : Images BAM des β -C12, C14, C16 et C18 :1/POPC (3:7 en mol) à différentes pression de surface sur une sous phase d'eau pure thermostatée à 21°C.....	109
Figure 65 : Système utilisé pour déterminer la concentration optimale ainsi que pour les tests d'interaction	111
Figure 66 : Détermination de la concentration optimale de travail réalisé à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	111
Figure 67 : Résultats de l'injection de la phosphoramidyl β -C12 en sous phase d'une monocouche de POPC réalisé à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4	112
Figure 68 : Détermination de la PIM et du $\Delta\pi_{30}$ des phosphoramidyls β -CDs réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	113
Figure 69 : Comparaison des PIMs des phosphoramidyls β -CDs avec leurs homologues phospholipidiques respectifs	115
Figure 70 : Comparaison de la PIM de la phosphoramidyl β -C12 et (4) réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	115
Figure 71 : Structures des molécules composant le modèle biomimétique.....	117
Figure 72 : Détermination de la PIM des phosphoramidyls β -CDs sous la monocouche biomimétique de composition 4:3:1 réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	119
Figure 73 : Injections des vésicules mixtes à 30% C12, C14, C16 et C18 :1/POPC en mol et vésicule POPC sous la monocouche biomimétique 4 :3 :1 à $\pi_0=20\text{mN/m}$ dans tampon phosphate 10 mM et NaCl 150 mM à pH 7,4	120
Figure 74 : Résultats de l'interaction de l'ATV avec une monocouche de POPC (A) et détermination de sa PIM (B)	121
Figure 75 : Résultats de remontées des vésicules mixtes 40% β -C12 et β -C14/POPC chargées ou non en ATV	121
Figure 76 : Résultats de fusogénicité des phosphoramidyls β -CDs sur R18/POPC réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). β -C12 (A), β -C14 (B), β -C16 (C) et β -C18:1 (D)	125
Figure 77 : Résultats de fusogénicité des phosphoramidyls β -CDs sur R18/4:3:1 réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). β -C12 (A), β -C14 (B), β -C16 (C) et β -C18:1 (D).....	126
Figure 78 : Résultats de fusogénicité de la β -C12 (A) et de la β -C14 (B) sur R18/4:3:1 réalisé dans le tampon RH à pH 7,4.....	127
Figure 79 : Résultats de fusogénicité des composés β -C12 et C14 en ajout externe réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).....	128
Figure 80 : Résultats du test de fuite de la sonde R18 sous l'action des β -C12 et C14.....	129
Figure 81 : Résultats de fusogénicité des vésicules mixtes à 40% de β -C12/POPC et β -C14/POPC avec ajout constant de cholestérol. (A) et (C) mesure de fluorescence de β -C12/POPC et β -C14/POPC, respectivement. (B) et (D) tracé du % de fluorescence par rapport au % de cholestérol, pris à 30 min après ajout, de β -C12/POPC et β -C14/POPC, respectivement.	132

Liste des Figures

Figure 82 : Relargage in vitro de l'ATV encapsulé dans des vésicules de POPC (violet), de β -C12 (rouge) et β -C14/POPC (bleu) (4:6 en mol).....	133
Figure 83 : Image AFM de la SLB de DPPC pur en mode statique (10 μ m*10 μ m, Z = 5 nm).....	134
Figure 84 : Image AFM de la SLB de β -C12/DPPC (1:9 en mol) (2 μ m*2 μ m, Z = 5 nm)	135
Figure 85 : Images AFM de la SLB de POPC/DPPC (1:1 en mol) (10 μ m*10 μ m, Z = 5 nm).....	136
Figure 86 : Images AFM de la SLB de β -C12/POPC/DPPC (à gauche) (0,05:1:1 en mol) (2.5 μ m*2.5 μ m, Z = 5 nm). Section de hauteurs (à droite)	136
Figure 87 : Images AFM de la SLB de β -C14/POPC/DPPC (0,05:1:1 en mol) (2.5 μ m*2.5 μ m, Z = 5 nm).....	137
Figure 88 : Représentation de l'insertion de la β DLC dans la bicouche de DMPC ¹⁶⁹	138
Figure 89 : Images AFM de la SLB de PC/SM/Chol en mode dynamique avec ajout de SUVs de POPC (a, 20 μ m*20 μ m, Z=10 nm), de β -C12/POPC (b, 50 μ m*50 μ m, Z=10 nm) et de β -C14/POPC (c, 20 μ m*20 μ m, Z=10 nm).....	139
Figure 90 : Images TEM des agrégats de β -C12.....	141
Figure 91 : Images STEM des agrégats de β -C14.....	141
Figure 92 : Analyse élémentaire sur un agrégat de β -C12 (à gauche) et de β -C14	142
Figure 93 : Images STEM des nanoparticules de β -C12 (en haut) et TEM des nanoparticules de β -C14 (en bas)	143
Figure 94 : Analyse élémentaire d'une nanoparticule de β -C12	144
Figure 95 : Modèle de BHE in vitro élaboré par le LBHE basé sur la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et de cellules gliales de rat ¹³⁸	145
Figure 96 : Protocole mis en place pour l'étude de l'intégrité des cellules endothéliales vis-à-vis de composés d'intérêt.....	146
Figure 97 : Résultats des tests d'intégrité des phosphoramidyls β -CDs.....	147
Figure 98 : Résultats des tests d'intégrité des vésicules mixtes β -C12/POPC et β -C14/POPC à 40% molaire ..	147
Figure 99 : Résultats des tests d'intégrité de l'ATV [A] et de la vésicule de POPC [B]	148
Figure 100 : Perméabilité (Pe) de l'ATV libre (vert), dans β -C12/POPC (bleu), β -C14/POPC (rouge) et POPC (blanc). Viabilité des cellules contrôlée par le ¹⁴ C saccharose.....	149
Figure 101 : Internalisation de l'ATV- ³ H dans les cellules endothéliales.....	150
Figure 102 : Normalisation de l'internalisation de l'ATV- ³ H dans les cellules endothéliales.....	151
Figure 103 : Optimisation of the Signal/Noise ratio for the detection of the ATV in RH with $\lambda_{ex} = 290$ nm. (A) Table with the values of S/B ratio. (B) Curves of ATV detection (red) and RH buffer detection (blue).....	166
Figure 104 : Determination of the limit detection (A) and plotted of the calibration curve (B).....	166

Liste des Schémas

Schéma 1 : La phosphoramidyl- β -cyclodextrine synthétisée lors du projet Nanovecteurs ¹⁰	2
Schéma 2 : Structure des cyclodextrines	5
Schéma 3 : Complexe d'inclusion entre la cyclodextrine et une molécule invitée ¹³	6
Schéma 4 : Structure des β -cyclodextrine obtenue par Kawabata ²⁹	8
Schéma 5 : Voie de synthèse élaborée par Zhang pour la synthèse de β -cyclodextrines amphiphiles de type « Jupe » ³⁰	9
Schéma 6 : Représentation de la balance de Wilhelmy	11
Schéma 7 : Structure de la TBdSC ⁶⁴	25
Schéma 8 : Structure de la NC-TPP	29
Schéma 9 : Voie de fusion de bicouches de phospholipides ⁸⁷	40
Schéma 10 : Voie de fusion : [A] voie direct, [B] par hémifusion ⁸⁸	40
Schéma 11 : Structure de le NBD-PE (en haut) et de la Rh-PE (en bas)	41
Schéma 12 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes fluorescentes dans deux liposomes différents	42
Schéma 13 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes fluorescentes insérées dans le même liposome	43
Schéma 14 : Structure de l'octadécylrhodamine (R18)	43
Schéma 15 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode d'inhibition de fluorescence	44
Schéma 16 : Structure du Laurdan et du Prodan	44
Schéma 17 : Moment dipolaire du Laurdan (a, flèche grise) créé par la séparation de charge partielle entre le 2-diméthylamino et le 6-carbonyle. (b) Diagramme montrant le changement de moment dipolaire du Laurdan. ...	45
Schéma 18 : Représentation de la famille des Glycérolipidyls β -CDs (à gauche) et des Phosphoramidyls β -CDs (à droite)	62
Schéma 19 : Structure chimique des TASC, TBdSC et TBSC ⁷⁹	64
Schéma 20 : Représentation schématique des différentes β -CD amphiphiles synthétisées ¹³⁶	66
Schéma 21 : Représentation schématique de l'architecture de la β -CD amphiphile polycationique. Les rectangles/cylindres rouge représentent les groupes donneurs de liaisons hydrogènes, que sont les fonctions thio-urées. Tandis que les cercles verts représentent les centres cationiques, qui peut être éventuellement dendronisés. Les chaînes aliphatiques sont représentées en bleu.	74
Schéma 22 : Structures des cyclodextrines amphiphiles polycationiques (paCDs) de 1 α , β , γ à 4 α , β , γ ¹³⁷	74
Schéma 23 : Voie de synthèse linéaire de la phosphoramidyl- β CD-C18 :1	86
Schéma 24 : Représentation schématique d'une des possibilités de l'orientation du TsCl dans la cavité de la β -CD ³⁷	87
Schéma 25 : Voie de synthèse convergente permettant l'obtention de phosphoramidyl β -CD	90
Schéma 26 : Equilibre de la réaction de transestérification	90
Schéma 27 : Mécanisme possible de formation de l'intermédiaire dialkyle halogénophosphate	91
Schéma 28 : Phosphoramidyls β -CDs obtenues	92
Schéma 29 : Voie de synthèse pour l'obtention de la monoaminée γ -CD perméthylée (12)	96
Schéma 30 : Phosphoramidyls γ -CDs obtenues	96
Schéma 31 : Voie de synthèse suivie pour la synthèse des phosphoramidyls glucoses	97

Liste des Schémas

Schéma 32 : Les phosphoramidyls Glucoses obtenues	98
Schéma 33 : Préparation des vésicules pour l'étude de fusogénicité	122
Schéma 34 : Représentation schématique de la technique du « quenching/dequenching » employée	124
Schéma 35 : Schéma explicatif de l'ajout externe des β -C12 et C14.....	128
Schéma 36 : Schéma explicatif du test de fuite de la sonde R18 sous l'action de nos composés	129
Schéma 37 : Représentation schématique de la β DLC (à gauche) et de la β MLC (à droite) ^{168,169}	138

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Propriétés et solubilité des cyclodextrines	5
Tableau 2 : Vue d'ensemble des techniques permettant de caractériser les monocouches de Langmuir. (D'après ⁴⁴).....	20
Tableau 3 : Caractérisation par DLS des nanoparticules obtenues par nanopréciipitation.....	55
Tableau 4 : Caractérisation des nanoparticules obtenues par nanopréciipitation	56
Tableau 5 : Influence de la concentration du Pluronic® F68 dans la phase aqueuse sur la taille et l'indice de polydispersité des nanoparticules de γ -CD C6.....	57
Tableau 6 : CAC des différentes Glycérolipidyls β -CDs	63
Tableau 7 : Diamètre hydrodynamique moyen et indice de polydispersité (IP) des nano-agrégats avec les β -CD C6-C14 pour la formulation utilisant une concentration de dérivés de β -CD d'esters gras de 1 mg/mL dans la phase organique (d'après ¹²¹)	68
Tableau 8 : Tailles des nanoparticules des α -, β -, et γ -CD C10 déterminées par DLS.....	70
Tableau 9 : Caractéristiques des nanosphères chargées en ART formées à partir des β - et γ -CD C10 ¹²⁸	72
Tableau 10 : Valeurs de CAC des phosphoramidyl β -CD obtenues à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	100
Tableau 11 : Détermination de la taille des autoassemblages à 21°C à une concentration de 37,5 μ M.....	101
Tableau 12 : Aires moléculaires des phosphoramidyls β -CDs prises à 30 mN/m d'après les isothermes de compression	103
Tableau 13 : Pressions de collapse des phosphoramidyls β -CDs.....	104
Tableau 14 : Valeurs du module d'élasticité des phosphoramidyls β -CD à 30 mN/m.....	104
Tableau 15 : Valeurs des PIMs et $\Delta\pi_{30}$ obtenues	113
Tableau 16 : Injections en sous phase de monocouches de POPC et biomimétiques 4:3:1 et 2:1:1 à une concentration de C12, C14, C16 et C18 :1 égale à la CAC ou 2 fois la CAC réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4.....	118
Tableau 17 : Valeurs du Δ GP du Laurdan et du Prodan pour les vésicules mixtes β -C12/POPC et β -C14/POPC à 21 et 37°C	131
Tableau 18 : CD and POPC volumes used for each molar ratio	160
Tableau 19 : Excitation and emission wavelengths of the Laurdan and Prodan	164

INTRODUCTION GENERALE

L'efficacité des traitements thérapeutiques est réduite car certains principes actifs ont des difficultés à traverser les barrières biologiques. Certains ont une faible solubilité en milieu physiologique¹ ou présentent des effets secondaires². Enfin, ils peuvent subir des dégradations prématurées qui les rendent inactifs^{3,4}. De nombreux moyens ont été engagés pour remédier à ces problèmes majeurs, ceci grâce à des transporteurs moléculaires ayant la capacité d'encapsuler le principe actif et de traverser les membranes biologiques. Parmi les membranes biologiques, les chercheurs doivent également faire face à une barrière très sélective, la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). La BHE sépare le système sanguin des cellules du cerveau et possède une haute sélectivité. De ce fait, la plupart des principes actifs n'arrivent pas à atteindre le cerveau ce qui diminue nettement l'efficacité des traitements thérapeutiques. (Figure 1)

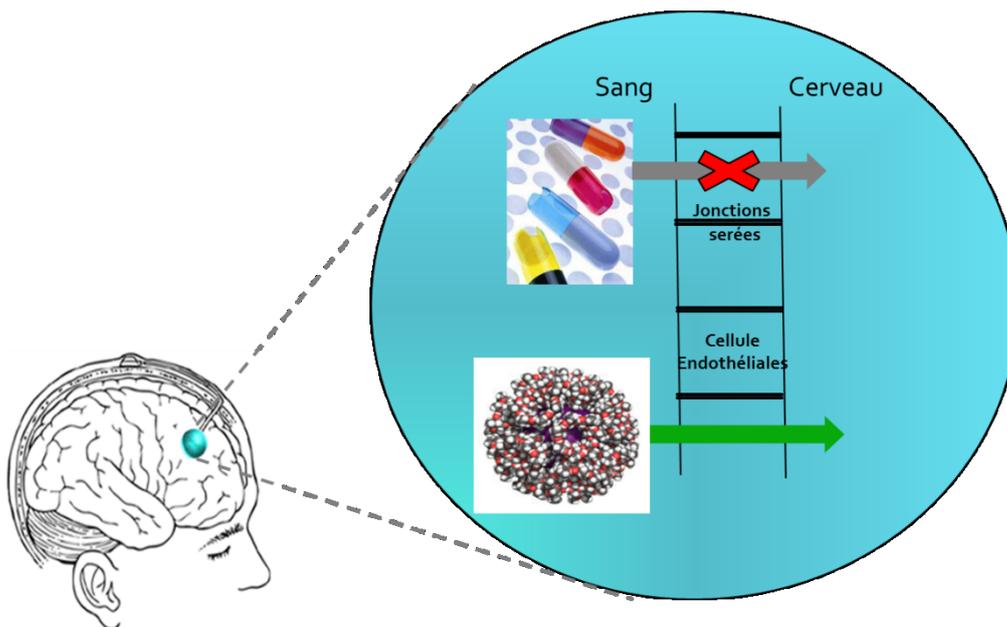


Figure 1 : Figure schématisant le rejet et le passage de principes actifs vis-à-vis de la BHE

Ce caractère très sélectif de la BHE est dû aux cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées formées par l'interaction de protéines transmembranaires⁵. Ceci est aussi dû à la présence de protéines MDR (MultiDrug Resistance), telles que la P-glycoprotéine (P-gp) qui va restreindre encore plus le passage de molécules à travers le cerveau.

Ceci est notamment le cas pour le traitement du sida (VIH). Les trithérapies ou multi thérapies utilisées pour guérir les patients ont permis d'améliorer leur qualité de vie et ainsi d'augmenter leur espérance de vie. Ce type de traitement est efficace pour traiter le VIH, dans

le corps, mais il n'atteint pas le cerveau à cause de la BHE. De ce fait, le cerveau devient un réservoir à VIH, et à long terme, cela peut provoquer des lésions cérébrales⁶. L'Atazanavir (dont le nom commercial est Reyataz®) a été choisi comme principe actif modèle pour l'observation de l'amélioration du passage de la BHE car c'est un anti rétroviral, plus précisément un inhibiteur de protéase du VIH qui passe très peu la BHE⁷.

Il est donc plus que nécessaire d'élaborer la synthèse de nouvelles molécules permettant de vectoriser ces principes actifs. Ces vecteurs idéaux forment des nanoparticules permettant d'encapsuler et de délivrer le principe actif au-delà de la BHE. Les vecteurs que nous proposons sont à base de cyclodextrines (CD) amphiphiles. De part cette propriété amphiphile, ces composés ont la capacité à la fois de s'auto-assembler en solutions aqueuses, d'encapsuler une molécule d'intérêt et de passer au travers des membranes biologiques. Dans les projets Cyclam (2005-2008, Région Picardie IBFBio)^{8,9} et Nanovecteurs (2008-2011, Région Picardie Axe Santé)^{10,11}, plusieurs cyclodextrines amphiphiles ont été synthétisées. L'une d'elles a déjà montré des propriétés de vectorisation sur un modèle in vitro de BHE¹⁰. (Schéma 1)

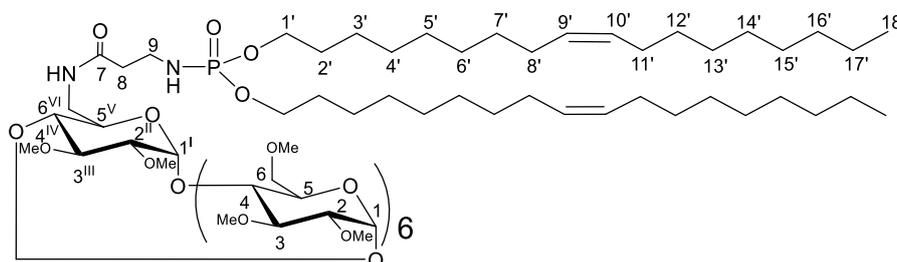


Schéma 1 : La phosphoramidyl-β-cyclodextrine synthétisée lors du projet Nanovecteurs¹⁰

Des résultats préliminaires obtenus avec cette CD ont montré que ce composé passe la BHE sans toxicité et ce qu'elle soit sous forme de nanoparticules ou libre et chargée ou non en principe actif. Ce composé a également prouvé sa capacité à transporter un principe actif au travers de la BHE.

La littérature montre que les CD amphiphiles sont nombreuses et utiles en vectorisation. Mais il y a peu de données diverses étant disponibles sur les structures les plus efficaces

Dans le cadre du projet SYNVECT, nous avons synthétisé une librairie de phosphoramidyl-CDs, avec des chaînes aliphatiques variées (longueur, insaturation(s)), des têtes polaires CDs (totalement méthylées β ou γ) ou monosaccharidiques variées afin de réaliser une étude structure/propriétés d'interactions avec des modèles membranaires biomimétiques. Les molécules synthétisées ont alors subi des tests physicochimiques afin de déterminer, entre

autres, leurs propriétés membranotropes et de fusogénicité. Ensuite, les meilleurs candidats issus de cette étude ont été sélectionnés pour des études complémentaires afin de comprendre leur mécanisme de passage et leur capacité à former des nanoparticules, chargées ou non d'Atazanavir, en solution aqueuse. Ensuite, ces composés ou leurs assemblages en vésicules mixtes ont été testés au Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE, Université d'Artois) sur un modèle *in vitro* de BHE.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les cyclodextrines

A. De la cellulose aux cyclodextrines

L'histoire de ces composés a commencé lors d'une expérience menée par le scientifique français Villiers. En effet, lors de la fermentation de la fécule de l'amidon par l'action du ferment butyrique (*Bacillus amylobacter*), dans des conditions déterminées, Villiers a noté la formation de cristaux indésirables avec des propriétés particulières¹². (Figure 2)

» Je donnerai ultérieurement les propriétés de ce nouvel hydrate de carbone, que je propose de désigner sous le nom de *cellulosine*, propriétés qui le différencient très nettement des diverses saccharines. J'indiquerai seulement aujourd'hui les caractères suivants :

- » Cristaux blancs, d'une saveur à peine sucrée.
- » La solubilité dans l'eau à la température ordinaire est très faible, ce qui ne m'a pas permis de déterminer le poids moléculaire par la méthode cryoscopique (100^{cc} d'eau à 15° ne dissolvent que 1^{gr},3 de matière sèche). Cette solubilité augmente avec la température (à 70°, 100^{cc} dissolvent 15 à 16^{gr}).
- » Son pouvoir rotatoire est fort élevé ; il est même supérieur à celui de certaines dextrines qui se forment sous l'action du ferment butyrique. Rapporté à la matière déshydratée, il est égal à

$$\alpha_D = +159,42,$$

Figure 2: Extrait de l'Académie des Sciences écrit par M.A. Villiers concernant les propriétés des cristaux indésirables

Ces cristaux indésirables, nommés « cellulose » par Villiers, vont se révéler être les cyclodextrines que l'on connaît aujourd'hui. En 1903, Franz Scharinger découvre que des microorganismes sont capables de dissoudre l'amidon et de former un sous-produit cristallin similaire à la cellulose de Villiers¹³. Scharinger va poursuivre ses études et en 1904, il réussit à isoler la souche de bactérie responsable qu'il nomme, *Bacillus macerans*. Entre 1905 et 1911, Scharinger a donné la première description détaillée de la préparation, de la séparation et de la purification des deux celluloses que Villiers avait décrites. Il va même leur donner le nom de α et β -dextrine. Jusque dans les années 70, ces composés furent appelés dextrines de Scharinger pour lui rendre hommage. Après cette découverte, ces composés ont continué à être étudiés afin de déterminer leurs propriétés et leurs structures exactes. En 1936, Freudenberg et son équipe confirme l'hypothèse de Scharinger et décrivent la forme cyclique des cyclodextrines par rayon X.¹³ En même temps, des études sont réalisées sur les bactéries qui produisent les cyclodextrines. L'enzyme responsable de la transformation de l'amidon en cyclodextrine, dans *Bacillus macerans*, est appelée Cyclodextrine GlycosylTransferases (CGTases).^{13,14}

B. Structures et propriétés

Les cyclodextrines sont donc des oligosaccharides cycliques composés d'unités glucoses reliées par une liaison glycosidique en α -1,4. Elles possèdent une structure en forme de cône tronqué. Les plus répandues et les plus utilisées sont les α , β et γ cyclodextrines avec respectivement 6, 7 et 8 unités glycosidiques (Schéma 2). Il existe aussi des cyclodextrines avec de larges cycles¹⁵.

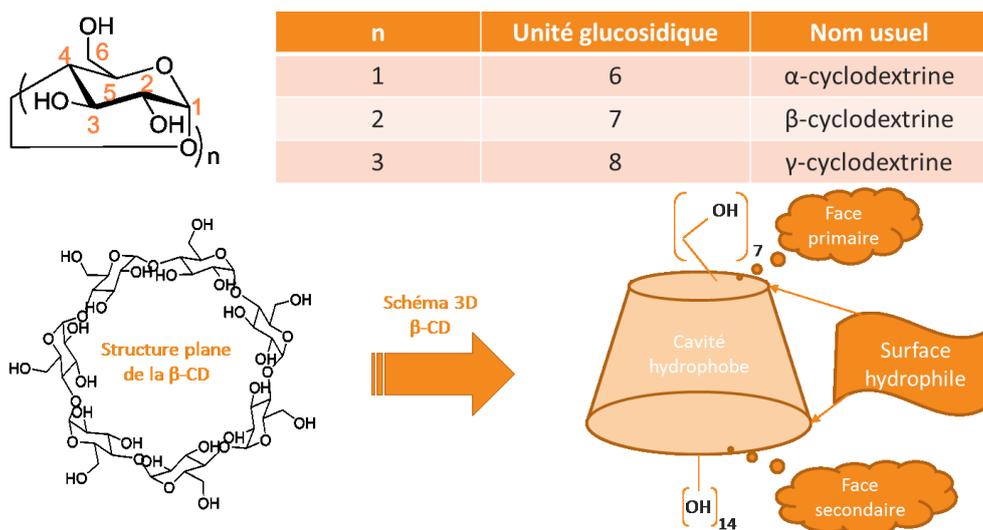


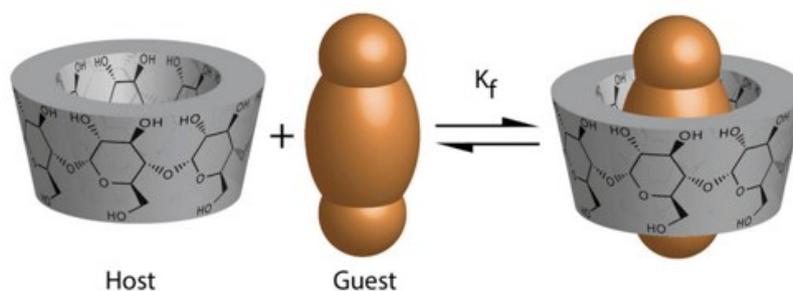
Schéma 2 : Structure des cyclodextrines

Selon le nombre d'unité glucosidique, les cyclodextrines vont voir leur taille de cavité et leur hauteur variée ce qui va modifier considérablement leur solubilité. Ce tableau permet d'énumérer quelques données structurales des cyclodextrines et leur solubilité¹⁶. (Tableau 1)

Tableau 1 : Propriétés et solubilité des cyclodextrines

Cyclodextrine	α	β	γ
Unités glucosidiques	6	7	8
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/mL)	129,5 ± 0,7	18,4 ± 0,2	249,2 ± 0,2
Diamètre extérieur (Å)	14,6	15,4	17,5
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume de la cavité (Å ³)	174	262	427
Hauteur (Å)	7,9	7,9	7,9
Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	973	1135	1297
Nombre de molécules totales d'eau présentes dans les hydrates stables des réseaux de CD	6,4	9,6	14,2

Les cyclodextrines possèdent une surface externe hydrophile (due aux fonctions alcools) et une cavité hydrophobe. De part cette propriété, elles peuvent encapsuler des molécules hydrophobes en solution aqueuse. La formation de complexe d'inclusion (Schéma 3) a été étudiée en 1959 par French¹⁷ en utilisant la diffraction des rayons X et ceci vient confirmer les études de Freudenberg et Cramer¹⁸ réalisées en amont. Il a pu montrer l'interaction de petites molécules telle que l'iode avec la cavité de l' α -cyclodextrine.



*Schéma 3 : Complexe d'inclusion entre la cyclodextrine et une molécule invitée*¹³

Les complexes d'inclusion mettent en jeu des interactions faibles de type Van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes...etc. Ceci conduit à la formation d'un complexe supramoléculaire en équilibre entre la forme incluse et la forme libre. Selon la nature de la cyclodextrine utilisée et la nature de l'invité, le complexe supramoléculaire possède des propriétés qui lui sont propres comme la stœchiométrie, la constante d'association et la structure.

Pour connaître la force d'interaction de la molécule invitée avec la cyclodextrine et ainsi connaître la stabilité du complexe formé, il suffit de déterminer la constante d'association du complexe. Pour déterminer la constante d'association (K_D ou K_A), il faut tout d'abord avoir déterminé la stœchiométrie du complexe d'inclusion étudié. Le K_D peut être déterminé par un grand nombre de techniques dont : la titration calorimétrique isotherme (ITC)¹⁹, la mesure de tension de surface²⁰, la méthode de Job Plot ou encore la microscopie à force atomique²¹.

Cette capacité à inclure des molécules va apporter un grand intérêt aux cyclodextrines et de larges applications dans différents domaines. Elles vont permettre, entre autres, d'améliorer la solubilisation de molécules insolubles, de préserver les molécules incluses de la dégradation, de masquer les odeurs et goûts indésirables et aussi de contrôler la libération de médicaments ou de molécules parfumées et vont aussi être utilisées en chimie analytique^{3,18,22-24}.

Les complexes d'inclusion avec des principes actifs permettent ainsi d'augmenter leur solubilité et leur stabilité en milieu physiologique mais aussi leur biodisponibilité. En

revanche ce simple complexe d'inclusion CD-molécule bioactive ne va pas permettre une libération prolongée et contrôlée. C'est, d'après ce constat, qu'il a fallu imaginer une autre forme de stabilisation et de transport de principes actifs en passant par la modification chimique de ces macrocycles. Ceci a été réalisé par la synthèse de cyclodextrines amphiphiles pouvant ainsi s'auto-organiser en assemblages supramoléculaires ayant la capacité d'encapsuler le principe actif d'intérêt mais aussi de pouvoir interagir avec les membranes biologiques²⁵.

C. Obtention de dérivés amphiphiles

1) Les composés amphiphiles

Voici la définition du mot « amphiphile » que l'on peut trouver dans le dictionnaire Larousse²⁶ : « Se dit de certaines molécules qui ont une moitié hydrophile et une moitié hydrophobe ». Cette définition nous amène à définir la notion de tensioactivité qui est liée à l'amphiphilicité d'un composé. On peut lire dans le dictionnaire Larousse²⁷ : « Aptitude des corps mis en solution à modifier la tension superficielle du solvant. ». Une molécule amphiphile est une molécule qui a la capacité de s'auto-organiser sous forme de micelles en solution aqueuse (lorsqu'elle possède un fort caractère tensioactif) ou en monocouche à l'interface air-eau. (Figure 3)

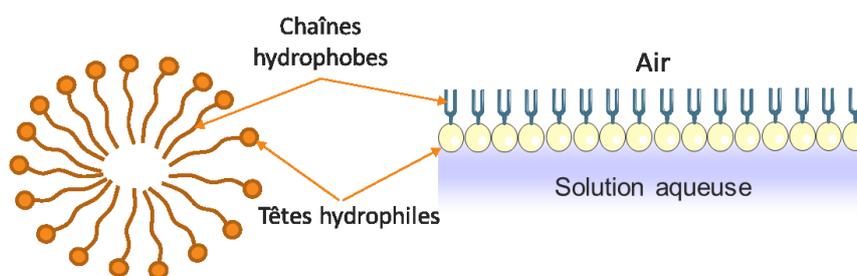


Figure 3 : Représentation de l'organisation d'une molécule amphiphile en solution aqueuse et à l'interface air-eau

2) Méthodes d'obtention des différents types de cyclodextrines amphiphiles

Les micelles relarguent très facilement ce qu'elles transportent dès qu'elles sont en dessous de leur concentration micellaire critique (CMC) et les liposomes sont peu stables. Des

assemblages préparés à partir des composés amphiphiles sont donc une solution pour la vectorisation.

Les cyclodextrines, de par leur structure, offre un large panel de modifications comme le montre la revue de Khan *et al.* essentiellement consacrée à ce sujet²⁸. Concernant la synthèse des cyclodextrines amphiphiles, il est possible de modifier la face primaire (Méduse) ou la face secondaire (Jupe) ou les deux par des chaînes aliphatiques (Bouquet). La plupart des travaux réalisés pour l'obtention de cyclodextrines amphiphiles ont été réalisés sur les α , β et γ -cyclodextrines. (Figure 4)

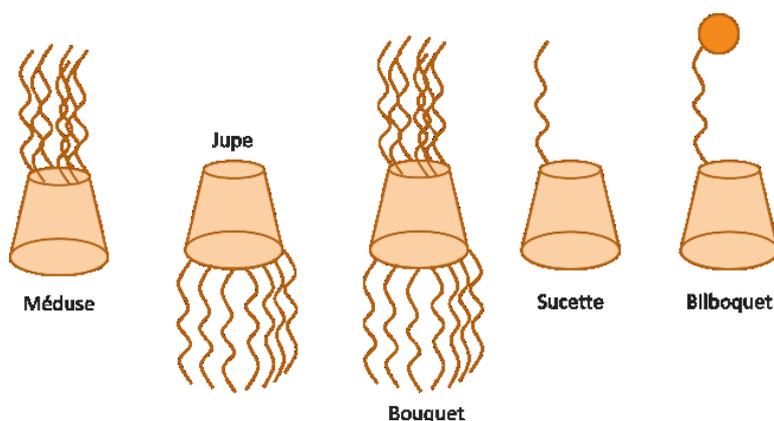


Figure 4 : Représentation des différents types de cyclodextrines amphiphiles

Les premiers à avoir synthétisé une β -cyclodextrine amphiphile sont Kawabata *et al.* en substituant les hydroxyles primaires par des groupements alkylsulfinyl de différentes longueurs²⁹. Ceci a permis d'obtenir des β -cyclodextrines de type « Méduse » en ayant la face primaire persubstituée par des chaînes aliphatiques. (Schéma 4)

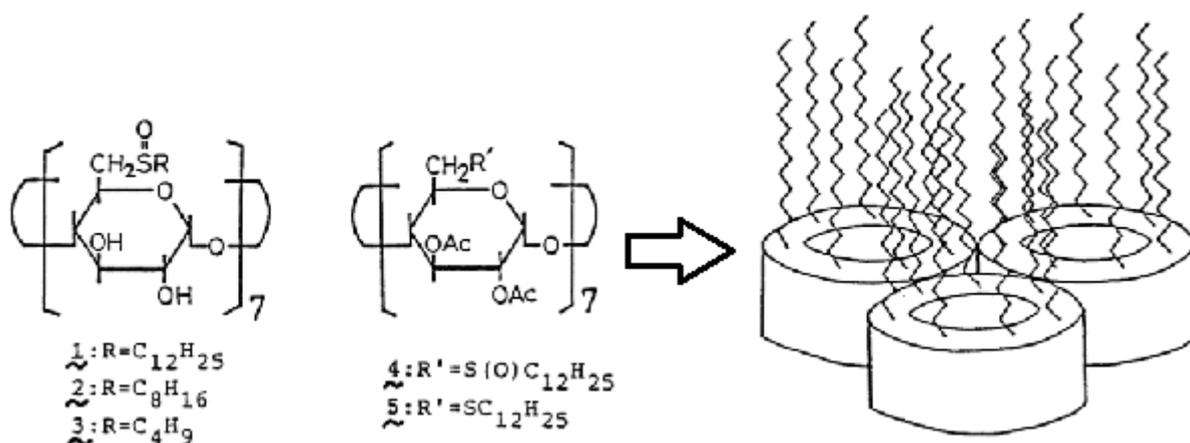


Schéma 4 : Structure des β -cyclodextrine obtenue par Kawabata²⁹

Ensuite, Zhang³⁰ *et al.* ont mis en place la synthèse des cyclodextrines amphiphiles de type « Jupe » en modifiant uniquement les hydroxyles secondaires. Elles sont obtenues en trois étapes en commençant par une protection des hydroxyles primaires par des groupements de tertio-butyle diméthyle silyles par la méthode de Fugedi³¹ qui consiste à utiliser la pyridine anhydre pour avoir une meilleure sélectivité de la position 6 des β et γ -cyclodextrines avec ajout du chlorure de tertio butyle diméthyle silyle au goutte à goutte. Cette réaction est suivie de la persubstitution de la face secondaire par le chlorure d'acyle correspondant dans la pyridine anhydre en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et en terminant par la déprotection de la face primaire par un acide de Lewis le BF_3 étherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) dans l'éthanol. (Schéma 5)

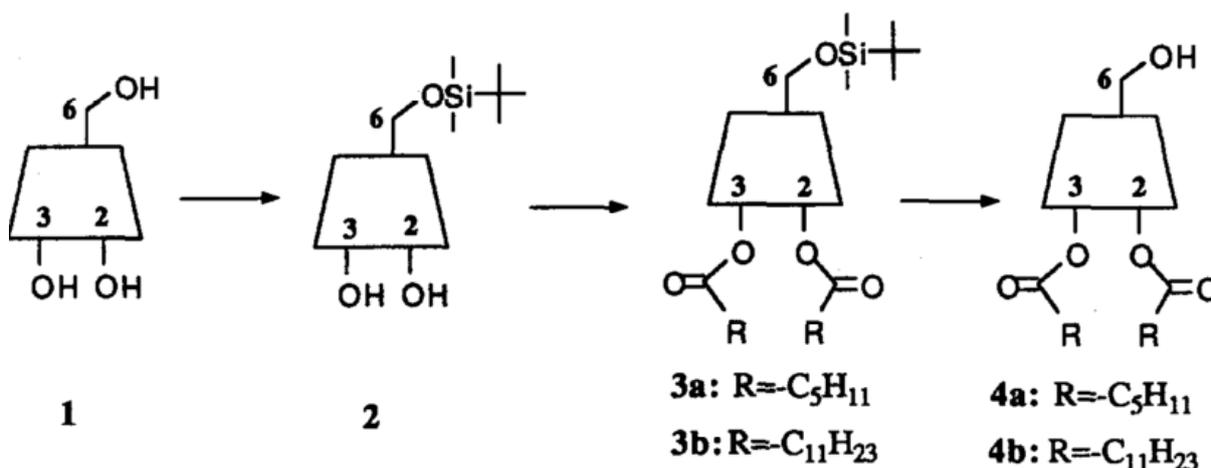


Schéma 5 : Voie de synthèse élaborée par Zhang pour la synthèse de β -cyclodextrines amphiphiles de type « Jupe »³⁰

C'est à la même période, en 1991, que Wenz³² a réalisé la synthèse des α , β et γ -cyclodextrines amphiphiles type « Bouquet » en substituant les faces primaires et secondaires par réaction avec le bromure de propyle, de butyle, de pentyle, de (3-méthyl)butyle et de dodecyle en milieu basique en présence de soude dans le diméthylsulfoxyde.

Bellanger et Perly³³ ont mis au point une synthèse de cyclodextrine plus sophistiquée en ne modifiant qu'un seul hydroxyle primaire par une chaîne aliphatique donnant naissance aux cyclodextrines de type « Sucette » (Figure 4). Cette molécule est obtenue en faisant réagir la β -cyclodextrine monoaminée³⁴⁻³⁷ avec un acide carboxylique activé par réaction entre le *N*-hydroxysuccinimide en présence de dicyclohexylcarbodiimide et d'un acide carboxylique conduisant à l'ester. Ces composés se sont révélés être peu solubles en milieu aqueux ce qui ne permet pas d'application biologique. De plus, la chaîne alkyle a tendance à se retourner pour entrer dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine.

Pour éviter cela, d'autres composés monoalkylés sur la face primaire ont été synthétisés en ajoutant un groupement encombrant en bout de chaîne permettant de diminuer l'effet d'auto-inclusion. Pour remédier au problème de solubilité, il a fallu modifier le reste des hydroxyles avec, par exemple, des groupements méthyles³⁸. Ceci est d'autant plus valable avec la β -cyclodextrine native qui présente une très faible solubilité dans l'eau comparée aux α et γ -cyclodextrines (voir Tableau 1). En effet, tous les hydroxyles de la β -cyclodextrine forment des liaisons hydrogènes intramoléculaires, ce qui ne lui permet pas d'en créer avec l'eau, donc la rend faiblement soluble. Par conséquent, le fait de méthyler partiellement les hydroxyles libres restants (RAMEB : Randomly Methylated β -CD, DIMEB³⁹ : Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -CD, CRYSMEB : low methylated derivative of β -cyclodextrin) ou totalement (TRIMEB : TriMethylated β -CD) après avoir réalisé la monosubstitution d'une position 6 va augmenter très fortement la solubilité du composé. Il a, en revanche, été montré que la TRIMEB avait une solubilité plus grande à des plus faibles températures par rapport à la β -CD native⁴⁰.

II. Etudes physicochimiques

A. Les modèles membranaires biomimétiques

Ces modèles mettent en jeu la nature fondamentale de nombreux lipides : leur caractère amphiphile. Celui-ci est responsable de leurs comportements en solution (formation de micelles, vésicules...) ou en surface d'une solution aqueuse (étalement en un film monomoléculaire à l'interface). Dans le dernier cas, les lipides vont naturellement s'orienter, la partie hydrophile (tête polaire) immergée dans la phase aqueuse et la partie hydrophobe (chaînes alkyles) dirigées vers l'air (Figure 3). La capacité à s'organiser à l'interface air-eau n'est pas restreinte aux lipides mais plutôt à tout composé ayant un caractère amphiphile comme plus particulièrement les phospholipides, les polymères, les peptides et autres.

1) Les monocouches de Langmuir

Pour voir l'émergence de cette technique des monocouches de Langmuir, il faut revenir au XVIII^e siècle, et plus précisément en 1774, lorsque Benjamin Franklin publia les premiers travaux des effets de l'huile sur l'eau^{41,42}. Rayleigh a été le premier à mesurer la diminution de la tension de surface de l'eau selon la quantité d'huile d'olive déposée à la surface⁴². En se basant sur ces mesures de densité de surface, il estima l'épaisseur du film d'huile à 16

Å. Agnes Pockels, en 1891, a été plus loin dans ce domaine de recherche et a décrit une méthode pour réaliser des mesures quantitatives sur les films d'interfaces huile-eau à l'aide d'une barrière. Elle a ainsi observé que la tension de surface a diminué rapidement lorsque la monocouche a été comprimée en dessous d'une certaine aire⁴³. Il a été spéculé par Rayleigh que cette aire est celle pour laquelle les molécules d'huiles sont étroitement serrées, cette hypothèse a été la base de l'objet de films monomoléculaires⁴⁴. En 1917, tous les concepts théoriques et expérimentaux furent développés par Langmuir ce qui constitue la base de nos connaissances actuelles du comportement des molécules à l'interface air-eau⁴⁵. Il a mis au point une cuve avec une plaque qui séparait la surface de l'eau pure de celle couverte par le film. Pour l'ensemble de ses travaux réalisés dans le domaine de la chimie des surfaces, il a reçu le prix Nobel de chimie en 1932. En complément de ces travaux sur les monocouches, Blodgett a élaboré une méthode pour obtenir des multicouches, à partir d'une monocouche, sur un substrat solide que l'on connaît sous le nom de transfert de Langmuir-Blodgett.

a) La balance de Wilhelmy

La balance de Wilhelmy est la technique la plus utilisée pour l'étude des monocouches de Langmuir. Cette technique correspond à une lame suspendue partiellement immergée dans la sous phase reliée à un tensiomètre. Cet appareil va permettre de mesurer la pression de surface. (Schéma 6)

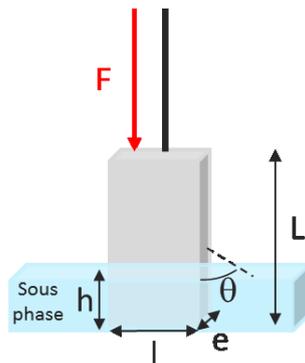


Schéma 6 : Représentation de la balance de Wilhelmy

La force, notée F, est appliquée à la lame partiellement immergée. Elle résulte du poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle. D'où l'équation de F :

$$F = \rho_{lame} \times l \times h \times e \times g + 2\gamma (e + 1) \cos\theta - \rho_{eau} \times l \times L \times e \times g$$

avec :

- + ρ_{lame} et ρ_{eau} : masses volumiques de la lame et de l'eau, respectivement
- + g : accélération de la pesanteur
- + L : longueur de la lame
- + l : largeur de la lame
- + h : hauteur de la partie immergée de la lame
- + e : épaisseur de la lame
- + θ_0 : angle de contact entre la lame et la sous phase
- + γ : tension superficielle

La présence de lipides va induire un changement de tension de surface représenté par ΔF . Donc pour déterminer la pression de surface, il faut mesurer ΔF qui est en fait la force exercée sur la lame pour l'eau pure et pour l'eau en présence de lipides à partir de l'équation suivante :

$$\Delta F = 2(e+1)(\gamma_0 \cos \theta_0 - \gamma \cos \theta)$$

Des lamelles en papier filtre (Whatmann), en verre ou en platine sont souvent utilisées. Du fait de leurs caractères parfaitement mouillants les angles θ_0 et θ , qui correspondent, respectivement, aux angles de contact sur la lame de l'eau pure et de l'eau en présence de lipides, deviennent nuls. Donc l'équation de ΔF se simplifie :

$$\Delta F = 2(e+1)(\gamma_0 - \gamma)$$

En monocouches de Langmuir, il est fait référence à la pression de surface (π) avec $\pi = \gamma_0 - \gamma$.

Par conséquent, $\Delta F = 2\pi(e+1)$ donc $\pi = \frac{\Delta F}{2(e+1)}$.

Le tracé de la pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire moyenne (A) va permettre d'obtenir beaucoup d'informations sur le comportement du composé déposé à l'interface air-eau.

b) Principe de formation des monocouches lipidiques

Afin de former une monocouche à l'interface air-eau, il faut tout d'abord solubiliser les lipides dans un solvant organique volatil non miscible à l'eau comme, par exemple, le

chloroforme ou un mélange hexane/éthanol (9/1). Le solvant choisi joue un rôle sur le degré d'étalement des lipides car celui-ci va permettre de les répartir sur la totalité de la surface disponible entre les deux barrières mobiles. Par déplacement des barrières, l'espace entre celles-ci va se réduire provoquant ainsi une réorganisation des lipides à l'interface d'une façon de plus en plus condensée (Figure 4). Durant la compression des barrières, la balance de Wilhelmy, partiellement immergée dans la sous phase, va permettre de suivre la variation de la pression à la surface exercée par les lipides. Cette mesure de la pression de surface, en direct, permet de rendre compte de l'état de compaction de la monocouche lipidique au cours de la compression. L'appareil utilisé va enregistrer la tension superficielle en fonction de l'aire disponible en connaissant auparavant la quantité de lipides déposés et l'aire totale de la cuve. Le traitement des données va permettre de tracer une isotherme de compression (π -A) représentant la pression de surface (π) en fonction de l'aire occupée par une molécule de lipide à l'interface (A^2 /molécule). (Figure 5)

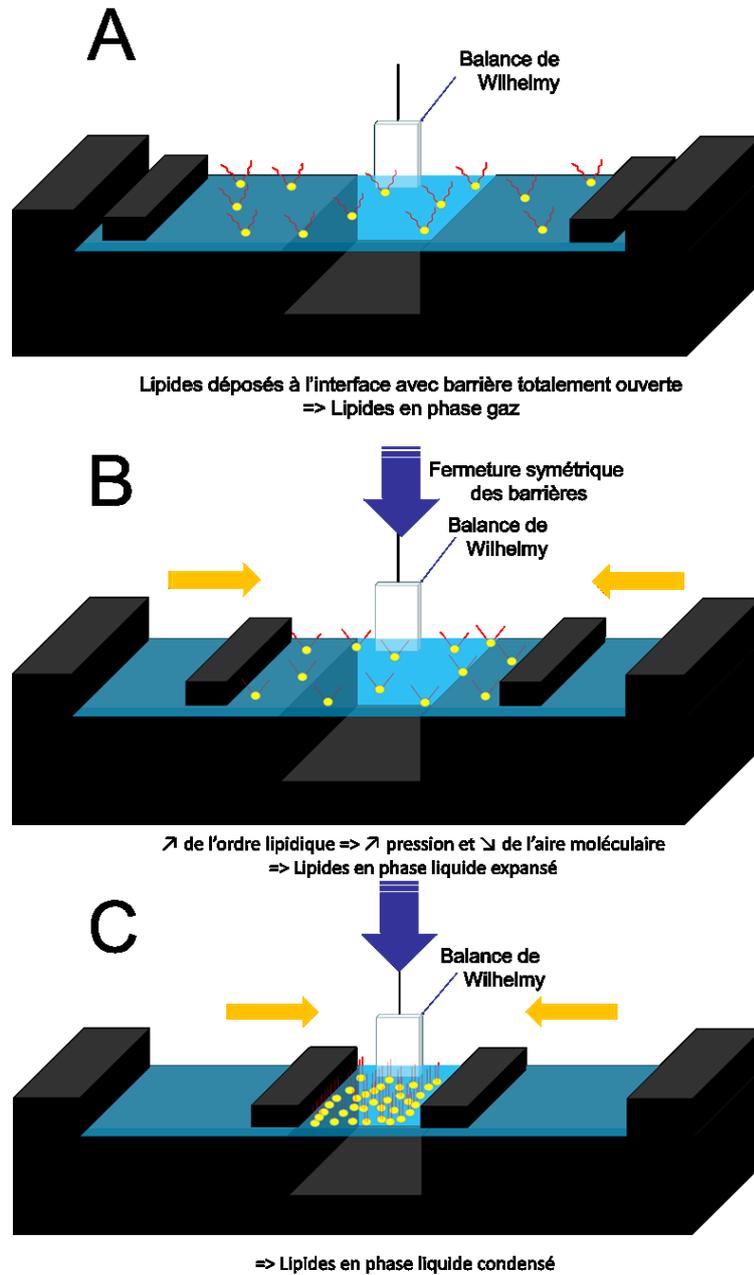


Figure 5 : Formation d'une monocouche à l'interface air-eau

c) Les isothermes de compression

Une isotherme de compression est obtenue lors de la compression de lipides ou d'une molécule tensioactive à l'interface air-eau (ou tampon) à une température donnée. Cette courbe est obtenue en suivant la variation de la pression de surface (π) en fonction de la diminution de l'aire moléculaire moyenne ($A^2/\text{molécule}$). (Figure 6)

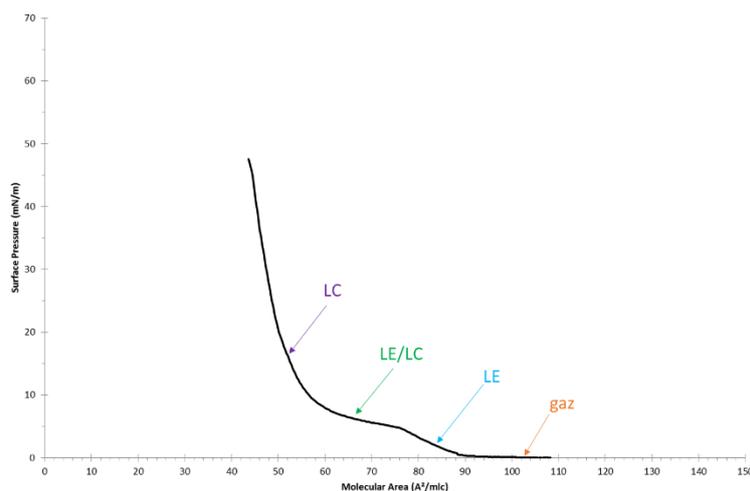


Figure 6 : Isotherme de compression du phospholipide DPPC à 21°C

LE : liquide expansé, LC : Liquide condensé

Comme vu sur la Figure 5, lors du dépôt de la DPPC à l'interface air-eau, la monocouche change d'organisation au cours de la compression et pour cela elle passe par différentes phases. Elle se trouve en phase gaz au moment du dépôt ($A^2/\text{molécule} > 100 \text{ \AA}^2$) et il n'y a aucune interaction entre les différentes molécules ($\pi=0 \text{ mN/m}$, Figure 5, A et Figure 6). En fermant les barrières ceci va contraindre la molécule à l'interface à se réarranger pour atteindre l'état « Liquide Expansé (LE) ». Cet état est caractéristique d'un état supérieur d'organisation de l'ordre lipidique au sein de la monocouche, à ce stade, des interactions entre les molécules se mettent en place (entre 1 et 7mN/m, voir Figure 5, B et Figure 6). Les barrières continuent leur parcours en comprimant la monocouche ce qui permet d'atteindre un état d'organisation qui montre la coexistence de deux phases appelées « transition de phase Liquide Expansé/Liquide Condensé (LE/LC)» qui n'est pas observé pour tous les lipides. Au niveau de la pression, ceci se traduit par un plateau à 7 mN/m caractéristique de la DPPC à 21°C avec l'eau comme sous phase. Ensuite en poursuivant la compression, la pression de surface augmente de nouveau ce qui permet au lipide de quitter cette phase de transition (LE/LC) pour atteindre la phase « Liquide Condensé (LC)» ($\pi > 7 \text{ mN/m}$, voir Figure 5, C et Figure 6). A ce stade de la compression, les molécules interagissent entre elles par des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles et des interactions dipôles/dipôles entre les têtes polaires. La poursuite de la compression peut, dans certains cas et selon la nature du lipide, conduire à une phase solide qui correspond à un redressement total des chaînes acyles permettant ainsi de fortes interactions entre elles. Au-delà de cette phase, survient le collapse de la monocouche correspondant à une perte du caractère bidimensionnel de la monocouche avec la formation de multicouches.

Une isotherme de compression permet également de déterminer la capacité de déformation de la monocouche lors de la compression. Elle indique donc l'état de viscoélasticité et correspond à l'inverse de l'élasticité (K_s). Davies *et al.* ont défini son équation mathématique et elle peut être calculée directement à partir de la pente de l'isotherme de compression (π -A). Voici la relation qui la définit^{36,37} :

$$C_s = -\frac{1}{A} \times \frac{dA}{d\pi} \text{ avec } C_s = \frac{1}{K_s}$$

Avec :

- ✚ π : pression de surface
- ✚ A : l'aire moléculaire à une pression de surface π donnée et à une température T donnée.

Le module d'élasticité (K_s) est couramment utilisé pour interpréter les propriétés de surface d'une monocouche. Le K_s augmente au cours de la compression ce qui signifie une augmentation de l'élasticité.

d) Propriétés thermodynamiques de mélanges binaires à l'interface air-eau

Les isothermes de compression ne sont pas limitées à l'étude d'un seul lipide à la fois ainsi il est possible de former des monocouches mixtes lipide/lipide ou lipide/agent externe à l'interface air-eau. Ces mélanges nous permettront de déterminer la miscibilité des molécules dans le film à l'interface air-eau et pour les mélanges miscibles, nous étudierons l'idéalité du mélange ainsi que la force d'interaction entre les molécules.

i Miscibilité du mélange

La capacité de deux composés à se mélanger s'appelle miscibilité. Ainsi lorsque les composés se répartissent de manière homogène à la surface de la sous-phase, on dit que ces composés sont miscibles. Au contraire, si les composés forment des domaines et ne se mélangent pas à l'interface air-eau ils sont considérés comme non miscibles. La miscibilité/non miscibilité est déterminée en comparant les pressions de collapse des isothermes de compression des monocouches mixtes. Effectivement, l'obtention de deux pressions de collapse différentes, sur l'isotherme, correspondant aux pressions de collapse des deux produits purs, signifie que les

composés ne sont pas miscibles⁴⁶. Tandis que, si la pression de collapse des isothermes du mélange des molécules 1 et 2 suit la relation suivante, alors ils forment un mélange miscible :

$$\pi_{C12} = \pi_{C1}.X_1 + \pi_{C2}.X_2$$

Avec :

- ✚ π_{C12} : pression de collapse du mélange des molécules 1 et 2
- ✚ π_1 et π_2 : pressions de collapse des composés 1 et 2
- ✚ X_1 et X_2 : fractions molaires des composés 1 et 2

ii Idéalité du mélange

Après avoir vérifié la miscibilité de nos composés à l'interface air-eau, il faut déterminer l'idéalité du mélange. Ainsi, un mélange est considéré comme idéal lorsqu'il y a absence de tout type d'interaction entre les deux composants du mélange. L'idéalité peut être déterminée en calculant l'aire moléculaire idéale A_{12} par la relation suivante^{36,37} :

$$A_{12 \text{ idéale}} = X_1A_1 + X_2A_2$$

Avec :

- ✚ X_1 et X_2 : fractions molaires des composés 1 et 2
- ✚ A_1 et A_2 : aires moléculaire à une pression donnée des composés 1 et 2

La non idéalité du mélange survient lorsque l'aire moléculaire du mélange déterminée sur l'isotherme de compression est différente de l'aire moléculaire idéale calculée^{46,47}. Deux cas de figures se présentent alors :

-soit l'aire moléculaire déterminée est inférieure à l'aire moléculaire calculée, cela traduit une attraction intermoléculaire des molécules 1 et 2 au sein de la monocouche,

-soit l'aire moléculaire déterminée est supérieure à l'aire moléculaire calculée, cela traduit une répulsion intermoléculaire des molécules 1 et 2 au sein de la monocouche.

Dans le cas où l'aire moléculaire déterminée suit la relation d'idéalité alors le mélange est soit idéal soit non miscible⁴⁶. Il faudra donc vérifier la miscibilité en comparant les pressions de collapse.

De la même manière, les travaux de plusieurs équipes ont permis de déterminer le module de compressibilité idéal pour des monocouches mixtes^{46,47}.

$$C_{s \text{ idéal}} = (1/A_{12 \text{ idéal}}) ((C_{s1}A_1).X_1 + (C_{s2}A_2).X_2)$$

Avec :

- ✚ C_{s1} et C_{s2} : modules de compressibilité des composés 1 et 2 purs
- ✚ X_1 et X_2 : fractions molaires des composés 1 et 2

Le $C_{s \text{ idéal}}$ nous renseigne sur l'idéalité des mélanges comme l'aire moléculaire idéale.

iii Variations d'énergie libre du mélange

Ce paramètre va permettre de déterminer le type d'interaction entre les deux composés constituant le mélange binaire. Cette variation d'énergie libre du mélange est définie par la relation suivante⁴⁷:

$$\Delta G_{ex} = \int_0^\pi A_{12} d\pi - X_1 \int_0^\pi A_1 d\pi - X_2 \int_0^\pi A_2 d\pi$$

Avec :

- ✚ ΔG_{ex} : variation d'énergie libre entre les molécules 1 et 2
- ✚ A_1 , A_2 et A_{12} : aires moléculaires, respectives, des composés 1, 2 et du mélange
- ✚ X_1 et X_2 : fractions molaires, respectives, des composés 1 et 2
- ✚ π : pressions de surface

Quand, ΔG_{ex} est égale à 0, alors le mélange est idéal. Sinon deux cas de figure se présentent : soit le $\Delta G_{ex} < 0$, ce qui signifie qu'il y a des interactions intermoléculaires favorables de nature attractive, soit $\Delta G_{ex} > 0$, alors il y a des interactions intermoléculaires défavorables de nature répulsive.

e) Etude du caractère membranotrope de composés d'intérêt

Comme montré précédemment, les monocouches de Langmuir sont un modèle membranaire ayant diverses applications. En effet, il est possible d'étudier les interactions de composés d'intérêt avec la monocouche préformée à l'interface, qui, selon le dépôt effectué, mime la composition lipidique de membrane biologique. Ce type d'étude est utilisé dans différents domaines comme la toxicologie, la pharmaceutique et l'industrie.

Le composé testé est injecté à une concentration bien déterminée pour laquelle le composé n'induit aucune modification de la pression de surface sans lipide à l'interface. Ceci nécessite une étude en amont pour chaque composé à tester avant de réaliser un test d'interaction avec une monocouche biomimétique. Après cela, sa capacité à s'insérer dans les membranes biologiques peut être aisément déterminée en l'injectant en dessous d'une monocouche préformée à aire constante et à différentes pressions initiales (Figure 7, A).

Une augmentation de la pression de surface après l'injection va permettre de rendre compte de l'insertion d'une molécule dans la monocouche. Après avoir réalisé l'injection de la molécule d'intérêt à différentes pressions initiales, la Pression d'Insertion Maximale (PIM) peut être déterminée en traçant le $\Delta\pi$ en fonction des différents π_0 et la PIM correspond à l'intersection de la droite obtenue avec l'axe des abscisses (Figure 7, B). Il faut savoir que la PIM doit être supérieur à la pression latérale des membranes biologiques pour que la molécule testée soit considérée comme membranotrope. Celle-ci est comprise entre 30 et 35 mN/m³⁶. Cette donnée n'étant parfois pas suffisante pour conclure avec exactitude quant au caractère membranotrope d'une molécule, le $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ est donc déterminé. Celui-ci est donc défini en se plaçant à $\pi_0 = 30$ mN/m et en relevant la valeur obtenue par le projeté sur l'axe des ordonnées par rapport à la courbe (Figure 7, B). En termes d'interaction, cette valeur nous renseigne sur la quantité de molécules en interaction avec la monocouche préformée. Par conséquent, plus cette valeur est grande et plus il y a de molécules en interaction avec la monocouche préformée⁴⁸.

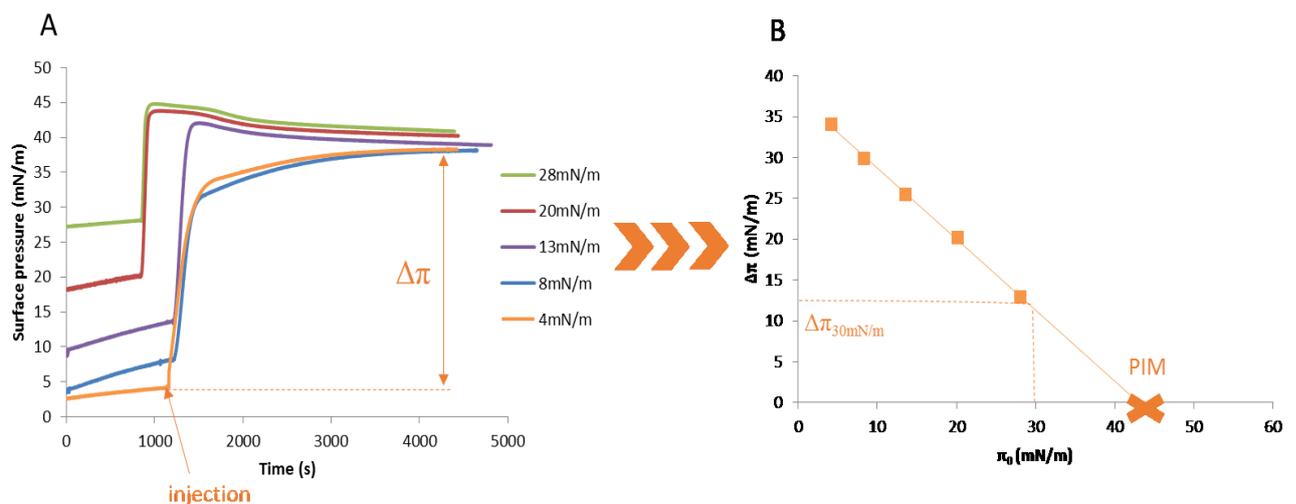


Figure 7 : Exemple d'insertion d'une molécule d'intérêt dans une monocouche de POPC à 21°C

A : Cinétique d'insertion du composé dans la monocouche de POPC.

B : Variation de la pression de surface ($\Delta\pi$) en fonction de π_0

Des études ont permis de valider la cohérence de ce modèle membranaire en monocouche (2D) en comparaison avec un modèle bicouche (3D). Ceci a été réalisé par Albrecht *et al.* et qui ont montré qu'une monocouche de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (DMPC) comprimée à 31,5 mN/m est dans le même état de compaction que la bicouche formée du même phospholipide⁴⁹.

Jusqu'à maintenant, il y a eu un grand nombre d'études menées sur les interactions lipides-protéines ou lipides-peptides afin de mieux caractériser les types d'interaction entre ces différents acteurs. Ceci a permis de mieux comprendre l'importance de l'état membranaire, comme le degré de compaction et les phases lipidiques, sur le fonctionnement des canaux ioniques^{50,51}, mais aussi la façon dont interagissent les anesthésiques avec les membranes⁵². Les paramètres responsable de l'interaction de protéines périphériques avec les membranes ont pu être étudiés⁵³. Ceci a permis également d'estimer l'étendue de la pénétration de protéines et de peptides dans des monocouches lipidiques⁴⁸ et de caractériser l'influence de l'état physique des monocouches de phospholipides sur la liaison avec une protéine⁵⁴.

Des études ont également permis d'en savoir plus quant aux paramètres physico-chimiques liés aux interactions lipides-molécules d'intérêt. La miscibilité et le type d'interaction entre les molécules ont ainsi pu être déterminés^{55,56}.

2) Méthodes de caractérisation couplées aux monocouches de Langmuir

L'utilisation des monocouches de Langmuir permet d'obtenir des informations sur l'orientation moléculaire ainsi que les structures des domaines. Cette technique couplée à des techniques de caractérisation poussées va permettre une caractérisation de différents autres paramètres avec précision comme la couverture (revêtement), l'épaisseur, la densité, la composition atomique, la composition des groupes chimiques et la structure chimique de la monocouche⁴⁴. Un grand nombre de techniques peuvent être couplées aux monocouches de Langmuir donc nous allons nous limiter, dans cette partie, aux techniques spectroscopiques, microscopiques ou encore des mesures de diffusion des Rayons X ou de neutrons (Tableau 2). Pour plus d'informations concernant le reste des techniques utilisées se référer à la revue de Dynarowicz *et al*⁴⁴ est un article de référence.

Tableau 2 : Vue d'ensemble des techniques permettant de caractériser les monocouches de Langmuir. (D'après ⁴⁴)

Techniques	Informations obtenues
Microscopie à l'angle de Brewster	Caractéristiques morphologiques, formation de domaines, phases de la monocouche, coexistence de phase, comportement du collapse, diagramme de phase π -T.
Microscopie de fluorescence	Formation de domaines, les phases et leur coexistence
Spectroscopie UV-VIS	Présence de chromophores, agrégation, interactions moléculaires.
Spectroscopies infrarouge	Présence de groupes fonctionnels, degré d'ionisation, orientation des chaînes/têtes polaires, liaisons hydrogène.
Diffraction des rayons X à l'angle rasant	Ordre de positionnement, plan de la structure en treillis, différentes phases de la monocouche
Réflectivité des neutrons et rayons X	Nanostructure de la surface et de l'interface, suivi de réaction dans la monocouche, épaisseur de la monocouche, interactions monocouche/contre ion

a) Les techniques microscopiques

i La microscopie à l'angle de Brewster (BAM)

La première tentative pour visualiser les monocouches de Langmuir a été réalisée en utilisant un microscope électronique. Celui-ci a juste montré une inhomogénéité de la monocouche à basse pression montrant des plaques larges, alors qu'à haute pression l'interface air-eau était recouverte d'une monocouche homogène et continue⁴⁴.

De nos jours, l'utilisation de la microscopie à l'angle de Brewster (BAM) permet de recueillir bien plus d'informations. Elle a été développée simultanément par Hénon et Meunier⁵⁷ ainsi que par Hönig et Möbius⁵⁸ en 1991. Cette dernière équipe a fondé une entreprise leader dans la production de microscopes à l'angle de Brewster. Le principe de la microscopie à l'angle de Brewster est basé sur la différence d'indice de réfraction de deux milieux différents. Dans le cas des monocouches de Langmuir nous sommes à l'interface air-eau, nous avons donc un

indice de réfraction pour l'air : $n_{\text{air}} = 1,00$ et un indice de réfraction pour l'eau : $n_{\text{eau}} = 1,33$. L'angle de Brewster est défini comme l'angle d'incidence sous lequel la radiation polarisée p n'est pas réfléchi à l'interface des deux milieux (air-eau). La valeur de l'angle de Brewster peut être prédite par l'équation de Fresnel⁵⁹ :

$$\vartheta_{\text{Brewster}} = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

Avec : n_1 et n_2 : indices de réfraction des milieux 1 et 2. Lorsque nous sommes à l'interface air-eau, $n_1 = n_{\text{air}}$ et $n_2 = n_{\text{eau}}$

Dans le cas d'une interface air-eau, la valeur de l'angle de Brewster est $\vartheta_{\text{Brewster}} = 53,1^\circ$. A cet angle d'incidence à l'interface air-eau, aucune réflexion de la radiation polarisée p ne sera observée. Par contre, lors de la formation d'une monocouche à cette interface, l'indice de réfraction sera modifié ce qui modifie donc l'angle de Brewster. Dans ce cas, une certaine partie de la radiation polarisée p est réfléchi par la monocouche qui a recouvert la partie analysée de l'interface. La récupération de cette radiation avec une caméra vidéo permet une visualisation, *in situ* en temps réel, de la monocouche. (Figure 8)

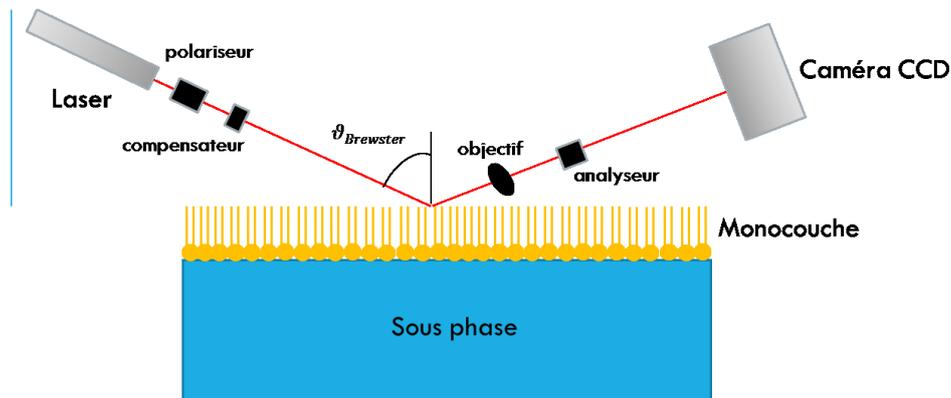


Figure 8 : Représentation du BAM en fonctionnement (d'après⁶⁰)

Le BAM a une résolution de l'ordre de 1 à 3 μm . Le rayonnement laser, couramment utilisé, est à une longueur d'onde de 532 nm. Voici la première image de BAM réalisée par Hönig et Möbius. (Figure 9)

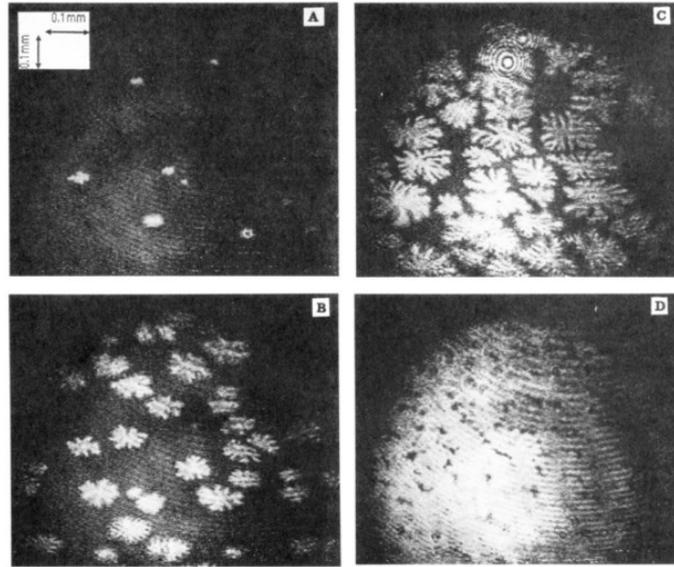


Figure 9 : Premières images de BAM d'une monocouche du phospholipide DMPE⁵⁸

La Figure 9 montre la qualité d'image obtenue avec cet appareil ainsi que la simplicité à interpréter les données. Les différents domaines sont simplement visualisés par la différence de contraste entre ces derniers.

Il faut savoir que la modification la plus importante de l'indice de réfraction provient des chaînes hydrocarbonées de la molécule tensioactive ainsi que de l'épaisseur de la couche des chaînes hydrocarbonées, la compacité et de l'anisotropie dans le plan. Ceci conduit à différentes intensités de la lumière réfléchi qui vont induire le contraste sur les images en BAM. De ce fait, la caractérisation de l'apparition de la pression de collapse est facilement réalisable. En effet, la pression de collapse correspond à l'apparition de multicouches initiées par l'apparition d'un point de nucléation qui va croître en continuant la compression et ceci va donc apparaître plus brillant que la monocouche sur les images en BAM. Cela a été réalisé par Deng et son équipe⁶¹ lorsqu'ils ont étudié un tensioactif à base de silicium. Ils ont pu observer le point de nucléation qui conduit à la formation de multicouches. Comme les multicouches sont plus épaisses alors elles sont plus brillantes. Ainsi, le BAM permet une caractérisation aisée de ce phénomène et de son expansion au sein de la monocouche en observant simplement l'élargissement des régions claires.

Le BAM va permettre aussi d'observer, grâce à l'angle azimutal, l'orientation relative de la chaîne hydrocarbonée inclinée par rapport à l'interface air-eau. En d'autres termes, la valeur de l'angle d'inclinaison de la chaîne hydrocarbonée est observée par différence de contraste⁶².

Une récente découverte a permis d'aller au-delà de la visualisation des chaînes hydrocarbonées. En effet, la réflexion de la radiation à l'interface air-eau du rayonnement incident provenant du laser peut être absorbée par des molécules se situant à l'interface. Par conséquent, l'utilisation de molécules absorbant les radiations dans le visible va permettre une caractérisation au niveau des têtes polaires. Giner-Casares et son équipe⁶³ ont étudié un mélange de phospholipides avec le bleu de méthylène (MB) en monocouches de Langmuir. Cet ajout a modifié l'allure de l'isotherme de compression ce qui laisse supposer une restructuration des molécules dans la monocouche à l'interface air-eau. (Figure 10)

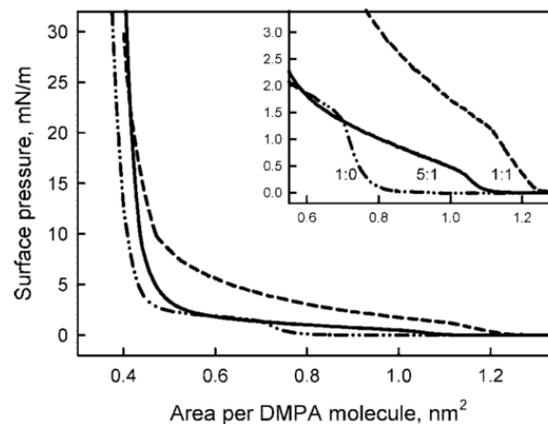


Figure 10 : Isotherme de compression de DMPA pur (trait plein), du mélange DMPA : MB en ratio molaire 5 : 1 (tiret et point) et 1 : 1 (tiret)⁶³

Un élargissement de l'état de transition a été observé et le BAM a permis de déterminer l'origine de cette modification. Etant donné que le bleu de méthylène absorbe les radiations visibles, ceci va par conséquent renforcer la réflexion de la radiation durant l'étude en BAM. De ce fait, un contraste évident entre les différentes textures internes des agrégats à l'intérieur des domaines est observé. Ceci correspond, en fait, à différentes orientations internes des agrégats du bleu de méthylène au sein des domaines. (Figure 11)

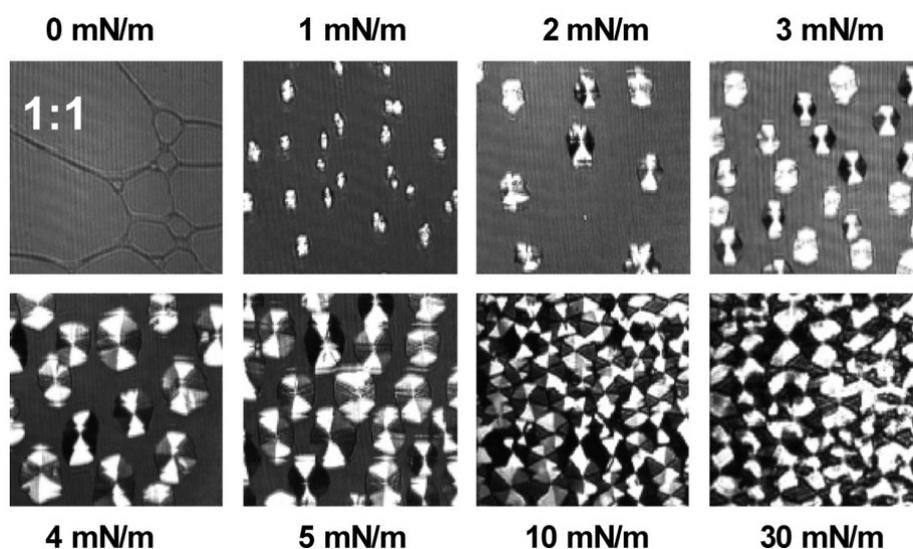


Figure 11 : Images de BAM de la monocouche mixte DMPA : bleue de méthylène (1 : 1 en mol) ⁶³.

Une étude récente réalisée sur une cyclodextrine amphiphile a permis d'avoir des images de la morphologie du film formé à l'interface air-eau. Pour cela, Klaus et son équipe⁶⁴ ont utilisé diverses techniques pour déterminer le type de réarrangement de leurs cyclodextrines amphiphiles (TBdSC) dont le BAM. La TBdSC est un β -CD disubstitué par des groupements cholestéryles avec le reste de ses fonctions hydroxyles méthylées. (Schéma 7)

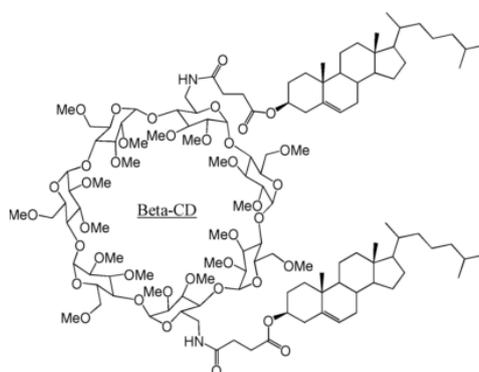


Schéma 7 : Structure de la TBdSC ⁶⁴

Les images en BAM ont permis de montrer la formation d'agrégats à l'interface air-eau à température ambiante. (Figure 12)

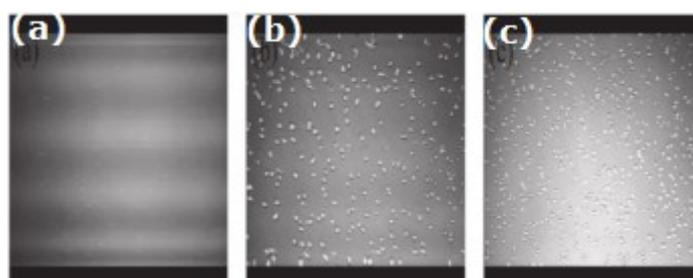


Figure 12 : Images en BAM de la monocouche de TBdSC à l'interface air-eau à 20°C⁶⁴

Il a été démontré que ces agrégats ne dépendent pas de la compression ou de l'augmentation de la pression de surface car ils sont visibles avant le début de la compression (Figure 12, [a]). Le nombre d'agrégats reste constant durant la compression et l'apparente augmentation en nombre sur les images est principalement due à la diminution de l'aire impliquant une augmentation de la concentration (Figure 12,[b et c]). Ces agrégats diminuent lorsque la température diminue et disparaissent en dessous de 15°C. De plus, la même chose est observée avec l'analogue monosubstitué alors qu'aucun agrégat n'est observé avec une monocouche pure de cholestérol. Cet effet de la température pourrait être relié avec le coefficient de solubilité inverse des cyclodextrines méthylées⁴⁰. Cependant, dans certains cas, les agrégats ne sont pas observés au-dessus de 20°C. Ceci peut être aussi expliqué par le fait que les monocouches de Langmuir sont dépendantes des conditions d'étalements, de la concentration ou du solvant^{65,66}.

ii La microscopie de fluorescence

Comme nous l'avons vu auparavant, les informations sur les changements de structure sont classiquement obtenues par mesure de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire⁴⁹. Les changements de pente des isothermes révèlent l'existence de transitions de phase mais ceci ne donne pas d'information visuelle du phénomène.

La microscopie de fluorescence peut apporter ces informations manquantes. Ceci en introduisant une sonde fluorescente, qui est uniquement, soluble dans les phases de lipides fluides qui vont permettre d'observer la transition de phase fluide-gel⁶⁷⁻⁶⁹ mais peut aussi être réalisé en greffant des sondes directement sur les lipides, par exemple.

Dans une étude réalisée par Ohler et son équipe⁷⁰ le comportement de la galactocérébositide non hydroxylée à l'interface air-eau a été étudié pour comprendre son rôle structural au sein des membranes biologiques. Les isothermes de compression obtenues ont montré des changements de pentes caractéristiques de transitions de phase. (Figure 13)

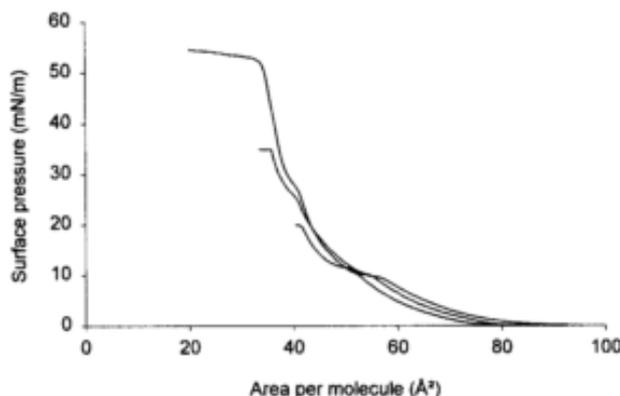


Figure 13 : Isotherme de NCer à 22°C. Les isothermes stoppées, à 20 et 35 mN/m, sont celles réalisées pour dépôt sur mica⁷⁰

Pour visualiser ces transitions de phase, ils ont utilisé la microscopie de fluorescence. Des images à différentes pression de surface (2 [A], 20 [B], 35 [C] et 55 mN/m [D]) ont été obtenues. (Figure 14)

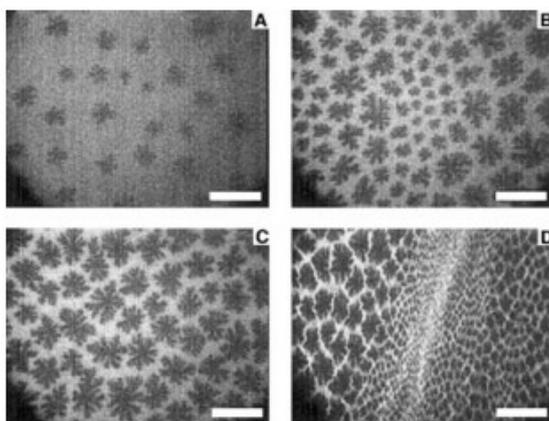


Figure 14 : Images de microscopie de fluorescence de NCer à 22°C⁷⁰

Les images montrent la formation de domaines à basse pression de surface (Figure 14, [A]). Ceci n'était pas visible sur les isothermes de compression (Figure 13). Les domaines formés sont de différentes tailles (Figure 14, [B]), leurs tailles vont augmenter avec la compression de la monocouche et non pas avec la pression de surface (Figure 14, [C]) et ils vont commencer à subir une déformation à haute pression pour ensuite voir le film s'effondrer dans la sous-phase de l'eau, avant même que les domaines aient fusionné (Figure 14, [D]). En couplant ces résultats avec la microscopie à force atomique (AFM), cela leur a permis de montrer que ces domaines ne sont pas formés comme lors de transition 2D conventionnelle mais qu'il s'agit plutôt de la formation de nanotube lipidique.

A l'inverse du BAM, la microscopie de fluorescence nécessite l'introduction d'une sonde fluorescente qui peut modifier le comportement des lipides à l'interface ou modifier les interactions lipides-agents exogènes.

b) Les techniques spectroscopiques

i *La spectroscopie UV-Visible*

L'analyse spectroscopique UV-visible *in situ* des monocouches de Langmuir est relativement aisée, ceci car l'eau n'absorbe pas dans cette zone spectrale et par conséquent, n'interfère pas avec l'analyse de la monocouche. Cependant, puisque la lumière de la source passe à travers un film dont l'épaisseur est à peu près égale à la longueur moléculaire avant d'atteindre le détecteur, la technique est peu sensible. Cela est résolu par la présence de chromophores, absorbant fortement tels que des groupements azoïques, dans la monocouche. L'analyse spectroscopique UV-Vis permet de suivre l'augmentation de la concentration à la surface de la monocouche de Langmuir lors de la compression, qui peut alors être comparée avec l'isotherme de compression π -A. L'augmentation de la réflexion provenant de l'interface air-eau à une incidence normale, due à la présence de la monocouche, peut être donnée par la formule suivante :

$$\Delta R = A \times (R_i)^{1/2} + \rho^2$$

Avec :

- ✚ Ri : réflectivité de l'eau pure
- ✚ ρ : réflectivité de la monocouche
- ✚ A : absorption de la monocouche

Pour un très faible nombre de molécules à l'interface, le spectre de réflexion correspond au spectre d'absorption, puisque la réflectivité de la monocouche est négligeable.

Dans la plupart des expériences, la comparaison du spectre UV-visible de la monocouche avec celui des mêmes molécules utilisées pour former la monocouche dissoutes dans un bon solvant, fournit des informations sur l'agrégation des molécules. Ariga et son équipe⁷¹ ont étudié la reconnaissance d'halogènes par des agrégats de « *N*-désordonné tetraphenylporphyrin » (NC-TPP) dans l'octadénoate de méthyle à l'interface air-eau. (Schéma 8)

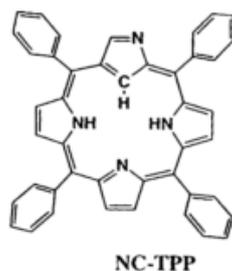


Schéma 8 : Structure de la NC-TPP

Pour cette étude, ils ont réalisé des isothermes de compression en mélangeant la NC-TPP avec octadécanoate de méthyle sur l'eau pure et des phases aqueuses de NaX (X = F, Cl, Br ou I). (Figure 15)

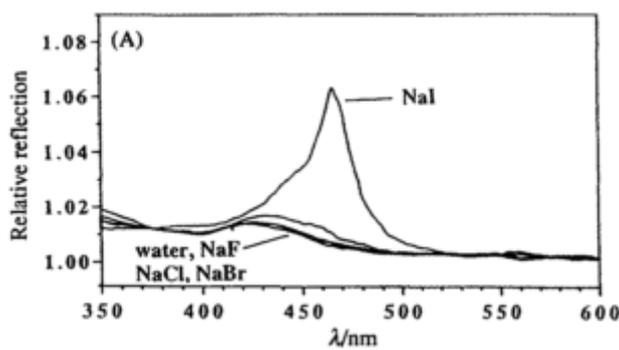


Figure 15 : Spectre de réflexion UV de la monocouche du mélange NC-TPP/octadécanoate de méthyle sur phase aqueuse de NaX et eau

Ils ont ainsi pu montrer que seule la phase aqueuse contenant des ions I^- générait un déplacement du spectre de réflexion UV. De plus, la bande de Soret, bande d'absorption caractéristique des porphyrines, montre un déplacement dans le rouge (465 nm) à l'interface d'une solution de NaI et un déplacement dans le bleu (425 nm) à l'interface de l'eau pure et des autres solutions (NaF, NaCl, NaBr) (Figure 15). Ils ont pu attribuer, à l'aide de méthodes complémentaires, que les déplacements dans le rouge et dans le bleu correspondent à deux types d'agrégations, agrégats de type H et de type J, respectivement. Les agrégats de type J correspondent à un alignement des dipôles sur une même ligne (orientation tête à queue) et les agrégats de type H correspondent à un arrangement parallèle des moments dipolaires. Donc, ils ont prouvé que l'anion I^- déclenchait l'agrégation de la porphyrine.

ii Les spectroscopies infra-rouge

La spectroscopie infrarouge (IR) a longtemps été utilisée pour la caractérisation de matériaux organiques/inorganiques, fournissant des informations sur les vibrations moléculaires. Elle est basée sur la vibration des molécules lorsque ces dernières sont soumises à un rayonnement infra-rouge à une fréquence précise. La détection des vibrations en IR est due à un changement du moment dipolaire sous une excitation vibrationnelle. La compression et l'extension de la liaison chimique qui connecte deux atomes peuvent être liées au comportement d'un ressort obéissant à la loi de Hooke. Par conséquent, pour une simple molécule diatomique, l'énergie de vibration est la suivante :

$$E_v = h\nu \times (v + 0,5)$$

Avec :

- ✚ h : constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg/s}$)
- ✚ ν : fréquence de la radiation
- ✚ v : nombre quantique vibrationnel

Il existe deux modes de vibrations principaux :

- ✚ l'élongation (symétrique et asymétrique)
- ✚ déformation dans le plan (balancement et cisaillement) et hors du plan (torsion et agitation)

Le problème majeur de la spectroscopie IR appliquée aux monocouches de Langmuir est l'extraction du très faible signal de la monocouche de la très forte absorption de la sous phase. Cela rend la spectroscopie infrarouge en mode de transmission difficilement utilisable. Le mode de réflexion est ainsi souvent préféré. Les principales techniques de spectroscopies infrarouges utilisées pour caractériser les monocouches de Langmuir sont :

- ✚ Spectroscopie InfraRouge à Réflexion Externe à Transformé de Fourier (ER-FTIR)
- ✚ Spectroscopie InfraRouge d'Absorption de Réflexion Interne (IRRAS)
- ✚ Spectroscopie InfraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS)

Récemment, l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à réflectance spéculaire a permis de caractériser l'orientation des molécules d'un complexe amphiphile de ruthénium bipyridine contenant des longues chaînes azopyridine par rapport au substrat⁷². (Figure 16)

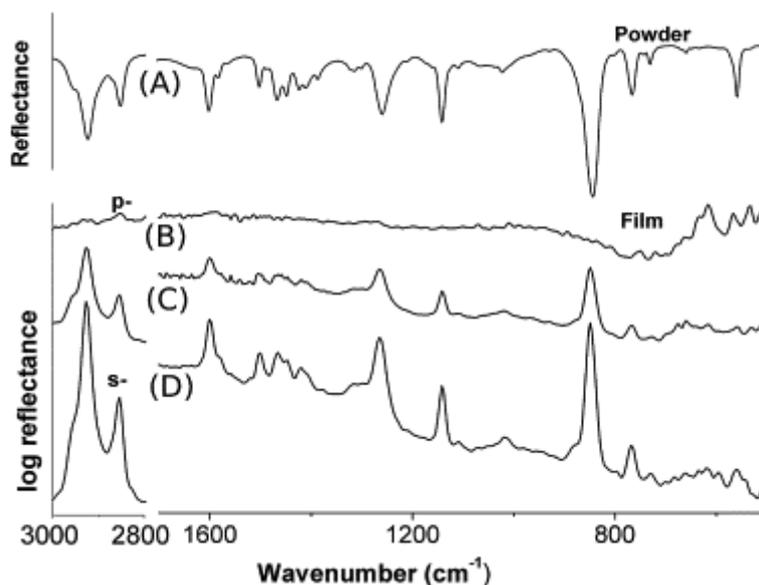


Figure 16 : Spectre FTIR du complexe $[Ru(bipy)_2CIL]PF_6$ ($bipy = 2,2'$ -bipyridine)(R1)⁷²

Différents spectres FTIR ont pu être réalisés en utilisant une réflexion diffuse pour la poudre (Figure 16, [A]) et une réflexion spéculaire (l'énergie du rayon incident se retrouve totalement dans le rayon réfléchi) du film à un angle d'incidence de 80° (Figure 16, [B-D]). Le spectre FTIR enregistré en l'absence de radiation polarisée (Figure 16, [C]) présente les mêmes pics que le spectre du complexe R1 sous forme de poudre, hormis des petits déplacements observés dans le cas des bandes ν (C-H) et δ (C-H). Le spectre IR de réflexion spéculaire du film du complexe révèle une orientation opposée de ces ligands comparée au film de ligand seul. Effectivement, il a été observé que la monocouche du ligand seul a un spectre plus intense en utilisant une polarisation parallèle (p) qu'une polarisation perpendiculaire (s)⁷³, alors que c'est l'inverse avec le complexe R1 (Figure 16, [B et D]). Le ligand libre interagit avec la surface via les groupes pyridines pour donner une configuration redressée et la molécule répète cette orientation avec la poursuite des dépôts. Dans le cas de film de multicouches du complexe R1, les ligands bipyridines hydrophobes ont encerclé le centre ruthenium chargé positivement et il est donc probable qu'il interagisse *via* le centre bipyridine ruthenium, ce qui minimise la distance qui les sépare. Par conséquent, les ligands azopyridines doivent avoir basculé, approchant une orientation perpendiculaire. L'intensification du spectre de polarisation (s), lors de dépôts successives, est due à une même orientation du complexe R1.

iii Diffraction des rayons X à l'angle rasant (GIXD)

GIXD est l'une des seules méthodes permettant l'étude de l'ordre moléculaire en 2D dans des films moléculaires à l'interface air-eau. Elle n'est pas seulement la méthode de choix pour la détermination de l'organisation moléculaire, elle permet aussi de déterminer l'orientation des molécules par rapport à l'interface (l'inclinaison et sa direction). Cette étude nécessite de placer le puits de Langmuir sous atmosphère d'hélium avec des vitres transparentes aux rayons X. Le faisceau monochromatique de rayons X est ajusté pour frapper la surface du liquide à un angle d'incidence légèrement inférieur à l'angle critique de réflexion totale pour produire une onde évanescente, qui est propagée le long de la surface et peut être diffractée par les structures latérales dans la monocouche. L'intensité diffractée peut être enregistrée par un détecteur sensible à la position linéaire (PSD) en fonction de l'angle de diffusion verticale α_f et de l'angle de diffusion horizontal $2\theta_{xy}$. Le vecteur de diffusion Q est écrit en termes d'une composante dans le plan Q_{xy} dépendant de l'angle de diffusion horizontal $2\theta_{xy}$ et d'une composante en dehors du plan Q_z dépendant de l'angle de diffusion vertical α_f . De manière analogue aux systèmes 3D, les pics de Bragg sont indexés par les indices de Miller h et k . Les distances des plans réticulaires sont données par :

$$d_{hk} = \frac{2\pi}{Q_{xy}^{hk}}$$

Avec :

 d_{hk} : distance des plans réticulaires

 Q_{xy}^{hk} : vecteur de diffusion

A partir de la position des pics dans le plan et en dehors du plan dérivent les informations concernant l'angle d'inclinaison et la direction de l'inclinaison^{74,75}.

Grâce à cette technique Lepère et son équipe ont étudié les propriétés interfaciales d'auto-assemblages d'un peptide⁷⁶. En effet, des études précédemment menées ont montré que ce peptide, le LSFD, formait des fibres de type amyloïde, non ramifiées en vrac, avec une structure de base en coupe β des feuilletts auto-assemblés⁷⁷. Les mesures de GIXD ont été réalisées tout au long de la compression à l'interface d'une sous phase acide. (Figure 17)

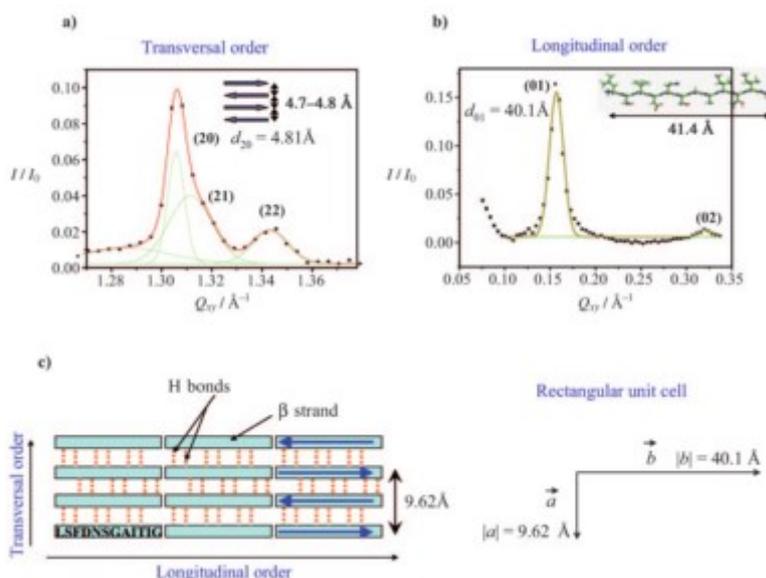


Figure 17 : Pics de Bragg observés à l'interface air-eau de la monocouche de LSFD à $\pi = 6,3 \text{ mN/m}$ ⁷⁶

Pour indexer ces pics, une maille élémentaire rectangulaire a été utilisée avec les paramètres a et b , en sachant que cette maille élémentaire comprend deux molécules. Le paramètre a exprime le feuillet β anti parallèle ordonnant le peptide LSFD à l'interface (Figure 17). Le pic (20), par conséquent, correspond à la répétition d'une distance de $4,81 \text{ \AA}$ qui est la distance interbrin typique définie par le réseau de liaisons hydrogènes dans un feuillet de conformation β (Figure 17, [a ; c]). L'intensité et la position de ce pic ne varie pas durant la compression. D'autres séries de pics à de plus petits Q_{xy} sont associées au peptide correspondant au squelette peptidique avec une répétition de la distance $b = 40,1 \text{ \AA}$ (Figure 17, [b]), ce qui correspond bien à la longueur du peptide en configuration complètement dépliée. Les pics longitudinaux, (01) et (02), présentent une composante hors duplan. Ceci a permis de déterminer l'épaisseur de la monocouche qui est en accord avec l'épaisseur d'une monocouche d'un feuillet β et l'épaisseur déterminée par AFM.

iv Réflectivité des neutrons et des rayons X

Ces deux techniques sont utilisées pour obtenir des informations concernant la nanostructure dans les films de Langmuir⁷⁸. Le principe de base de ces méthodes est de mesurer l'intensité réfléchie à partir d'un faisceau collimaté (rayons parallèles) de longueur d'onde λ , mis sur l'interface à un angle de Bragg θ . La variation de réflectivité avec $\sin \frac{\theta}{\lambda}$ dépend du profil de densité sur la dispersion, perpendiculaire à la surface. La densité de longueur de diffusion est

la somme de la longueur de diffusion d'un atome multiplié par sa densité en nombre. Ainsi, pour les rayons X la longueur de diffusion d'un atome dépend de la longueur de diffusion d'un électron, tandis que pour les neutrons elle dépend de la longueur de diffusion de ses noyaux.

Un changement de l'épaisseur d'une monocouche de Langmuir de l'ordre de 2 Å peut être détecté en utilisant des générateurs de rayons X même classiques avec une réflectivité en dessous de 10^{-8} , avec une haute résolution due à la haute puissance du générateur et une haute performance du système de collimation.

Le problème du peu de contraste qui existe entre l'hydrocarbure et la sous phase en réflectivité des rayons X est atténué en réflectivité des neutrons où des amphiphiles deutérés sont normalement utilisés. En effet, la longueur de diffusion des neutrons d'hydrogène est considérablement différente de celle du deutérium.

Ces deux techniques ont été utilisées par Bauer et son équipe⁷⁹. Ils ont réalisés la description complète du comportement de cyclodextrines amphiphiles (CDs) à l'interface air-eau en utilisant l' α -CD perméthylée monocholestéryle (TASC) et la β -CD perméthylée mono et dicholestéryle (TBSC et TBdSC). Leurs isothermes de compression ont suggéré une réorganisation au cours de la compression qui a donc été caractérisée en utilisant la réflectivité des neutrons et des rayons X. Ces techniques ont aussi permis de déterminer le nombre moyen de molécules d'eau par CD ainsi que le volume moléculaire des CDs.

Dans un premier temps, les mesures de réflectivité ont été menées pour déterminer l'épaisseur du film et le profil de densité pour élucider la nature du pseudo-plateau observé sur les isothermes. Les courbes de réflectivité ont clairement montré que pour les trois CDs modifiées, un minimum apparaît avec l'augmentation de la pression de surface qui est lié à un changement structurel dans le film. En commençant à une pression de surface autour du pseudo-plateau, la courbe de diffusion diminue considérablement. Ce comportement est encore plus prononcé pour la TBSC. Les mesures par rayons X, en deux points de la courbe, en dessous et au-dessus du pseudo-plateau ont montré une similarité avec les résultats de réflectivité des neutrons. Les données obtenues par diffusion des neutrons et des rayons X sont traitées en utilisant un modèle de boîte à deux couches⁷⁹. Ces études ont pu montrer que ces composés forment un film stable à l'interface air-eau avec une similitude des isothermes entre la TASC et la TBdSC, à la différence que le pseudo plateau de la TASC est déplacé à des pressions de surface plus petites du fait que l' α -CD est plus petite que la β -CD. Il a été montré

que la partie CD subit un changement de conformation durant la compression. Ainsi à la transition de phase, la partie CD se réarrange en passant d'un alignement de sa cavité perpendiculaire par rapport à la surface à un alignement parallèle. (Figure 18)

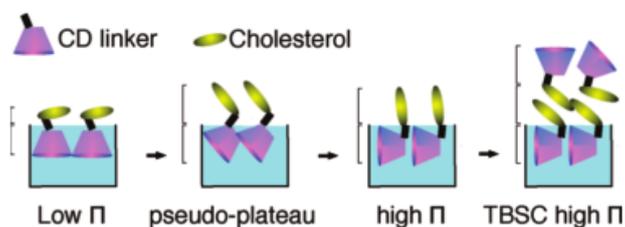


Figure 18 : Changement de conformation de la CD à l'interface

En première approche, les monocouches lipidiques sont un très bon modèle car on peut caractériser très aisément la capacité membranotrope d'un composé. De plus, il est possible de former des monocouches avec tous les types de lipides. Ceci permet d'étudier la spécificité lipidique de l'interaction d'un composé avec la membrane. Cependant, en ne mimant qu'un seul des deux feuillet lipidiques d'une membrane biologique, ce système membranaire peut se révéler parfois trop simple et pas assez biomimétique. Il convient donc de ne pas limiter les études sur modèles membranaires à ce seul type de modèle mais il faut également utiliser les vésicules ou liposomes qui constituent un modèle membranaire en trois dimensions très intéressant.

3) Les liposomes

Les liposomes ont été produits pour la première fois en 1965 par Bangham⁸⁰. Ce sont des vésicules sphériques synthétiques résultant d'effet hydrophobe lorsque des molécules amphiphiles, généralement des phospholipides, sont mises dans un environnement aqueux. De ce fait, ils s'organisent en deux feuillet lipidiques mimant ainsi les deux feuillet lipidiques des membranes et ils renferment un compartiment aqueux en leur sein. Ce sont des modèles synthétiques possédant des propriétés biophysiques proches de celles des cellules. Selon le mode de préparation utilisé, différentes tailles peuvent être obtenues. La taille minimale est d'environ 20 nm, qui est principalement déterminée par le très fort « packing » des lipides dû à une géométrie fortement incurvée. Pour obtenir des liposomes de petites tailles, un transfert d'énergie important aux membranes est nécessaire, ils seront ainsi produits soit par extrusion soit par sonication. Les plus grands liposomes peuvent avoir une taille au-delà de plusieurs microns. Le rayon de courbure a une grande importance, il peut entraîner des gênes dans

l'interaction membrane / molécule si celui est trop petit et rendre les liposomes instables si celui-ci est trop important.

a) Méthodes de préparation

Le caractère amphiphile des phospholipides va permettre d'obtenir des autoassemblages en phase aqueuse, comme par exemple, par la méthode d'hydratation du film sec. Pour ceci, un film sec de phospholipides, obtenu par évaporation du solvant organique dans lequel il était solubilisé, est hydraté par une solution aqueuse d'eau pure ou une solution tampon. La formation des liposomes est dépendante de la température et de la nature du lipide utilisée. En effet, ils ne se forment qu'à une température supérieure à leur température de transition de phase. Une agitation peut être souhaitable pour améliorer leur formation. L'auto-assemblage obtenu résulte d'une auto-organisation des molécules pour atteindre une configuration thermodynamique plus favorable. De ce fait, les têtes polaires vont s'orienter au contact du milieu aqueux (vers l'extérieur) alors que les chaînes carbonées vont se regrouper pour former un espace hydrophobe (vers l'intérieur).

Le concept de forme introduit par Cullis et De Kruijff explique que l'organisation d'un lipide en solution aqueuse est déterminée par le volume occupé par la tête polaire par rapport aux chaînes aliphatiques⁸¹. (Figure 19)

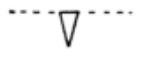
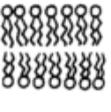
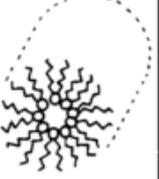
Lipid	Phase	Molecular Shape
Lysophospholipids Detergents	 Micellar	 Inverted Cone
Phosphatidylcholine Sphingomyelin Phosphatidylserine Phosphatidylglycerol	 Bilayer	 Cylindrical
Phosphatidylethanol- amine (unsaturated) Cardiolipin - Ca ²⁺ Phosphatidic acid - Ca ²⁺	 Hexagonal (H _{II})	 Cone

Figure 19 : Phases polymorphiques et formes moléculaires dynamiques correspondantes aux différents composants lipidiques ⁸¹

Par conséquent, pour la formation de liposome il vaut mieux utiliser majoritairement un lipide de type conique tronqué comme la phosphatidylcholine (PC).

Différents types de liposomes, avec des tailles et des structures internes, peuvent être obtenus selon le mode de préparation : (Figure 20)

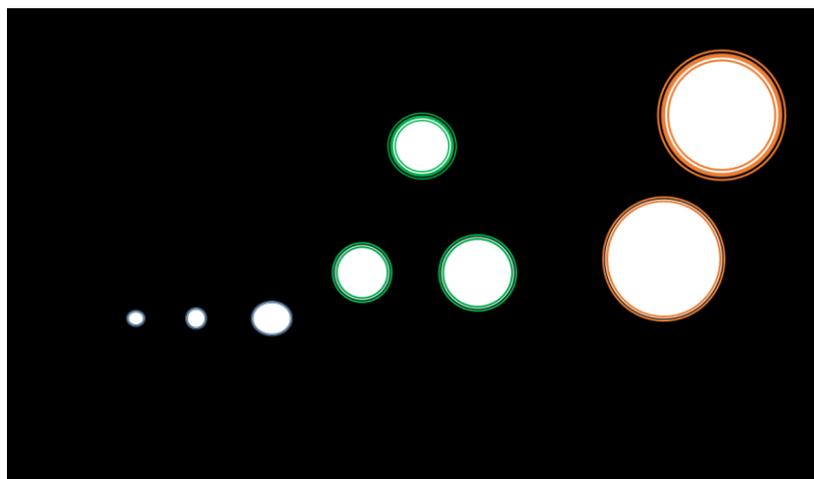


Figure 20 : Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille (d'après ⁸⁰)

Les « **MultiLamellar Vesicles** » (MLVs) sont des liposomes multilamellaires, de tailles hétérogènes, constitués de bicouches lipidiques concentriques et séparées, les unes des autres, par des couches d'eau. Un traitement physique de ces MLVs va permettre d'obtenir des liposomes de taille homogène, constitués d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux (ULVs).

Les « **UniLamellar Vesicles** » (ULVs) sont des liposomes unilamellaires comportant un double feuillet lipidique, qui peuvent être obtenus, par hydratation du film sec de phospholipides suivie de traitements physiques, conduisant à différentes tailles : (Figure 20)

- ✚ **Small UniLamellar Vesicles (SUVs)** : liposomes d'une taille inférieure à 200 nm, obtenus généralement par application d'ultrasons aux MLVs
- ✚ **Large UniLamellar Vesicles (LUVs)** : liposomes d'une taille comprise entre 100 nm et 1 μm , peuvent être obtenue par extrusion ou encore par des cycles de congélation/décongélation
- ✚ **Giant UniLamellar Vesicles (GUVs)** : liposomes d'une taille supérieure à 1 μm .

Les liposomes peuvent être aussi préparés par la technique de l'inversion⁸² ou par dialyse de micelles mixtes détergents/phospholipides⁸³.

Hormis leur rôle de transporteurs de médicaments, les liposomes sont également très utilisés dans l'étude des propriétés membranaires.

b) Utilisation des liposomes comme modèles membranaires

En effet, comme expliqué précédemment, les liposomes servent de mimes de la structure et des propriétés des membranes biologiques. La grande capacité de modulation des conditions expérimentales de ces édifices va permettre de mettre en évidence l'influence de certains facteurs, tels que l'effet de la composition lipidique, la force ionique⁸⁴, la température⁸⁵ et le pH du milieu⁸⁵ sur les propriétés membranaires.

Malgré le large éventail de techniques développées pour acquérir des informations concernant la perméabilité, la fluidité ou encore l'organisation des vésicules, il faut rester vigilant avant d'extrapoler les résultats obtenus avec des liposomes, aux membranes biologiques. En effet, les liposomes ne miment pas parfaitement la complexité des membranes biologiques tant au niveau de leur composition (les membranes naturelles sont composées de très nombreux lipides mais également et surtout de diverses protéines) que de la distribution des composants

dans les membranes (pas d'asymétrie dans les membranes des vésicules, présence des rafts...). Ainsi, la composition lipidique des liposomes peut assez bien correspondre à celle des membranes biologiques, mise à part que certains éléments sont difficiles à prendre en compte comme la présence de certains lipides et glycolipides ou la variabilité des chaînes aliphatiques dans les membranes biologiques. En plus de cela, les liposomes sont préparés dans une solution tampon à pH et contenu ionique bien déterminés donc homogènes alors que les membranes biologiques sont entourées de milieux complexes et différents de part et d'autre. Malgré tout, les liposomes sont de bons modèles pour étudier divers processus qui se déroulent au niveau membranaire tels que la fusion⁸⁶.

i Mesure de la fusion membranaire

La fusion membranaire est un mécanisme biologique indispensable à la vie. Elle intervient dans divers processus, tels que la division cellulaire, la fécondation (fusion de deux cellules), l'endocytose et l'exocytose. Ce mécanisme passe par plusieurs étapes dont le rapprochement, la coalescence de deux feuillet lipidiques suivie d'une réorganisation structurale de ces bicouches. Cette fusion induit donc un mélange des lipides et des milieux aqueux. Pour les procédés intracellulaires qui participent à la fusion, un travail convergent en biochimie, en toxicologie et en génétique a confirmé l'importance d'un ensemble de protéines qui peuvent inclure le complexe « *N*-ethylmaleimide sensitive fusion protein » (NSF), protéines solubles de fixation NSF (α , β , γ -SNAPs). Une possible voie conduisant à la fusion membranaire a été proposée par Zimmerberg et Chernomordik⁸⁷ et résumée avec le Schéma 9 : Voie de fusion de bicouches de phospholipides⁸⁷. L'hypothèse stalk-pore suggère qu'une fluctuation thermique en dehors du plan conduit à un contact très serré et localisé entre les membranes. L'augmentation de la répulsion d'hydratation avec la tension de la monocouche conduit à une rupture locale de la mise en contact avec la formation de monocouches transitoires de très petites parcelles hydrophobes adjacentes. Un bon nombre de facteurs peuvent faciliter la formation de telles parcelles hydrophobes. Ce sont elles qui vont former un « stalk » (Schéma 9, *stalk*). L'expansion du « stalk » peut conduire, en premier, à des contacts permettant le mélange des phospholipides du feuillet externe (Schéma 9, *local hemifusion*), et en second, au développement d'une structure d'hémifusion avancée (Schéma 8, *extended hemifusion*). La formation d'un pore de lipides au sein de l'un des états d'hémifusion constituerait le pore de fusion initial (Schéma 9, *initial fusion pore*) dont l'expansion complète de la fusion se ferait avec la formation d'un pore de fusion coplanaire (Schéma 9, *semi stable fusion pore*). Une

voie alternative est la fusion des pores lipidiques apparaissant dans chacune des deux bicouches de fusion. Les pores sur les différentes bicouches vont ensuite coalescer pour former un seul pore de fusion qui sera plus tard élargi pour obtenir la fusion. Par opposition à l'hypothèse de « stalk-pore », la fusion par ce mécanisme hypothétique devrait être accompagnée par une fuite du contenu que les bicouches de lipides renferme⁸⁷.

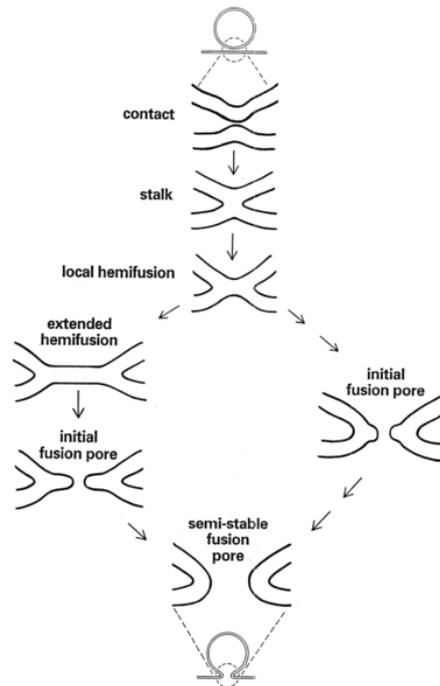


Schéma 9 : Voie de fusion de bicouches de phospholipides⁸⁷

D'autres travaux ont été réalisés et ceci a fait l'objet d'une revue par Chernomordik et Kozlov⁸⁸, ils décrivent deux voies de fusion : la voie de fusion directe et fusion par hémifusion. (Schéma 10)

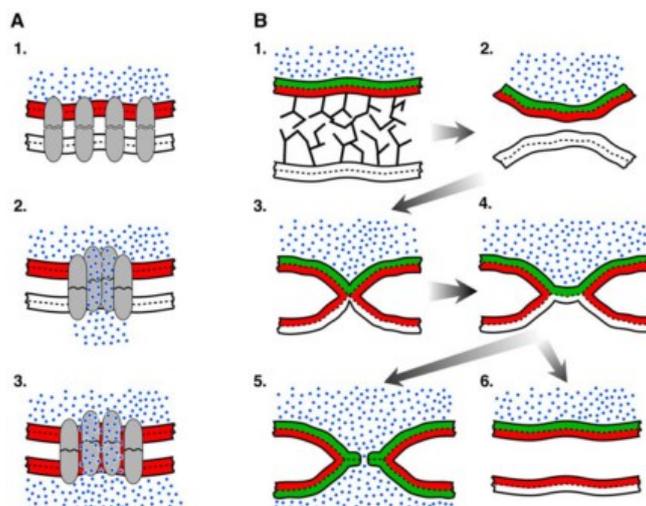


Schéma 10 : Voie de fusion : [A] voie direct, [B] par hémifusion⁸⁸

Pour illustrer les caractéristiques des différents états de fusion, les feuillet de la membrane du haut sont marqués par des sondes colorées. Une sonde bleue soluble dans l'eau étiquette le volume aqueux entouré par la membrane.

La détection expérimentale de la fusion peut être réalisée par mélange de lipides. Cette technique consiste au suivi du transfert d'énergie de résonance entre deux sondes fluorescentes⁸⁹ (FRET). Ceci est réalisé en utilisant un couple de donneur et accepteur comme le couple, le plus souvent utilisé, N[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]/ N[lissamine rhodamine B sulfonyle] (NBD/Rh) qui sont des dérivés fluorescents de la phosphatidylcholine et qui sont notés NBD-PE et Rh-PE (Schéma 11). La sonde fluorescente peut être attachée à la partie polaire ou à une chaîne hydrocarbonée. Le Schéma 11 illustre la fixation des sondes fluorescentes sur la tête polaire.

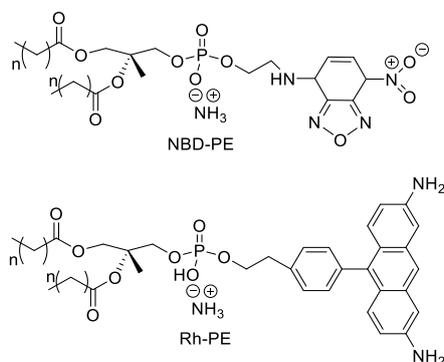


Schéma 11 : Structure de la NBD-PE (en haut) et de la Rh-PE (en bas)

Le donneur dans ce couple est le NBD ($\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 535 \text{ nm}$) et l'accepteur est Rh ($\lambda_{\text{ex}} = 563 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ém}} = 585 \text{ nm}$). Le principe du transfert d'énergie par résonance est le suivant : (Figure 21)

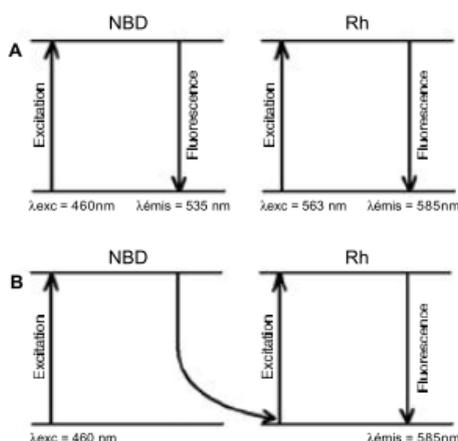


Figure 21 : Principe du transfert d'énergie par résonance appliqué au couple NBD/Rh⁹⁰

La sonde fluorescente NBD est excitée à 460 nm et retourne à l'état fondamental en émettant à 535 nm et le Rh doit être excité à 563 nm pour mesurer sa fluorescence (Figure 21, [A]). L'énergie libérée par l'excitation de NBD ne permet pas d'exciter le Rh à une distance de plus de 2 nm. Le Rh va être capable d'absorber l'énergie de fluorescence du NBD, lors du retour à l'état fondamental, à courte distance. Il s'agit donc d'un transfert d'énergie par résonance en excitant le donneur, on observe la fluorescence du receveur et cela nécessite le recouvrement entre le spectre d'émission du donneur (fluorescence) et le spectre d'excitation de l'accepteur (absorption) (Figure 21, [B]). Deux modes opératoires peuvent être mis en place pour réaliser cette étude.

Le premier consiste à insérer les deux dérivés lipidiques dans des liposomes différents et à ce moment-là aucun transfert d'énergie n'est possible avant la fusion, du fait de l'éloignement des sondes entre elles. Par conséquent, s'il y a fusion entre ces deux vésicules alors l'excitation du NBD à 460 nm va permettre d'exciter le Rh qui va émettre à 585 nm. (Schéma 12)

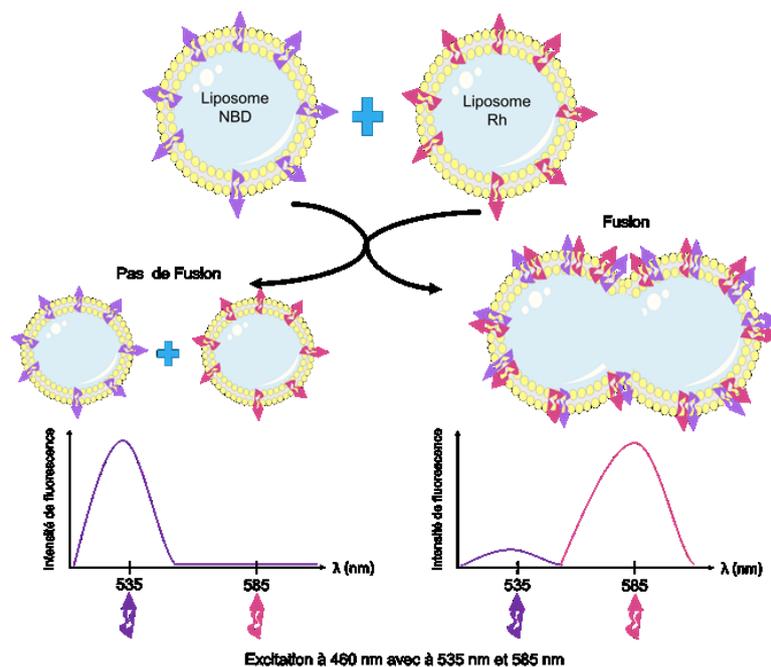


Schéma 12 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes fluorescentes dans deux liposomes différents

Cette technique ne permet pas de faire la différence entre l'agrégation et la fusion car l'agrégation s'accompagne aussi d'un rapprochement des deux sondes. Pour cela, une autre méthode a été développée ; des liposomes sont préparés en ajoutant les deux sondes

fluorescentes dans les mêmes liposomes puis ces liposomes fluorescents sont ensuite mélangés avec des vésicules dénuées de sondes. (Schéma 13)

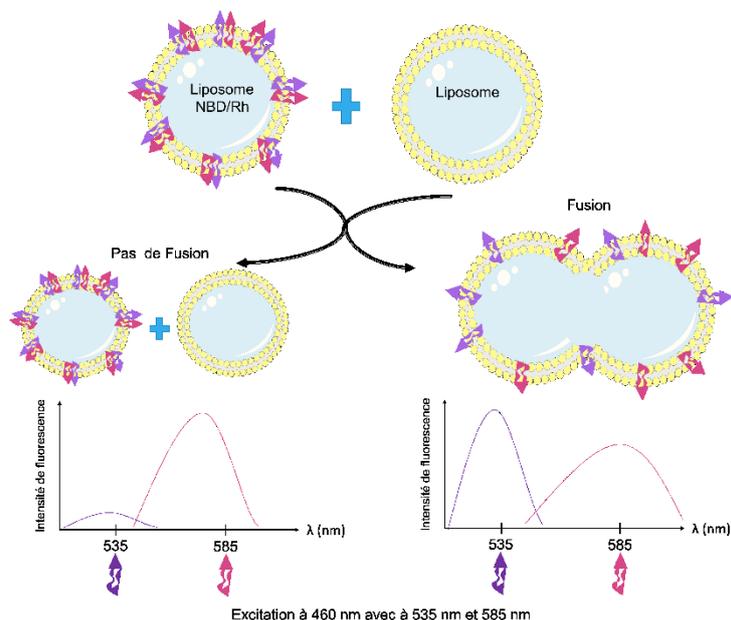


Schéma 13 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes fluorescentes insérées dans le même liposome

Le rapprochement du liposome fluorescent avec celui ne contenant pas de sonde fluorescente (cas de l'agrégation) ne conduit pas à une variation du transfert d'énergie. Dans ce cas, seule la fusion va conduire à une augmentation de la distance entre les sondes fluorescentes qui implique une diminution du transfert d'énergie. Toujours en utilisant une excitation à 460 nm, lors de la fusion la fluorescence du Rh (535 nm) diminue alors que celle du NBD (585 nm) augmente (Schéma 13).

Une autre technique peut être utilisée en insérant un dérivé d'acide gras fluorescent, l'octadécylrhodamine B (R18), dans la membrane de liposomes⁹¹⁻⁹³. (Schéma 14)

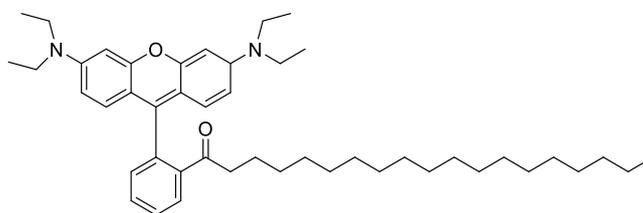


Schéma 14 : Structure de l'octadécylrhodamine (R18)

Cette technique est basée sur l'auto-extinction de la sonde fluorescente à fortes concentrations. Lors de la fusion avec des liposomes dénués de sondes fluorescentes, le R18 va être dilué et une augmentation de sa fluorescence sera observée. (Schéma 15)

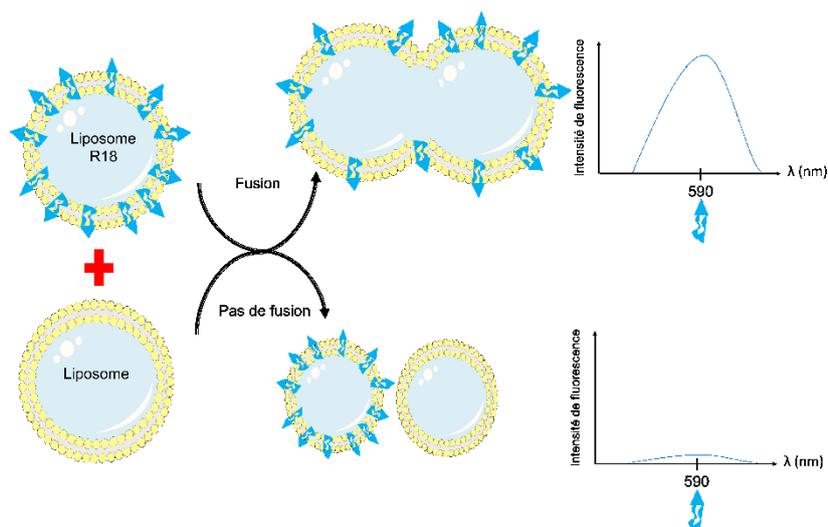


Schéma 15 : Schéma représentatif de l'analyse de la fusion par la méthode d'inhibition de fluorescence

Cette technique permet de différencier l'agrégation de la fusion comme cela a été montré par l'équipe de Mingeot-Leclercq⁹⁴. Effectivement, si l'augmentation de la fluorescence est rapide lors de l'ajout du liposome dénué de sonde fluorescente alors ceci traduit de la fusion. Par contre, si l'augmentation de la fluorescence est lente alors ceci traduit de l'agrégation⁹⁴. Pour plus d'informations sur l'utilisation des liposomes dans la compréhension du mécanisme de fusion se référer à la revue suivante⁹⁰.

ii Etude de l'ordre lipidique

Cette approche va permettre d'étudier l'état de fluidité membranaire de différentes compositions lipidiques en y ajoutant deux sondes fluorescentes, le Laurdan et le Prodan. Ces deux dérivés du naphthalène sont sensibles à la polarité du milieu et vont donc émettre à différentes longueurs d'ondes selon l'hydratation du milieu dans lequel ils se trouvent. Le Laurdan est le 2-diméthylamino-6-lauroylnaphthalène et le Prodan est le 2-diméthylamino-6-propionylnaphthalène. (Schéma 16)

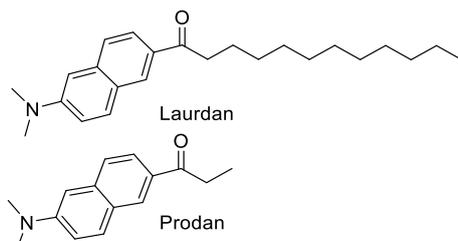


Schéma 16 : Structure du Laurdan et du Prodan

Ils ont d'abord été conçu et synthétisé par Gregorio Weber⁹⁵ pour étudier le phénomène de relaxation dipolaire. Leurs synthèses ont permis de remplacer les composés déjà existants car ces derniers interagissaient avec des composants des membranes lipidiques. La partie fluorescente naphthalène de ces sondes possède un moment dipolaire dû à une séparation de la charge partielle entre le 2-diméthylamino et le 6-carbonyl (Schéma 16). Ce moment dipolaire augmente lors de l'excitation et peut provoquer une réorientation des dipôles du solvant environnant. L'énergie nécessaire à la réorientation du solvant diminue l'énergie de l'état excité de la sonde ce qui induit un décalage vers le rouge du spectre d'émission de la sonde. Un décalage vers le bleu est observé lorsque le solvant environnant est apolaire. Voici un diagramme schématique du processus de relaxation. (Schéma 17)

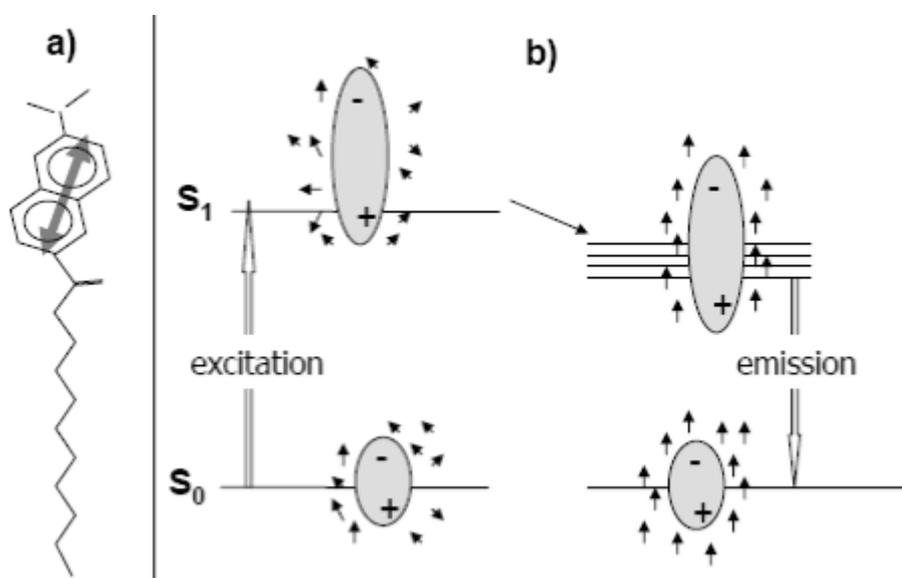


Schéma 17 : Moment dipolaire du Laurdan (a, flèche grise) créé par la séparation de charge partielle entre le 2-diméthylamino et le 6-carbonyle. (b) Diagramme montrant le changement de moment dipolaire du Laurdan.

Cette relaxation dipolaire est également observée dans des bicouches de phospholipides. Le Laurdan et le Prodan possèdent deux longueurs d'onde maximales d'émission selon l'état dans laquelle se trouve la membrane. Ils sont excités à 360 nm, le Laurdan a donc ses bandes d'émission à 435 nm et 490 nm et le Prodan à 440 nm et 490 nm respectivement bleu en phase gel (\approx 440 nm) et vert dans la phase liquide cristalline (\approx 490 nm). Ce déplacement spectral est attribué à la relaxation dipolaire du Laurdan dans un environnement lipidique qui provient de la présence de quelques molécules d'eau au sein de la bicouche au niveau du glycérol où réside la partie naphthalène du Laurdan. La concentration et la dynamique de ces molécules d'eau dépend de l'état de phase des lipides environnants. Ainsi, ce phénomène de réorientation des molécules d'eau ne peut se produire qu'en phase liquide cristalline.

Le Laurdan, de par sa structure, contenant une chaîne aliphatique de 12 carbones, va s'insérer dans les bicouches lipidiques permettant son ancrage homogène dans les membranes en phase gel ou fluide. Ces propriétés de fluorescence et d'ancrage profond vont permettre d'étudier la fluidité membranaire au niveau des chaînes aliphatiques. A l'inverse, le Prodan, de par sa courte chaîne hydrocarbonée, va permettre d'étudier la fluidité membranaire au niveau des têtes polaires. (Figure 22)

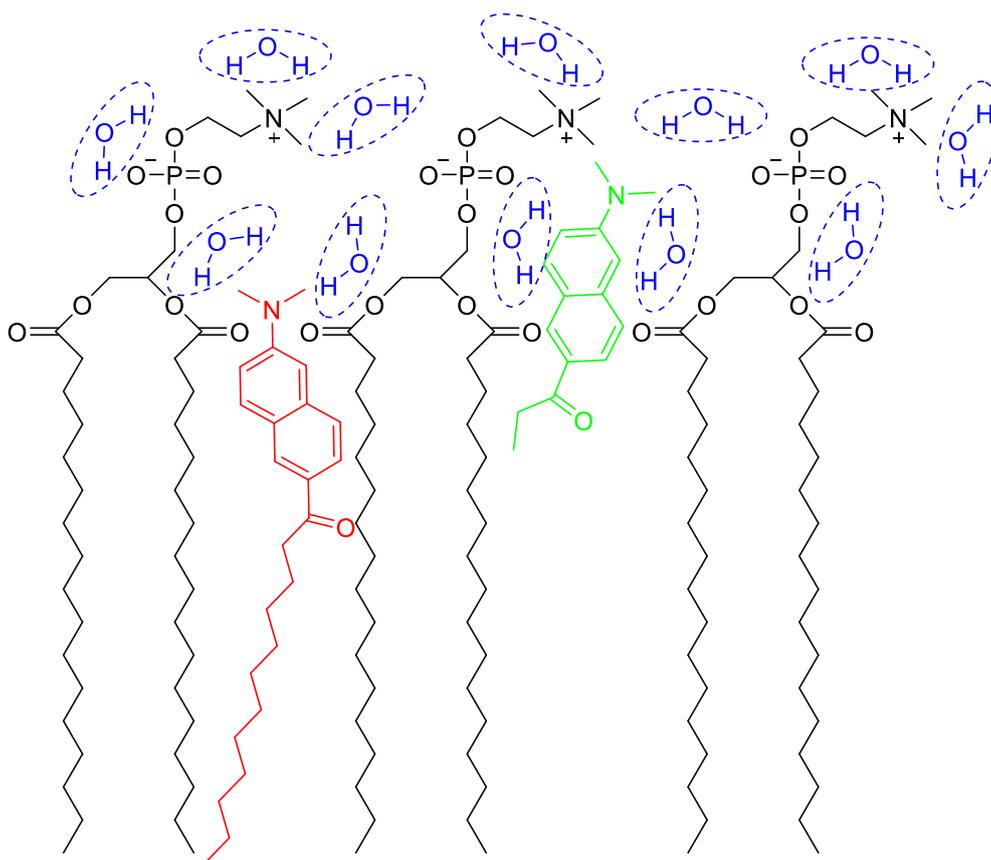


Figure 22 : Représentation de l'insertion du Laurdan (■) et du Prodan (■) au sein d'une bicouche lipidique de DPPC

C'est à partir des différentes bandes observées pour ces sondes fluorescentes que Parasassi et son équipe⁹⁶ ont défini un paramètre, la polarisation généralisée (GP) dont voici la formule :

$$GP_{Laurdan} = \frac{(I_{435} - I_{490})}{(I_{435} + I_{490})}; GP_{Prodan} = \frac{(I_{440} - I_{480})}{(I_{440} + I_{480})}$$

Avec :

■ I₄₃₅ et I₄₄₀ : Intensité de fluorescence dans le rouge

■ I₄₉₀ et I₄₈₀ : Intensité de fluorescence dans le bleu

Le solvant polaire utilisé pour former les liposomes est bien entendu l'eau et l'accès des molécules d'eau au Laurdan et au Prodan est limité lorsque les lipides sont en phase gel qui est un état ordonné. Ceci va induire une forte valeur du GP. Par contre, les molécules d'eau pénètrent plus aisément dans la bicouche lorsque les lipides sont en phase fluide qui est un état désordonné. Ceci va entraîner une diminution du GP.

Cette technique permet donc d'étudier l'effet de différentes molécules sur l'ordre lipidique, par exemple l'étude de l'influence des polyphénols⁹⁷, de molécules d'intérêt pharmacologique tel qu'un antipaludique la cyclosporine A⁹⁸, de dérivés de dimères d'acides biliairesphospholipidiques⁹⁹...

D'autres caractérisations plus fines vont pouvoir être réalisées en élaborant des bicouches planes et vont permettre aussi de caractériser de potentielles modifications induites par l'ajout d'agents exogènes.

4) Les bicouches lipidiques supportées

Les Bicouches Lipidiques Supportées (SLBs : « Supported Lipid Bilayers ») sont des bicouches planes mimant les deux feuillettes des membranes biologiques formées sur un support hydrophile. Le support solide permet l'utilisation de techniques d'analyse de surface spécifique. Afin de soutenir une membrane de haute qualité (petite ou sans défaut et une grande mobilité des lipides) la surface doit être hydrophile, lisse et propre. Les meilleurs supports sont la silice fondue, le verre de borosilicate, le mica et le silicium oxydé¹⁰⁰.

Les SLBs permettent l'étude des processus biologiques qui se produisent au niveau cellulaire, ils fournissent des informations sur les interactions ligand-récepteur¹⁰¹, les attaques virales¹⁰² et les manifestations de signalisation cellulaire¹⁰³. Dans les années 80, Tamm et McConnell¹⁰⁴ ont déposé des lipides membranaires directement sur un support solide.

Il existe trois méthodes générales pour la formation des SLBs sur un support plan. Ces trois méthodes sont ainsi développées dans les paragraphes suivants.

a) Méthode de transfert Langmuir-Blodgett

La première méthode implique le transfert d'un feuillet inférieur de lipides à partir d'une monocouche à l'interface air-eau par la technique Langmuir-Blodgett (Figure 23).

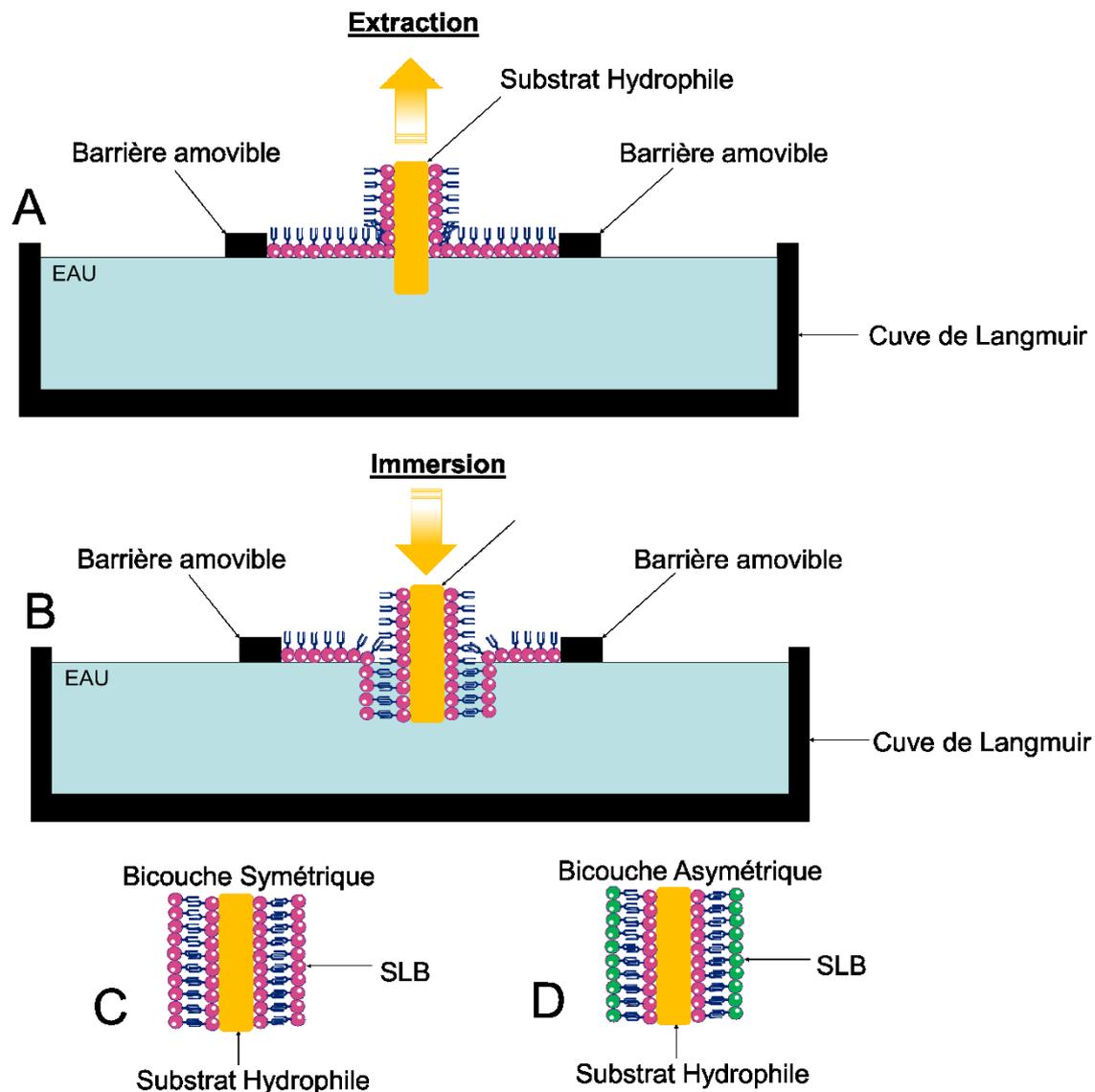


Figure 23 : Représentation de la technique de transfert de monocouche Langmuir-Blodgett

Elle consiste en la formation d'une monocouche à l'interface air-eau avec un substrat immergé dans la phase aqueuse (Figure 23, [A]). Ensuite, il suffit d'immerger le substrat hydrophile, précédemment extrait, pour obtenir la bicouche voulue. En effet, l'interaction hydrophobe mise en jeu, entre les chaînes aliphatiques de la monocouche sur le support et celles des molécules à l'interface, va conduire à un arrangement spontané sous forme de bicouche (Figure 23, [B]) pour obtenir le substrat hydrophile contenant la SLB (Figure 23, [C]). Cette technique est très utile pour la formation de bicouches asymétriques. Ceci est réalisé en

faisant l'extraction d'un support hydrophile immergé dans une monocouche, constituée d'un lipide, et ensuite faire l'immersion sur une monocouche formée d'un autre lipide (Figure 23, [D]). Cette technique nécessite de prendre des précautions particulières pour éviter l'apparition de structures déformées voire l'apparition de trous dans la SLB^{105,106}. De plus, le transfert de monocouche est difficile lorsque la monocouche à transférer n'est pas en phase Liquide Condensé (LC) car la monocouche manquera alors de cohésion nécessaire à la formation d'une SLB homogène.

b) Méthode de la fusion de vésicules

Cette seconde méthode implique la fusion de vésicules unilamellaires sur un support hydrophile. Le mécanisme de cette fusion a été étudié par plusieurs équipes pour comprendre le mode de fusion de ces vésicules sur la surface^{107,108}. Pour décrire le mécanisme de formation de SLBs par fusion de vésicules, il y a deux étapes clés : l'adsorption et la rupture des vésicules sur le support et l'évolution des patches de bicouches ainsi formés vers une SLB complète. La Figure 24 donne un aperçu des mécanismes de rupture des vésicules qui ont été rapportés dans la littérature¹⁰⁷.

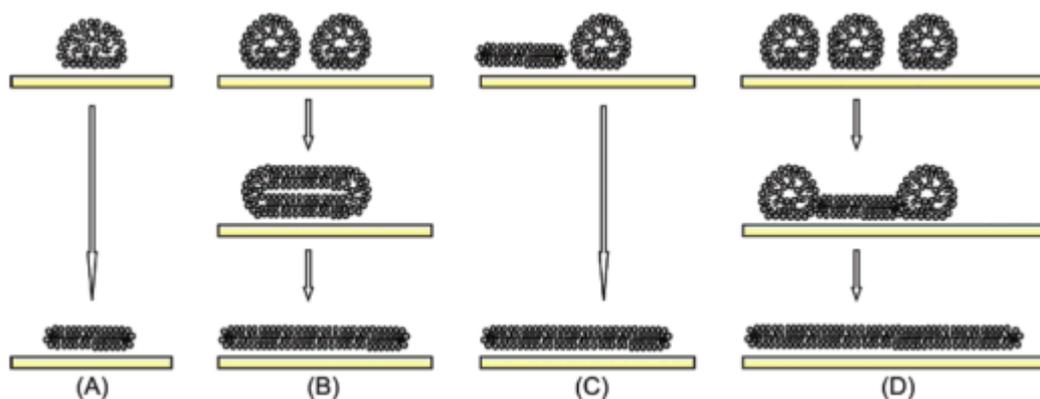


Figure 24 : Mécanismes de la rupture des vésicules pour la formation de SLBs¹⁰⁷

L'étape commune à ces différentes voies est l'adsorption des vésicules sur la surface qui entraîne une déformation de celles-ci. Un rayon critique d'adsorption et de rupture des vésicules ont été déterminés¹⁰⁸. Une vésicule ayant un rayon de courbure inférieur au rayon de courbure critique va s'adsorber sur la surface sans se rompre alors que celle ayant un rayon de courbure supérieur au rayon de courbure critique va se rompre. La rupture spontanée de cette vésicule isolée adsorbée, conduite par sa déformation sur le support, va donner un patch de bicouche (Figure 24, [A]). D'autre part, la fusion de vésicules voisines adsorbées à la surface

va conduire à la formation d'une grosse vésicule avec un rayon qui peut être supérieur au rayon critique. Ainsi, la rupture de cette grosse vésicule aboutit à la formation d'une SLB (Figure 24, [B]). Dans ces conditions, l'obtention d'une bicouche est très dépendante de la quantité de vésicules sur la surface. Une grande quantité favorise l'interaction des vésicules entre elles et lorsqu'une rupture aura lieu son bord actif (bordure avec conformation thermodynamique défavorable) va induire la rupture d'une vésicule voisine conduisant à la formation de la SLB (Figure 24, [C]). La formation de la SLB peut être aussi obtenue par l'action concertée de plusieurs vésicules voisines menant à la rupture d'une première vésicule (à la couverture vésiculaire critique). Le bord actif est, de ce fait, exposé déclenchant la rupture des vésicules adjacentes (Figure 24, [D]).

c) Méthode combinée du transfert de Langmuir-Blodgett et de la fusion de vésicules

Cette méthode consiste au dépôt d'une monocouche de phospholipides par le transfert de Langmuir-Blodgett sur la surface suivi de la fusion de petites vésicules unilamellaires avec la partie hydrophobe de la monocouche supportée¹⁰⁹. (Figure 25)

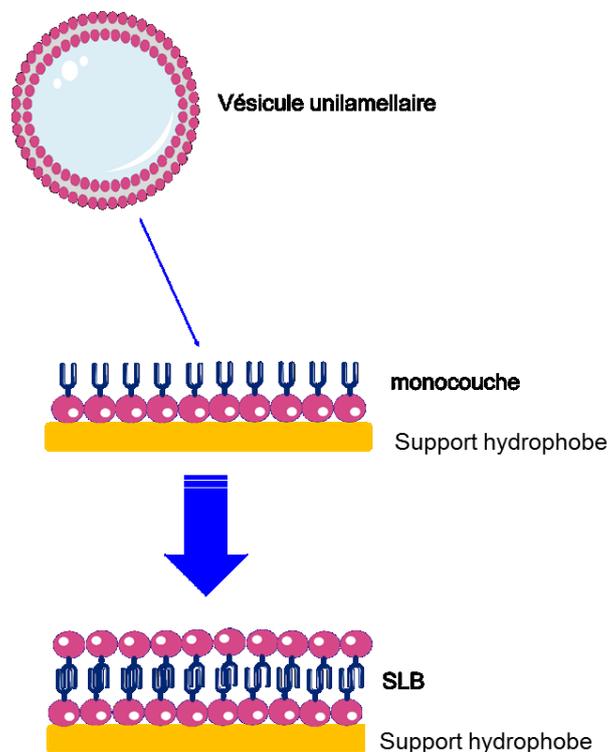


Figure 25 : Formation de SLB par combinaison le procédé de Langmuir-Blodgett et de la fusion de vésicules

Chacune de ces trois méthodes de dépôt présente des avantages et des inconvénients. Le transfert de molécules amphiphiles à partir de l'interface air-eau sur un support date des années 20. Tamm et McConnell ont été les premiers à appliquer cette technologie pour former des SLBs par transfert séquentiel de monocouche sur des substrats de quartz, verre et silicium oxydé¹⁰⁴. Cette méthode est utile pour la formation de bicouches asymétriques. En revanche, par contre, il est difficile voire impossible d'incorporer des protéines transmembranaires dans la bicouche parce qu'avant de transférer des portions des protéines dans la monocouche elles sont exposées à l'air et peuvent subir une dénaturation irréversible¹⁰⁹.

L'adsorption et la fusion de petites vésicules unilamellaires (SUVs) est l'une des méthodes les plus faciles et un des moyens les plus polyvalents pour former des SLBs. Les SUVs sont préparées par une multitude de méthodes. La plus simple consiste à l'extrusion de vésicules multilamellaires à travers des membranes de polycarbonate poreux à haute pression¹¹⁰. Une autre méthode est la sonication et l'ultracentrifugation d'une suspension de lipides en solution aqueuse¹¹¹. L'incorporation de protéines transmembranaires dans les SUVs nécessite un processus doux comme l'enlèvement de détergents par dialyse¹¹². Les facteurs influant sur l'adsorption et la fusion des SUV à des supports solides sont : la composition des vésicules, la taille, la charge de surface, la rugosité de surface, la propreté de la surface, le pH de la solution, la force ionique et la pression osmotique des vésicules^{113,114}.

Une combinaison du transfert de monocouche de Langmuir-Blodgett et de la fusion de vésicules est très efficace pour la formation de bicouches asymétriques¹¹⁵ et pour l'incorporation de protéines transmembranaires dans les SLBs¹⁰⁹.

Le transfert de films lipidiques sur des substrats solides plats offre donc la possibilité d'appliquer un grand nombre de techniques d'analyse de surface très sensibles. Parmi elles, la Microscopie à Force Atomique (AFM) qui a ouvert de nouvelles voies pour la détermination, à l'échelle du nanomètre, de l'organisation des SLBs sous certaines conditions physiques (température, pression, pH...)

5) La Microscopie à Force Atomique

L'organisation des membranes biologiques a beaucoup attiré l'attention ces dix dernières années¹¹⁶ et certaines des questions les plus importantes ont été abordées avec l'aide de l'AFM. Lorsqu'un agent externe entre en contact avec une cellule vivante, il va interagir avec la membrane externe avant d'atteindre sa cible intracellulaire. Cette interaction d'agent externe est largement caractérisée, à l'échelle du nanomètre, par l'AFM¹⁰⁵. De plus, l'AFM est très utilisée dans la détermination de la contribution des lipides et des phases lipidiques aux propriétés nanomécaniques des membranes biologiques¹¹⁷.

a) Principe

L'AFM est une technique de sonde à balayage où la surface d'un échantillon est balayée tandis que les forces d'interaction avec une pointe associée à un cantilever sont enregistrées. Les positions (x, y et z) de l'échantillon sont ajustées par un scanner piézoélectrique assurant des mouvements de haute précision. Un faisceau laser est réfléchi sur le dessus d'un cantilever souple d'AFM et il est recueilli par une photodiode ce qui permet d'enregistrer la déviation de la pointe. (Figure 26)

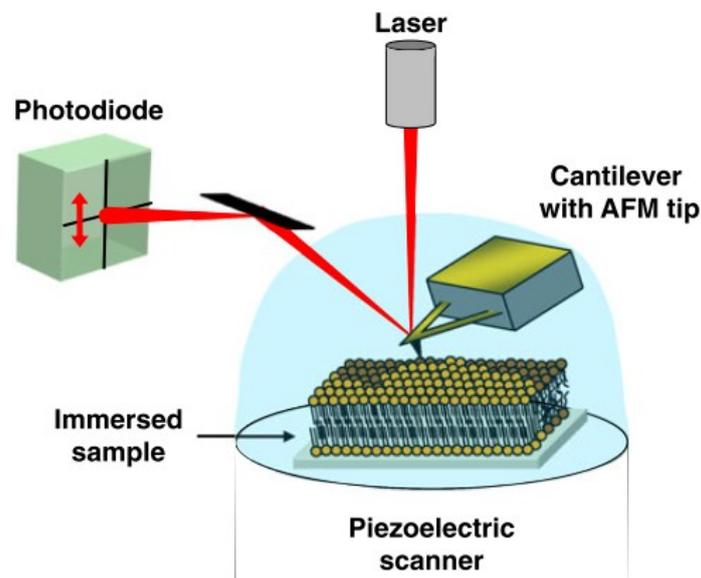


Figure 26 : Le dispositif expérimental microscopie à force atomique (AFM) utilisé pour examiner des bicouches lipidiques supportées¹¹⁸

Bien que l'échantillon soit déplacé par le scanner, la déflexion du signal mesure la force résultant de l'interaction entre la pointe AFM et la surface avec une sensibilité au piconewton. L'AFM est particulièrement adaptée pour la caractérisation d'échantillons biologiques

parce que l'expérience peut être réalisée en solution aqueuse, en temps réel, avec une résolution nanométrique.

b) Les modes de fonctionnement

Les différents modes varient par la façon dont la pointe se déplace et interagit avec l'échantillon. Pour cela, l'imagerie en mode contact consiste au balayage de l'échantillon en continu avec la pointe de l'AFM ayant une force appliquée constante en utilisant une commande de rétroaction (feedback control). Pour l'imagerie en mode dynamique ou intermédiaire (tapping mode AFM) une pointe vibrant près de sa fréquence de résonance est utilisée pour analyser l'échantillon tandis que l'amplitude et la phase sont contrôlées. Ce mode est très avantageux pour les échantillons biologiques car il limite l'altération de la surface en minimisant les forces latérales et le temps de contact entre l'échantillon et la pointe.

Outre l'imagerie structurale, l'AFM peut servir aussi à étudier les forces d'interaction, l'élasticité, les propriétés chimiques et les sites de réception à l'échelle moléculaire à l'aide de la spectroscopie de force. En spectroscopie de force, le cantilever est déplacé de manière contrôlée dans la direction z produisant ainsi des courbes force-distance. Celles-ci représentent la déviation du cantilever en fonction de la position de la pointe. (Figure 27)

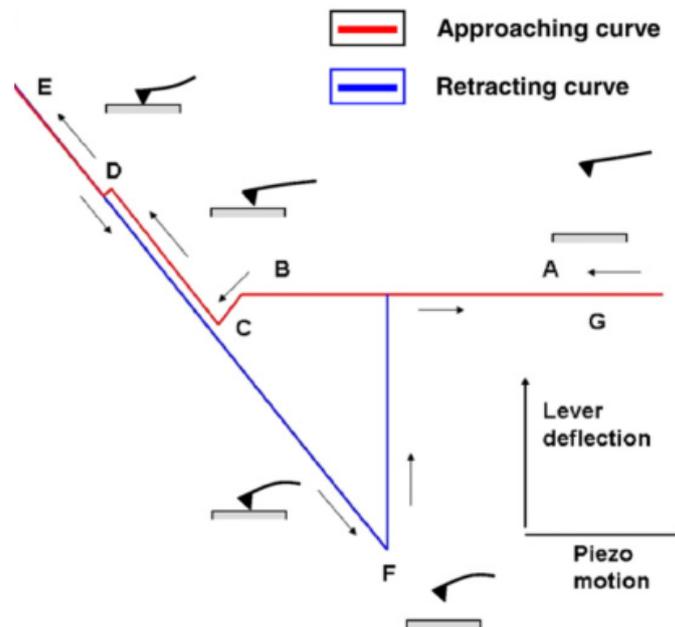


Figure 27 : Courbe typique force-distance qui peut être mesurée sur SLBs¹¹⁷

Lorsque la pointe est loin de l'échantillon, aucune force n'est détectée (Figure 27, [A]). Par mouvement de la pointe sur la surface, à courte portée, les interactions pointe-échantillon mises en œuvre sont principalement d'origine électrostatiques et de Van der Waals (Figure 27, [B]). Dans le cas contraire, si la bicouche et la pointe ont la même charge électrique, une répulsion est observée. Lorsque la pointe touche physiquement la surface, le cantilever subit une déflexion (Figure 27, [C]). À une force de poussée modérée, le cantilever subit une combinaison de forces d'hydratation et de forces stériques. Après ce point, la membrane subit une déformation élastique, jusqu'à ce qu'une force d'élasticité critique soit atteinte (Figure 27, [D]) et le saut du cantilever à travers la membrane se produit. Ceci est une indication de la force maximale à laquelle la membrane est capable de résister avant de rompre. De plus, la compression du cantilever sur le substrat (mica) conduit à une déflexion du cantilever (Figure 27, [E]). La pointe du cantilever, dans la plupart des cas, adhère à la surface, dépendant de la bicouche et de la pointe, jusqu'à atteindre une force d'adhérence critique (Figure 27, [F]) et lorsqu'elle est dépassée, elle se détache de la surface (Figure 27, [G])¹¹⁷.

Les scientifiques exploitent les outils du domaine émergent de la nanotechnologie pour concevoir des matériaux supramoléculaires. Ces matériaux nanométriques appelés nanoparticules (NPs) ont un impact grandissant sur un certain nombre de secteurs industriels tels que la biotechnologie, l'électronique, la cosmétique, la construction et l'énergie. Les NPs sont déjà proposée dans diverses applications biomédicales, particulièrement pour l'imagerie médicale et la délivrance de médicaments et de gènes. Les cyclodextrines amphiphiles sont de bons acteurs pour la formation de NPs visant la délivrance de médicaments¹¹⁹.

B. Formation et caractérisation de nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles

Comme décrit dans le chapitre II. 3., nous avons pu voir différentes techniques permettant d'obtenir des nanoparticules, appelées liposomes, à partir de lipides naturels. De plus, il existe d'autres techniques, plus spécifiques aux cyclodextrines amphiphiles, permettant d'obtenir des nanoparticules bien définies.

1) Formation des nanoparticules à base de cyclodextrines amphiphiles

Les techniques les plus utilisées sont la nanoprécipitation et l'évaporation de solvant en émulsion.

La nanoprécipitation a été mise au point au cours d'une collaboration de différentes équipes françaises et une équipe américaine, et qui a fait l'objet d'un brevet¹²⁰. Ils l'ont appliquée pour la formation de nanoparticules à base de polymères et elle a été ensuite reprise pour être appliquée aux cyclodextrines. Elle consiste donc à dissoudre les cyclodextrines amphiphiles dans un solvant organique miscible à l'eau (acétone) pour ensuite l'injecter dans une solution aqueuse sous agitation constante. Ensuite, le solvant organique est évaporé sous vide en même temps qu'une partie de la solution aqueuse pour atteindre la concentration voulue en nanoparticules. La présence d'un surfactant n'est pas nécessaire pour l'obtention de nanosphères. De plus, de part cette méthode il est possible de charger les nanoparticules formées en principe actif et ceci par différents procédés :

- ✚ Encapsulation conventionnelle : le principe actif en solution est directement ajouté dans la phase organique lors de la précipitation
- ✚ Pré-encapsulation : en premier lieu, la formation du complexe d'inclusion entre les cyclodextrines et le principe actif est réalisée puis dans un deuxième temps les nanoparticules sont formées
- ✚ Encapsulation élevée : elle correspond à la pré-encapsulation avec ajout d'une solution de principe actif en excès dans la phase organique

Cette technique de préparation a été utilisée par Choisnard et son équipe¹²¹ afin d'obtenir des nanoparticules, avec des CDs amphiphiles de type « jupe », de tailles variées avec de bons indices de polydispersité (renseigne sur la monodispersité de l'échantillon). Une partie de leurs résultats ont été réunis dans ce tableau. (Tableau 3)

Tableau 3 : Caractérisation par DLS des nanoparticules obtenues par nanoprécipitation

	β -CD C6	β -CD C8	β -CD C10	β -CD C12	β -CD C14
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	229 ± 24	223 ± 3	118 ± 6	113 ± 11	147 ± 1
Indice de Polydispersité (IP)	0,10 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,04	0,01 ± 0,01

Ces résultats montrent que la technique de la nanopréciptation est bien adaptée pour la formation de nanoparticules avec ce type de composés.

Skiba et son équipe¹²² ont, eux aussi, utilisé cette technique pour former des nanoparticules à partir de CDs amphiphiles de type « jupe » dont voici les résultats. (Tableau 4)

Tableau 4 : Caractérisation des nanoparticules obtenues par nanopréciptation

	β -CD C6	β -CD C12	β -CD C14
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	107 \pm 17	103 \pm 12	89 \pm 26
Indice de Polydispersité (IP)	0,045	0,032	0,093

De plus, une longue étude de stabilité a été réalisée sur ces composés à différentes températures et avec utilisation ou non de l'agitation magnétique. Voici une partie des résultats obtenus. (Figure 28)

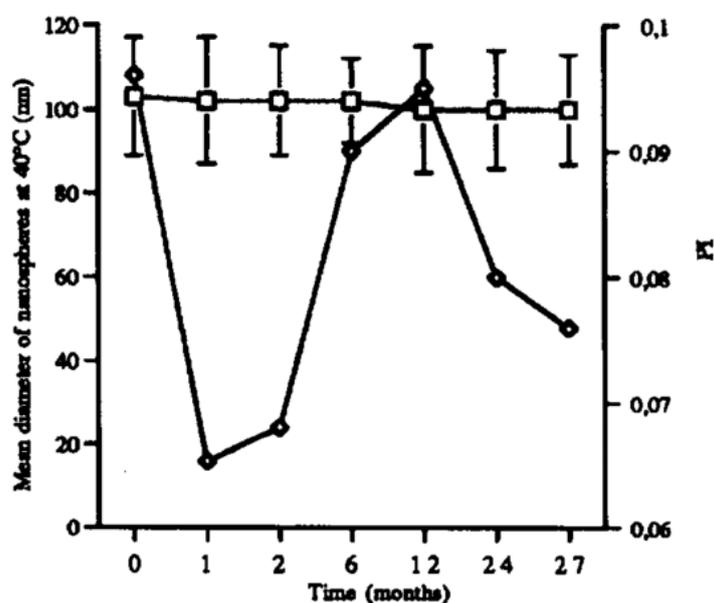


Figure 28 : Etude de la stabilité des nanoparticules de β -CD C6 à 40°C formées avec utilisation de l'agitation magnétique à 600 rpm). L'axe de droite représente le diamètre des nanoparticules (□) et l'axe de gauche l'indice de polydispersité (◇)

Ces résultats montrent une stabilité remarquable dans le temps de ces nanoparticules avec une variabilité de tailles quasi nulle en gardant toujours un bon IP.

La technique d'évaporation de solvant en émulsion est réalisée en dissolvant les cyclodextrines amphiphiles dans un solvant organique non miscible à l'eau (comme le chloroforme ou le dichlorométhane...) contenant ou non du principe actif. Cette solution est dispersée dans une solution aqueuse contenant un surfactant (Pluronic® F68) en utilisant un homogénéisateur à grande vitesse. Ensuite, le solvant organique est évaporé sous agitation constante à température ambiante. Puis, la phase aqueuse est concentrée sous vide pour atteindre la concentration en nanoparticules voulue pour être ensuite filtrée pour éliminer les gros agrégats¹²³.

Lemos-Senna et son équipe ont préparé des nanoparticules de γ -CD C6 de type « jupe » en utilisant cette technique et ont réalisé une étude sur l'influence de la concentration en surfactant dans la préparation. Leurs résultats sont présentés dans le tableau suivant. (Tableau 5)

Tableau 5 : Influence de la concentration du Pluronic® F68 dans la phase aqueuse sur la taille et l'indice de polydispersité des nanoparticules de γ -CD C6

Pluronic® F68 (%)	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité (IP)
0,166	145 ± 46	0,13
0,083	165 ± 35	0,14
0,042	136 ± 47	0,15
0,021	164 ± 35	0,10
0,0104	154 ± 43	0,12

Ils ont pu montrer la formation de nanoparticules avec ce procédé. A savoir que la présence d'un surfactant est nécessaire pour la formation des nanosphères. D'après ces résultats, on peut remarquer que ces nanoparticules présentent un indice de polydispersité (IP) supérieur à celles préparées par nanoprécipitation, conformément à ce qui est aussi décrit dans la littérature¹²⁴.

2) Caractérisation des nanoparticules

Après avoir mis en œuvre la préparation, il faut pouvoir vérifier la formation des nanoparticules en utilisant différentes techniques de caractérisations.

a) Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

La DLS est une technique rapide, efficace et non destructive qui ne nécessite pas de préparation préalable. De ce fait, c'est une technique très utilisée pour vérifier la formation des nanoparticules. La DLS est aussi nommée diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS) ou encore spectroscopie par corrélation de photon (PCS)¹²⁵. (Figure 29)

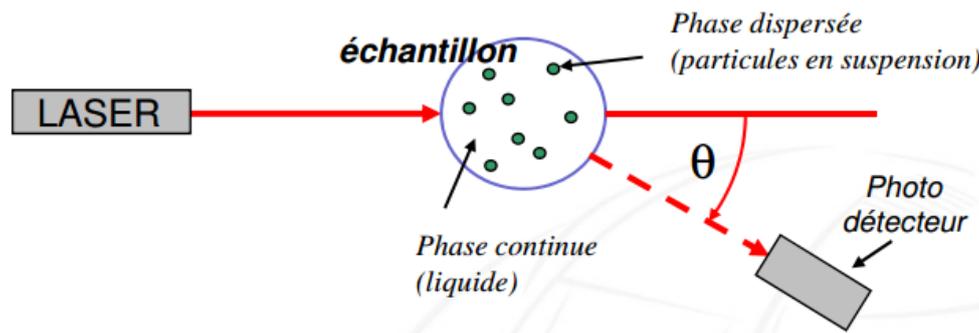


Figure 29 : Principe de mesure d'un échantillon par DLS¹²⁶

La lumière d'un laser est émise dans une cuve contenant l'échantillon à analyser, les objets en suspension vont donc diffuser la lumière dans toutes les directions. L'intensité de la lumière diffusée, appelée diffusion de Rayleigh, par les objets est mesurée à un angle θ de 90° ou de 173° . Ensuite, par l'équation de Stokes Einstein, le diamètre des nanoparticules est obtenu. Pour conclure quant à la monodispersité de l'échantillon, il faut que le % de polydispersité soit inférieur à 20%¹²⁷.

Un grand nombre d'étude sur les nanoparticules de cyclodextrines amphiphiles emploient cette technique^{122,124,128-130}.

b) Le potentiel Zêta

Le potentiel Zêta correspond à la mesure de l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre particules. C'est un paramètre fondamental connu pour affecter la stabilité. Les nanoparticules, en solution, sont chargées ou présentent des charges partielles ce qui leur confèrent une couche ionique, de charge opposée, fortement liée à leur surface. Elles possèdent également une deuxième couche extérieure composée d'ions faiblement associés. Ces deux couches portent le nom de double couche électrique¹³¹. (Figure 30)

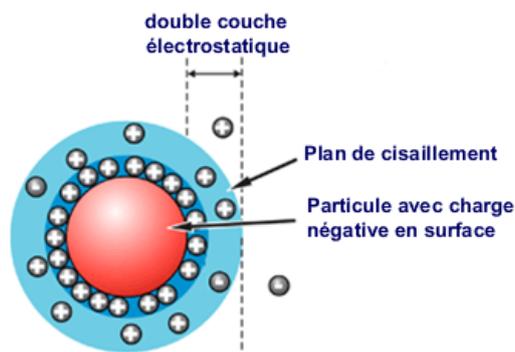


Figure 30 : Représentation de la bicouche électrique autour d'une nanoparticule ¹³¹

La mesure du potentiel Zêta est réalisée en appliquant un champ électrique à l'échantillon. Le mouvement des nanoparticules résultant, appelé mobilité électrophorétique, est mesuré par LDV (Laser Doppler Velocimetry). (Figure 31)

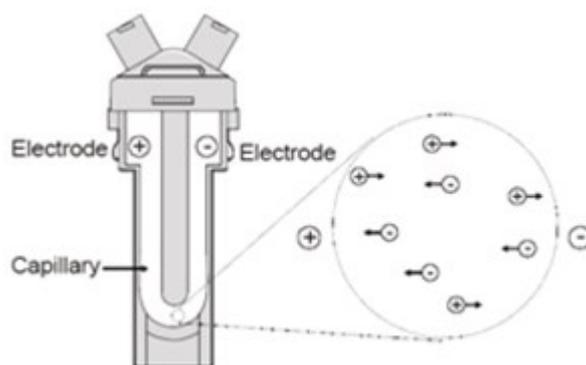


Figure 31 : Représentation de l'électrophorèse laser Doppler ¹³¹

Le faisceau laser passe au travers de l'échantillon, se situant à l'intérieur d'un capillaire soumis à une tension grâce à deux électrodes situées aux bornes de chaque côté de la cellule. La lumière diffusée par les particules en mouvement est rapportée en fréquence. La fréquence Δf est directement proportionnelle au potentiel Zêta des particules ¹³¹.

De part cette mesure, on peut savoir si les nanoparticules sont neutres, cationiques ou anioniques. En effet, des nanoparticules ayant un potentiel Zêta compris entre -10 mV et +10 mV sont considérées comme neutres. Alors que, celles possédant une valeur supérieure à +30 mV ou une valeur inférieure à -30 mV sont considérées, respectivement, comme fortement cationiques ou anioniques.

Cette technique peut être utilisée afin de vérifier que les nanoparticules soient bien chargées positivement pour permettre l'encapsulation de l'ADN ¹³² ou négativement pour prouver que les groupements anioniques sont présents à l'extérieur des nanoparticules ¹³³. La stabilité des nanoparticules peut être montrée en mesurant leur potentiel Zeta ^{122,128-130,134}.

c) La microscopie électronique

Les microscopes électroniques utilisent un faisceau de particules d'électrons pour obtenir une image très agrandie de l'échantillon. On distingue deux types de microscopes électroniques : le Microscope Electronique en Transmission (MET ou TEM en anglais) et le Microscope Electronique à Balayage (MEB). Le TEM peut être utilisée pour confirmer la formation d'objets, la taille des objets obtenus par d'autres techniques ainsi que leur morphologie^{16,128}. De la même façon, le STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) peut être utilisé en complément du TEM car ce dernier va permettre de réaliser une analyse élémentaire sur les nanoparticules observées afin de prouver que les nanoparticules observées sont bien constituées de notre produit¹³⁵.

Voici un exemple de l'utilisation du TEM pour la caractérisation de nanoparticules de CDs amphiphiles de type « jupe » obtenues par la technique d'évaporation de solvant en émulsion. Ceci a été réalisé par Lemos-Senna et son équipe¹²³. (Figure 32)

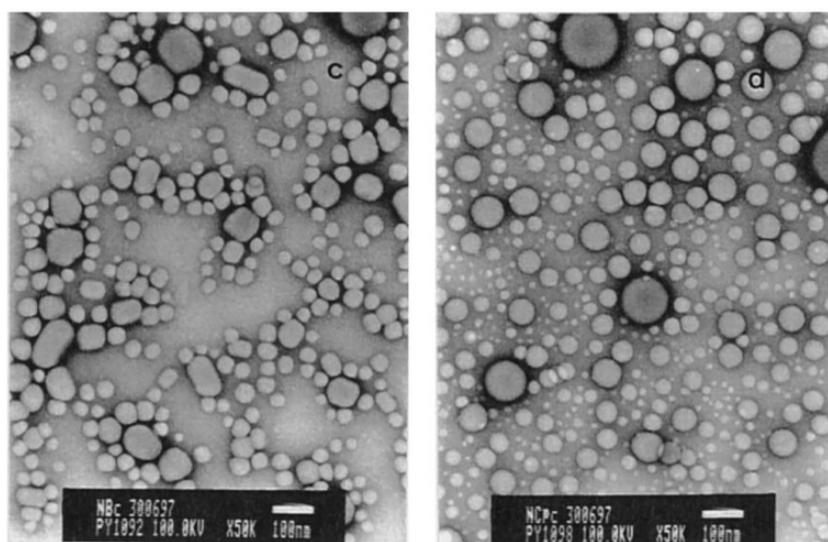


Figure 32 : Image de TEM des nanosphères de γ -CD C6 non chargées (à gauche) et chargées en progestérone (à droite)

Ces images montrent la formation de nanoparticules chargées ou non en progestérone ainsi que leur morphologie.

Des images de TEM ont aussi été obtenues pour des nanoparticules de β -CDs amphiphiles préparées par nanoprécipitation. (Figure 33)

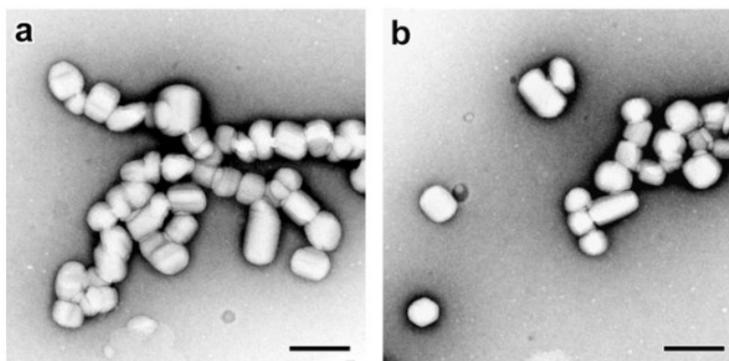


Figure 33 : Image de TEM des nanosphères de β -CD C10 non chargées (a) et chargées en artémisinine (b)

Ces deux exemples montrent que la morphologie des NPs dépend de nombreux paramètres, en particulier, du mode de préparation et la présence ou non d'un principe actif.

C. Influence de la structure des cyclodextrines amphiphiles sur leurs propriétés physicochimiques

Un grand nombre de modifications peut être appliquées aux cyclodextrines en greffant des substituants à différentes positions (face primaire, face secondaire ou les deux), en changeant la tête polaire (α , β ou γ) ou en modifiant la jonction entre la tête polaire CD et les chaînes aliphatiques. Ceci va permettre d'obtenir des dérivés amphiphiles capable de former des agrégats supramoléculaires sous forme de nanoparticules, comme vu précédemment, considéré comme de potentiels vecteurs de médicaments. Ces composés amphiphiles peuvent être obtenus par diverses voies de synthèses comme décrit précédemment dans le chapitre (I. C. 2.).

1) Influence de la structure sur la concentration d'agrégation critique (CAC)

Une molécule amphiphile est dite tensioactive lorsqu'elle possède une CAC (ou CMC : Concentration Micellaire Critique). Cette concentration est la concentration à partir de laquelle la molécule va s'auto-organiser en solution aqueuse pour former des agrégats (d'où le terme de CAC) ou des micelles (d'où le terme de CMC).

Les mesures de la CAC sont réalisées en suivant la tension superficielle de surface de solutions aqueuses contenant le produit à tester à différentes concentrations. Les tensions

superficielles obtenues pour chaque concentration vont nous permettre de déterminer la CAC, en traçant la courbe de variation de la tension superficielle en fonction du logarithme décimal de la concentration du composé testé en solution. Lorsque le composé testé est tensioactif, ce genre de courbe est obtenu. (Figure 34)

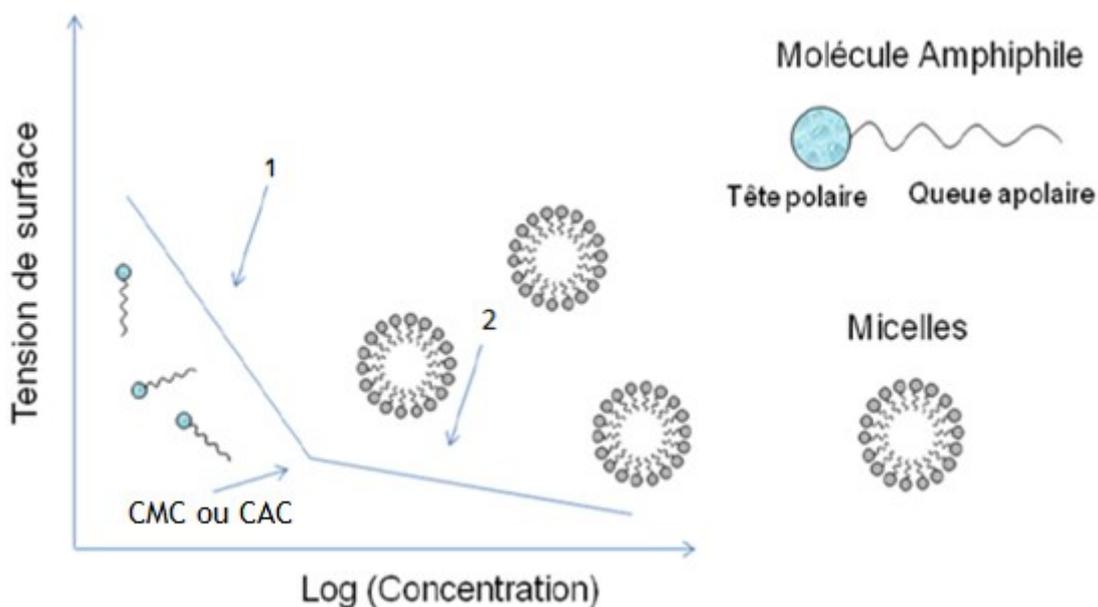


Figure 34 : Détermination de la CAC ou CMC du composé testé

Cédric Gervaise au cours de sa thèse¹⁰ a réalisé la synthèse de deux familles de β -CDs amphiphiles de type « sucette » améliorée (ne présentant pas d'auto-inclusion de la chaîne aliphatique). Voici la structure de ces deux familles (Schéma 18)

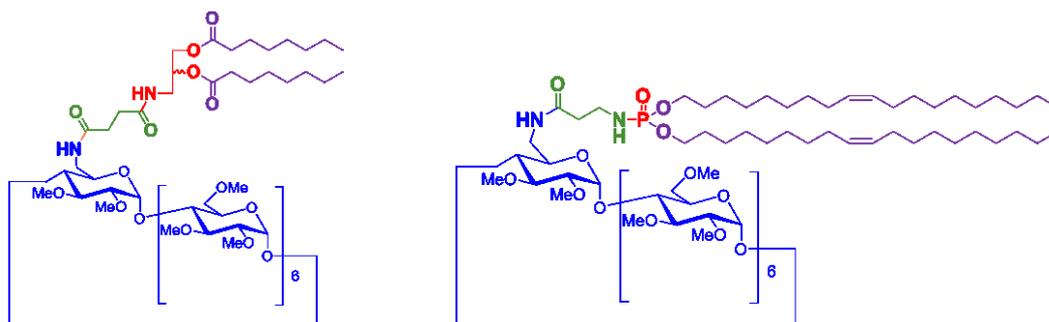


Schéma 18 : Représentation de la famille des Glycérolipidyls β -CDs (à gauche) et des Phosphoramidyls β -CDs (à droite)

Il a donc réalisé les mesures de tensioactivité sur ses deux familles dont voici les résultats qu'il a obtenus pour la famille des Glycérolipidyls β -CDs. (Tableau 6)

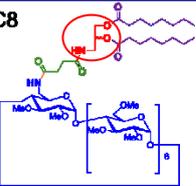
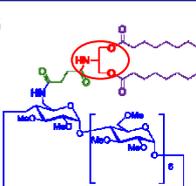
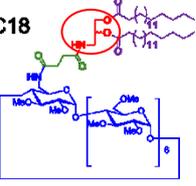
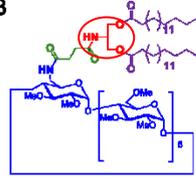
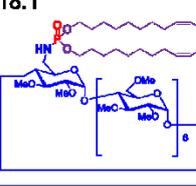
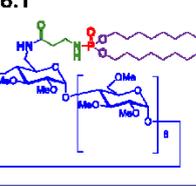
Glycérolipidyls Cyclodextrines	CAC	Glycérolipidyls Cyclodextrines	CAC
	$1,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$		$5,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	$1,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$		$4,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Phosphoramidyls Cyclodextrines	CAC	Phosphoramidyls Cyclodextrines	CAC
	Solubilité $< 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$		$5,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Tableau 6 : CAC des différentes Glycérolipidyls β -CDs

Ces résultats montrent une différence de valeur de la CAC selon, d'une part, la jonction entre la partie CD et les chaînes aliphatiques, et d'autre part, suivant la longueur de la chaîne aliphatique. Concernant la modification de la jonction, c'est soit une jonction glycérol avec un carbone asymétrique en mélange racémique ou sans carbone asymétrique. Une différence d'une puissance de 10 est observée entre ces deux jonctions pour la glycérolipidyl β -CD C8 et différence d'un facteur 100 est observée pour la glycérolipidyl β -CD C18. Ceci peut être expliqué par un réarrangement différent dans l'espace entre ces deux jonctions. La différence d'une puissance de 10 entre la glycérolipidyl β -CD C8 et la glycérolipidyl β -CD C18 en jonction non asymétrique marque aussi l'influence des chaînes aliphatiques sur la tensioactivité d'un composé.

Concernant la famille des phosphoramidyls β -CDs, il a pu tester l'apport d'un bras espaceur dans la structure. L'apport du bras espaceur dans cette structure est sans appel. Sans la présence du bras espaceur, aucune formation d'agrégat n'est observée dans les différents milieux faute de solubilité. Ceci montre que ce composé n'est pas tensioactif alors que celui ayant le bras espaceur donne de bons résultats dans l'ensemble des solutions tamponnées testées.

Ces résultats nous ont montré que le caractère tensioactif d'une CD amphiphile est fortement lié à sa structure, au point où, aucune valeur de CAC ne peut être déterminée ce qui rend le

composé inutilisable pour tout type d'application en tant que vecteur membranaire. Ceci, car la formation de nanoparticule nécessite que la molécule soit tensioactive.

2) Influence de la structure sur le comportement interfacial

Le comportement à l'interface air-eau de différentes CDs amphiphiles a été étudié par Bauer et son équipe⁷⁹ sur les cholestéryles CDs à savoir l' α -CD monocholestéryle (TASC), la β -CD mono et dicholestéryle (TBSC et TBdSC, respectivement) dont voici leur structure. (Schéma 19)

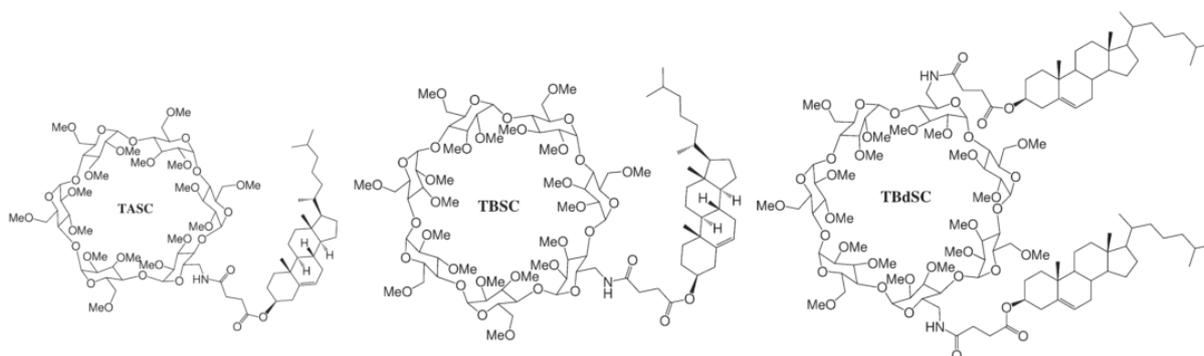


Schéma 19 : Structure chimique des TASC, TBdSC et TBSC⁷⁹

Chacun de ces 3 composés ont montré leur comportement amphiphile en formant une monocouche stable à l'interface air-eau puisque le collapse ne se produit que pour une très haute pression de surface. (Figure 35)

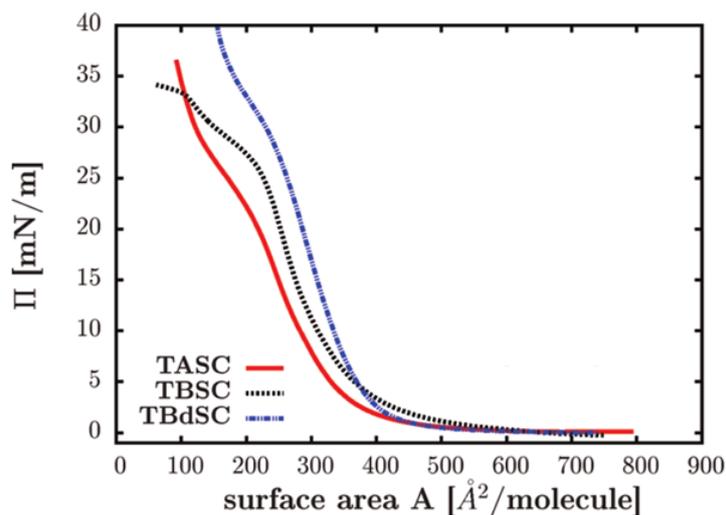


Figure 35 : Isothermes de compression des TASC, TBSC et TBdSC ainsi que leur module de compressibilité à 20°C⁷⁹

La forte augmentation dans l'isotherme de la TASC se produit pour des plus petites aires comparée avec la TBSC et la TBdSC. Ceci reflète la plus petite taille de la partie α -CD comparé à la β -CD. Cette observation ainsi que le plus gros volume de la CD par rapport au groupement cholestérol permet de conclure que la forme des isothermes dépend principalement de la tête polaire CD. La différence des isothermes de compression entre la TASC et la TBSC est due à la plus grande flexibilité de la β -CD en particulier la possibilité de faire une rotation autour de la liaison glycosidique⁷⁹. Quant à la TBdSC, la β -CD a perdu de sa flexibilité à cause des deux fragments cholestérols expliquant une forme d'isotherme similaire à la TASC ainsi qu'une compressibilité similaire du pseudo plateau.

Cette étude montre que l'organisation de cyclodextrines amphiphiles à l'interface air-eau dépend, à la fois, de la tête polaire (α ou β) et du nombre de groupements hydrophobes greffés sur la CD (1 ou 2).

Ringard-Lefebvre et son équipe¹³⁶ ont caractérisé le comportement de CDs amphiphiles à l'interface huile-eau. Ces CDs amphiphiles de type « méduse », totalement modifiées sur la face primaire, sont obtenues en passant par une per-iodation sélective de la face primaire suivie par une per-azotation et d'une réduction pour obtenir une β -CD per-aminée sur la face primaire. L'obtention des CDs amphiphiles est réalisé par la réaction de la β -CD per-aminée sur des dérivés anhydrides. Ils ont aussi synthétisés une β -CD per substituée sur la face secondaire par des chaînes à 6 carbones, ceci pour voir s'il y a un effet de la substitution de la face de la β -CD (Schéma 20, Fig.e : β -CDC₆). L'effet de la fonction reliant la β -CD aux chaînes aliphatiques a aussi été étudié en synthétisant une β -CD amphiphile présentant une fonction ester (Schéma 20, Fig.d : 6-O-CAPRO- β -CD).

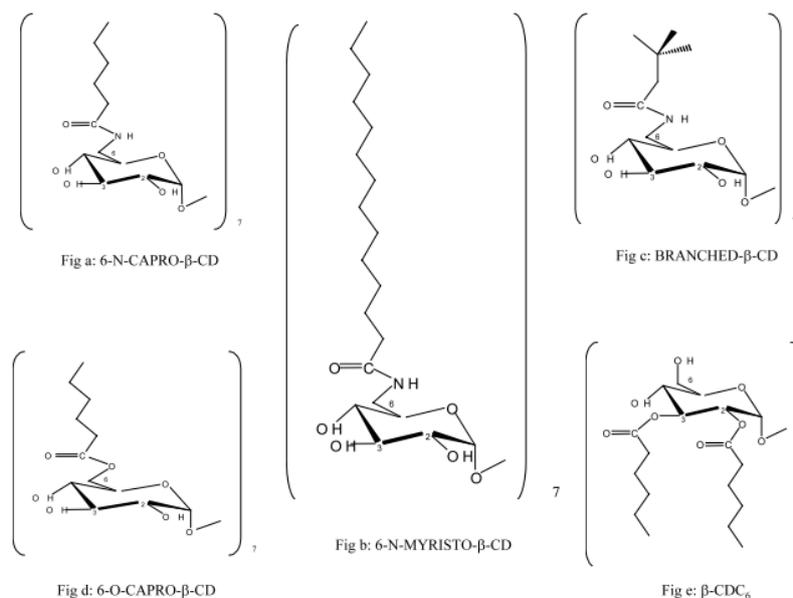


Schéma 20 : Représentation schématique des différents β-CD amphiphiles synthétisés¹³⁶

Le but de leur travail était donc de caractériser le comportement des β-CDs amphiphiles modifiées sur la face primaire à l'interface huile-eau et aussi d'évaluer l'effet de la longueur de la chaîne aliphatique sur la pression interfaciale du système huile-eau. Ils ont considéré que le système huile-eau avec des CD modifiées répandu à l'interface imite de façon adéquate l'interface rencontrée dans le procédé de nanoprécipitation, utilisé pour la préparation de nanocapsules¹³⁶. L'huile utilisée est l'huile de Miglyol qui est une huile neutre inerte immunologiquement présentant des triglycérides avec des chaînes moyennes.

Voici les résultats obtenus lors de l'étalement des β-CDs amphiphiles. (Figure 36)

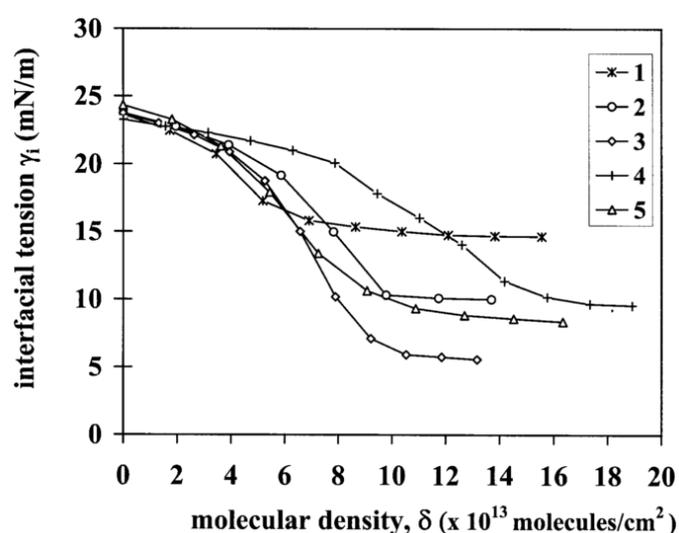


Figure 36 : Tracé de la pression interfaciale huile-eau en fonction de la densité moléculaire des CDs amphiphile déposées (1) β-CD-C6, (2) 6-O-CAPRO-β-CD, (3) 6-N-CAPRO-β-CD, (4) 6-N-MYRISTO-β-CD, (5) BRANCHED-β-CD

Dans tous les cas, la pression interfaciale est diminuée lorsque la densité moléculaire augmente. Quand β -CD est substituée sur la face primaire, il en résulte une diminution de la pression interfaciale à des valeurs comprises entre 6 et 10 mN/m, alors que, la β -CD₆, substituée sur la face secondaire, induit seulement une légère diminution de la pression interfaciale. A noter aussi que la différence de comportement entre elles se fait à des hautes densités de surface ($>4.10^{13}$ molécules/cm²).

Ceci indique nettement que la nature chimique des cyclodextrines a un effet significatif sur leur réarrangement spontané à l'interface en conséquence de la mesure de la réduction de la pression interfaciale du système. Par exemple, en comparant la 6-*N*-CAPRO- β -CD and 6-*O*-CAPRO- β -CD, on remarque clairement que la présence d'un groupement NH- hydrophile comme jonction permet d'avoir une performance améliorée dans l'abaissement de la tension interfaciale (Figure 36, courbes 2 et 3). En comparant la 6-*N*-CAPRO- β -CD (6 carbones) avec la 6-*N*-MYRISTO- β -CD (14 carbones), on observe que les chaînes plus courtes ont de meilleures performances sur ce paramètre que les chaînes longues (Figure 36, courbes 2 et 4).

Il semble évident que plus la réduction de la pression interfaciale du système huile-eau est grande, plus le rayon de courbure des gouttelettes sera petit et plus la formation des nanocapsules sera facile¹³⁶.

3) Influence de la structure sur la taille et la morphologie des autoassemblages

Choisnard et son équipe¹²¹ ont décrit la synthèse de β -CDs modifiées sur la face secondaire par des esters gras de tailles variées (C4-C14). Elles sont obtenues par transestérification de la β -CD native par des esters de vinyle utilisant la thermolysine, comme biocatalyseur de transestérification, dans le DMSO. La synthèse de cette librairie de composés leur a permis de réaliser une étude autour de la capacité à former des nano-agrégats selon la longueur de chaîne mais aussi une étude morphologique.

La formation de nano-agrégats, utilisant la technique de nanoprecipitation, a été vérifiée en utilisant la DLS. (Tableau 7)

Tableau 7 : Diamètre hydrodynamique moyen et indice de polydispersité (IP) des nano-agrégats avec les β -CD C6-C14 pour la formulation utilisant une concentration de dérivés de β -CD d'esters gras de 1 mg/mL dans la phase organique (d'après ¹²¹)

	β -CD C6	β -CD C8	β -CD C10	β -CD C12	β -CD C14
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	229 \pm 24	223 \pm 3	118 \pm 6	113 \pm 11	147 \pm 1
Indice de Polydispersité (IP)	0,10 \pm 0,04	0,18 \pm 0,07	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,04	0,01 \pm 0,01

Il ont en fait réalisé deux formulations, la Formulation I utilise une concentration de dérivés de β -CD d'esters gras de 1 mg/mL dans la phase organique (Tableau 7) et la Formulation II utilise 2 mg/mL (résultats non présentés dans ce tableau). Pour les deux formulations, la β -CD C4 n'a pas permis la formation de nano-agrégats. Pour les autres composés, de C6 à C14, la formation de nano-agrégats a été observée. Ces différents résultats ont montré que les plus petites tailles de nanoparticules ont été obtenues entre 87 et 90 nm lorsque la β -CD C8 est impliqué dans la Formulation II. Les plus grandes tailles de nanoparticules sont entre 223 et 229 nm en utilisant la β -CD C6 en Formulation I. Ceci renforce l'hypothèse du rôle clef que joue la longueur des chaînes greffées ainsi que le nombre d'acylation par β -CD sur la capacité à former des autoassemblages. La concentration a aussi son influence sur la taille car les nanoparticules obtenues avec la Formulation I sont toujours plus grandes que celles obtenues avec la Formulation II.

L'utilisation du cryo-TEM a permis de mener une étude structure/morphologie des nanoparticules. En effet, l'ensemble des composés formant des nanoparticules ont été observées, ce qui a montré une grande variabilité de la morphologie. Des nanoparticules sphériques, en forme de tiges ou sous formes irrégulières ont été observées soit avec la structure matricielle ou lamellaire (Figure 37). Les particules de β -CD C6 sont sphériques (Figure 37, [a]) avec un contraste homogène et sans aucune preuve visuelle de l'organisation interne (Figure 37, [b]). Les particules de β -CD C8 (Figure 37, [c]), quant à elles, sont plus petites, ont l'air principalement rectangulaire suggérant une forme de type cylindrique et présentent des franges parallèles (Figure 37, [d]). La β -CD C10 forme des particules grosses et sphériques avec une structure multilamellaire (Figure 37, [e ; f]). La β -CD C12 et la β -CD

C14 présentent des particules similaires de formes irrégulières avec des franges parallèles (Figure 37, [g ; h]).

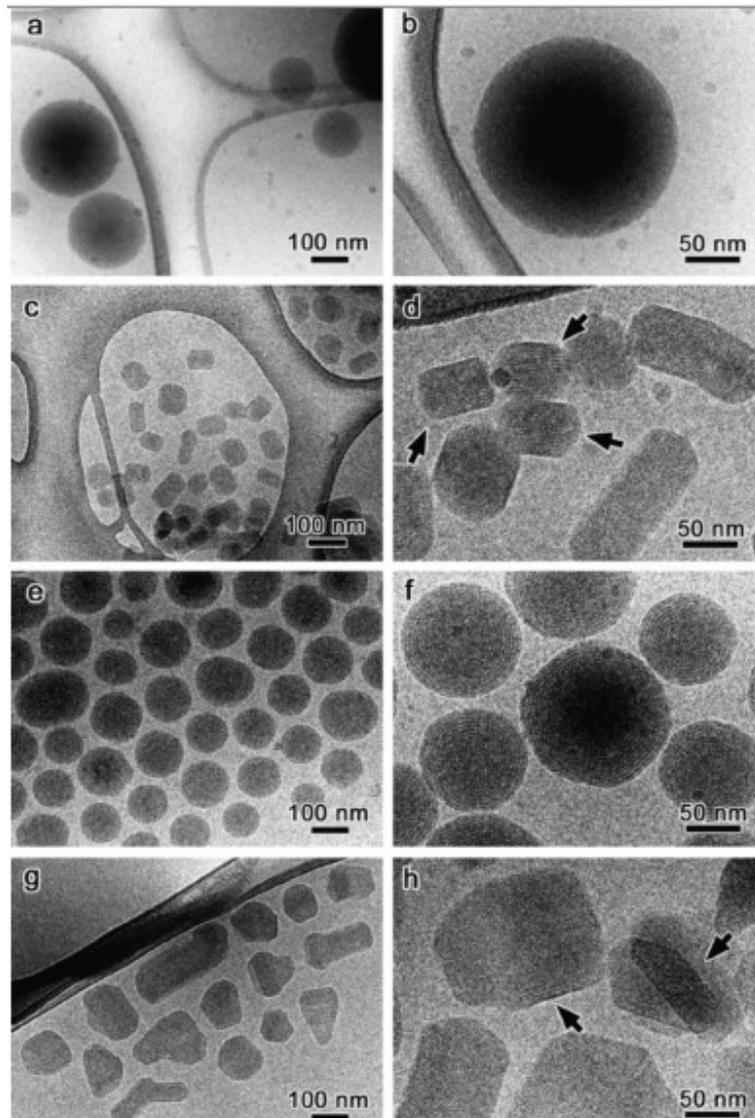


Figure 37 : Images de cryo-TEM des nanoparticules de β -CD C6 (a, b), C8 (c, d), C10 (e, f) et C14 (g, h).

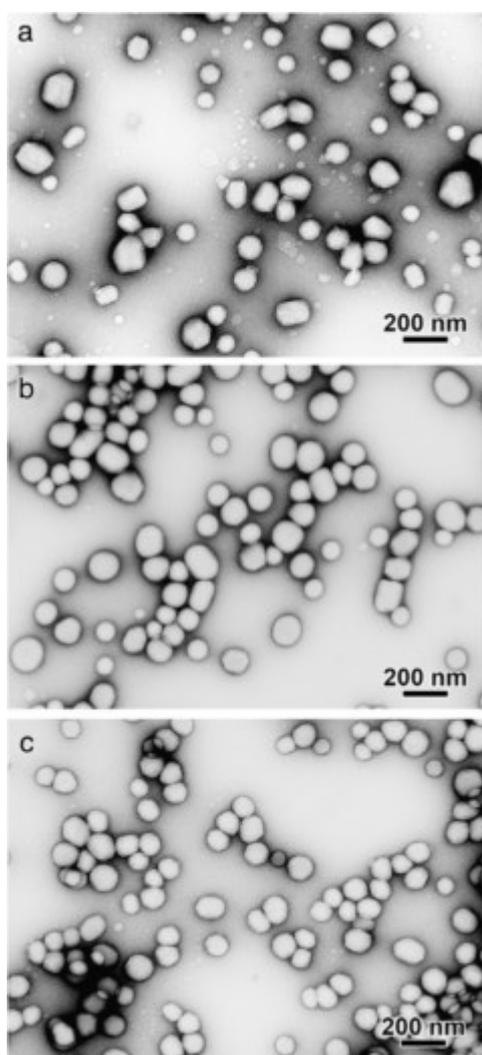
Cette étude sur l'influence de la longueur des chaînes aliphatiques greffées sur la β -CD et leur degré de substitution quant à la taille et la morphologie des nanoparticules formées a révélé une certaine dépendance à ces deux facteurs.

Cette même équipe a ensuite réalisée la synthèse des α -, β - et γ -CDs modifiées par un ester gras de 10 carbones et a utilisé la méthode de nanoprécipitation pour former des nanoparticules avec ces composés. Leur capacité à former des nanoparticules par DLS a été évaluée et leur morphologie a été visualisée par TEM¹³⁴. (Tableau 8 et Figure 38)

Tableau 8 : Tailles des nanoparticules des α -, β -, et γ -CD C10 déterminées par DLS

	α -CD C10	β -CD C10	γ -CD C10
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	122 ± 8	115 ± 10	103 ± 5
Indice de Polydispersité	$0,09 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$

Au vu des résultats, on ne note pas une grande différence de taille quelle que soit la CD utilisée (α , β ou γ). Par contre, une nette différence de morphologie est obtenue entre les composés. (Figure 38)

Figure 38 : Images de TEM des α - (a), β - (b) et γ -CD C10 (c) ¹³⁴

Ces images de TEM (Figure 38), nous montre que les autoassemblages de ces composés diffèrent les uns des autres et adoptent des tailles et formes différentes. Les nanoparticules de l' α -CD C10 forme des objets polygonaux avec un diamètre moyen entre 100 et 180 nm. Quant aux nanoparticules de β -CD C10, elles forment des objets, généralement, sphéroïdaux avec un diamètre moyen compris entre 100 et 180 nm. Par contre celles de γ -CD C10 sont plus petites (100-120 nm) et moins polydisperses avec une forme sphéroïdale et parfois légèrement polygonale.

Ces deux études menées nous montrent que la longueur des chaînes aliphatiques ainsi (C4-C14) que la taille de la partie hydrophile CD (α , β ou γ) peut avoir un impact sur la forme et la morphologie des nanoparticules formées et donc un impact direct sur la capacité à interagir avec les membranes biologiques.

4) Influence de la structure sur l'encapsulation de principes actifs

Après avoir vérifié la capacité des molécules amphiphiles à former des autoassemblages, il est primordial d'étudier leur capacité à encapsuler les principes actifs d'intérêt, d'évaluer leur taux d'encapsulation ainsi que la vitesse de relargage de ce principe actif.

Cette étude a été réalisée par Yaméogo et son équipe sur leur β - et γ -CD transestérifiées avec un ester en C10¹²⁸. Ils ont donc orienté leur recherche sur l'effet de paramètres de formulation pour l'encapsulation de l'Artémisinine (ART), une lactone endopéroxyde de sesquiterpène, un médicament antipaludique.

La quantité de médicament associée aux nanosystèmes a été évaluée par :

- ✚ La détermination de la concentration totale d'ART récupérée dans les suspensions colloïdales (C_t) par HPLC-UV
- ✚ La détermination de la concentration dans le surnageant (C_s) après ultracentrifugation par HPLC-UV

A partir de ces paramètres, la récupération de principes actifs (Drug Recovery, DR (%)), l'association de médicaments (Drug Association, DA (%)) et l'efficacité de piégeage (Entrapment Efficiency, EE (%)) ont pu être estimées comme suit :

$DR (\%) = \left(\frac{C_t}{C_i} \right) \times 100$ Avec C_i qui est la concentration du médicament initialement introduit.

$$DA (\%) = \frac{(Ct - Cs)}{Ct} \times 100$$

$$EE (\%) = \left[\frac{ART \text{ associée (mg)}}{\text{quantité initiale de CD (mg)}} \right]$$

Ces différents paramètres ont permis de mettre en évidence le chargement de médicaments au sein de leurs nanosphères de β - et γ -CD C10 préparées à partir de deux formulations avec des concentrations différentes de CD-C10 (FI = 1 mg/mL et FII = 2 mg/mL) . Toutes les valeurs ont été reprises dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques des nanosphères chargées en ART formées à partir des β - et γ -CD C10¹²⁸

	β -CD C10		γ -CD C10	
	FI	FII	FI	FII
Diamètre moyen (nm)	103 ± 6	105 ± 7	111 ± 7	106 ± 4
Indice de Polydispersité	0,05	0,04	0,07	0,05
Potentiel Zeta (mV)	-20 ± 2	-21 ± 1	-19 ± 1	-18 ± 2
Ct (mg/mL)	0,23	0,27	0,27	0,43
DR (%)	23,0	46,8	33,8	72,0
DA (%)	73,9	78,6	78,1	90,6
EE (%)	8,5	9,2	13,2	16,3

La concentration de CD dans la phase organique n'influence pas la taille des particules mais affecte le DR. C'est la γ -CD C10 sous la formulation FII qui montre les meilleures valeurs de chargement de médicaments (DR, DA et EE). En effet, c'est elle qui a le meilleure DA (%) = 90% avec une concentration totale de ART, récupéré en suspension, de 0,43 mg/mL. Une faible augmentation de la taille des particules et une faible diminution du potentiel Zeta en valeur absolue en présence d'ART permet de suggérer qu'une partie de la molécule vient s'adsorber à la surface des particules. Les fortes EEs des particules de γ -CD C10 comparées à celles obtenues avec la β -CD C10 peuvent être expliquées par une interaction spécifique entre l'ART et la γ -CD. Il y a très certainement plusieurs sites pour l'emplacement du médicament mettant en jeu des liaisons hydrophobes voire même son encapsulation¹²⁸.

Ces résultats nous montrent donc bien l'influence de la tête polaire β - ou γ -CD sur la capacité à encapsuler un médicament car il a été montré que la γ -CD C10 a un meilleur taux de chargement comparé à la β -CD C10.

5) Influence de la structure sur la complexation et les propriétés de délivrance

La plupart des vecteurs d'acides nucléiques non viraux entrent dans la catégorie des lipides ou des polymères cationiques¹³⁷. Malheureusement, la faible efficacité et une sélectivité médiocre par rapport à leurs homologues viraux limitent leur gamme d'application.

La préorganisation des éléments fonctionnels cationiques sur des plates-formes macrocycliques, telles que les cyclodextrines, a le potentiel de permettre le contrôle de leur orientation spatiale et le comportement des autoassemblages en architectures discrètes pour produire des objets nanométriques qui peuvent être programmés pour complexer, compacter, délivrer et libérer l'ADN plasmidique dans une cellule cible.

De ce fait, une librairie de cyclodextrines amphiphiles polycationiques a été synthétisée par Garcia Fernandez et son équipe¹³⁷ afin d'encapsuler et de délivrer des acides nucléiques tels que l'ADN, l'ARN messenger, des oligonucléotides... qui sont une source prometteuse de traitements thérapeutiques pour différents types de cancer, de maladies infectieuses, de maladies cardiovasculaires... La face amphiphile et la présence d'un réseau de liaisons hydrogènes entre le cluster cationique et la plateforme CD est un bon moyen pour obtenir une complexation coopérative et réversible des chaînes polyanioniques d'ADN. (Schéma 21)

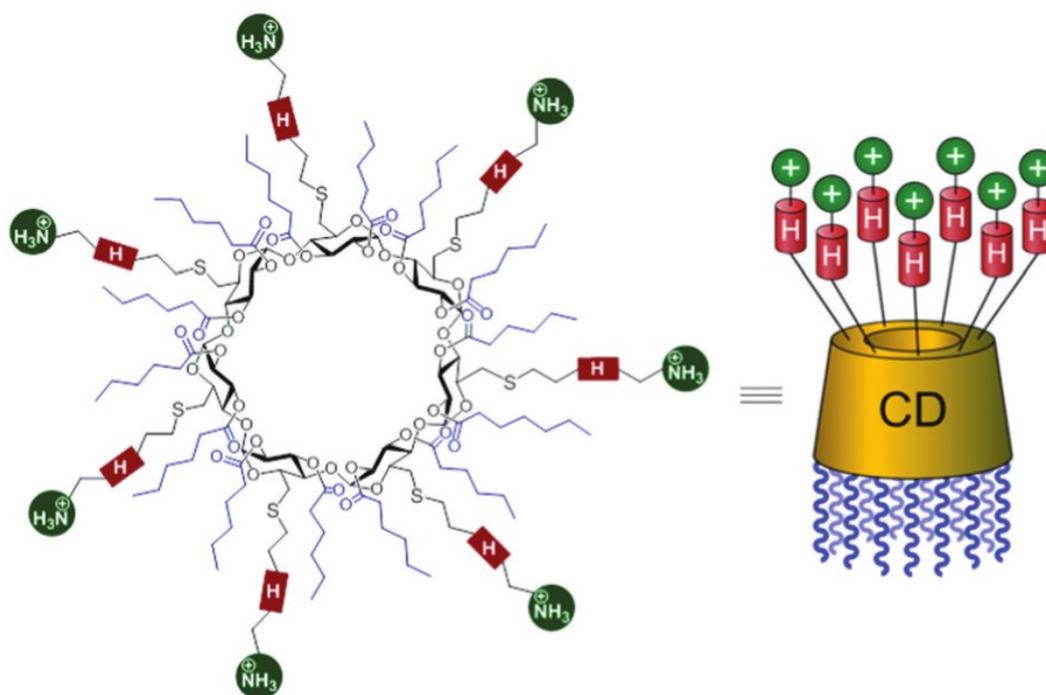


Schéma 21 : Représentation schématique de l'architecture de la β -CD amphiphile polycationique. Les rectangles/cylindres rouge représentent les groupes donneurs de liaisons hydrogènes, que sont les fonctions thio-urées. Tandis que les cercles verts représentent les centres cationiques, qui peut être éventuellement dendronisés. Les chaînes aliphatiques sont représentées en bleu.

A partir de ce modèle, ils ont synthétisé une librairie de cyclodextrines amphiphiles polycationiques (paCDs). (Schéma 22)

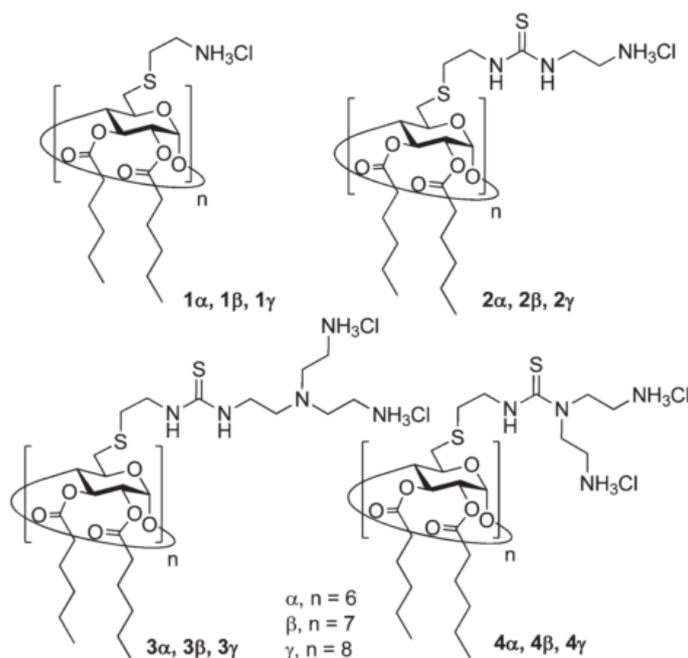


Schéma 22 : Structures des cyclodextrines amphiphiles polycationiques (paCDs) de 1 α , β , γ à 4 α , β , γ ¹³⁷

La capacité des différentes paCDs à former des nanoobjets avec l'ADN polymérisé (pDNA) a été examinée à des rapports de nombres de groupes d'azote / phosphate protonables (N/P) à 1, 2, 5 et 10. Ces formulations ont été caractérisées par :

1. électrophorèse en gel d'agarose pour leur capacité pour compacter et protéger l'ADN
2. DLS pour leur taille moyenne (Figure 39)
3. diffusion de la lumière par analyse de phase et mesure en mode mixte (M3-PALS) pour leur potentiel Zeta (Figure 39)
4. TEM pour leur morphologie

Les résultats d'électrophorèse en gel d'agarose (non présentés ici) ont pu montrer que toutes les paCDs étudiées sont capables de complexer totalement la pDNA à un ratio N/P ≥ 5 ¹³⁷.

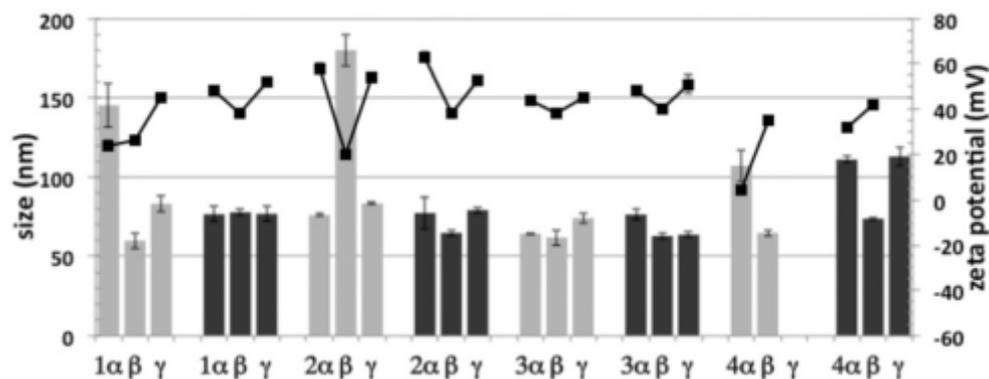


Figure 39 : Taille (axe de gauche ; sous forme de barre) et Potentiel Zeta (axe de droite ; sous forme de carrés noirs et de lignes) des paCDs à $N/P = 5$ (barres grises) et $N/P = 10$ (barres noires)¹³⁷

La taille des nanoparticules a été déterminée pour les complexes à $N/P = 5$ et 10 , c'est-à-dire ceux qui ont montré une complexation totale de la pDNA. Toutes les nanoparticules sont de petites tailles, comprises entre 60 et 80 nm, mise à part pour les 1α , 2β et 4α à $N/P = 5$ et 4α et 4γ à $N/P = 10$ avec des tailles de nanoparticules comprises entre 110 et 180 nm). Mais il n'y a pas de corrélation de tailles observée entre les différentes CDs (α , β et γ) ainsi qu'avec l'augmentation des chaînes sur la face secondaire. Les valeurs du potentiel Zeta montre une forte charge positive, ce qui est en accord avec un recouvrement total des chaînes d'ADN par les paCDs dans un agencement bien ordonné.

Une image de TEM du complexe a été obtenue et un schéma de la compaction proposé. (Figure 40)

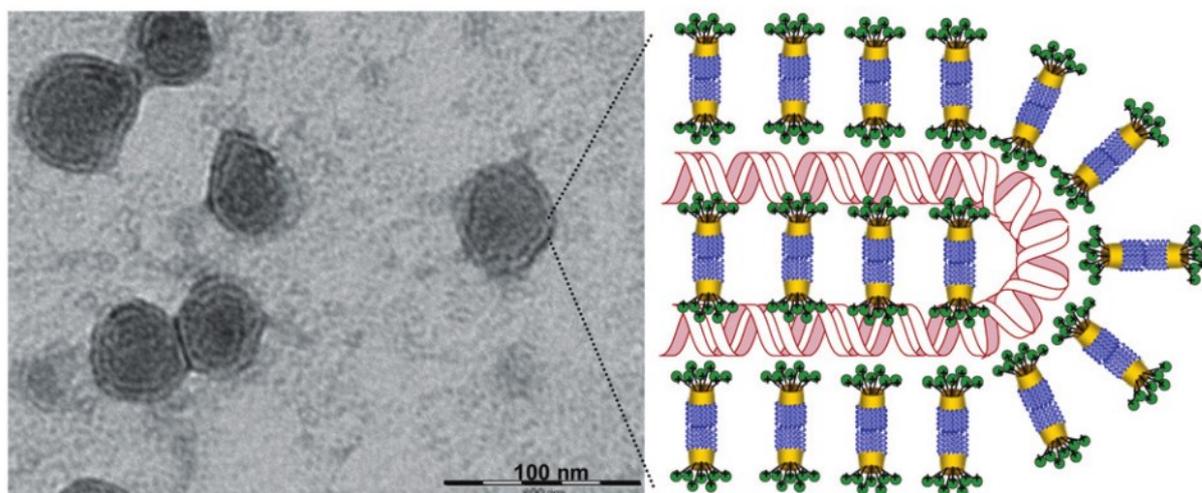


Figure 40 : Image de TEM du complexe de 3α à $N/P = 10$ (à gauche) et une représentation schématique de l'arrangement proposé alternatif de la pADN dans les bicouches de paCD¹³⁷

Dans tous les cas, une structure ultrafine révélant un arrangement alterné de haute (sombre) et basse (éclairé) région de densité d'électrons est observée comme c'est le cas pour la 3 α présentée ci-dessus (Figure 40). Les zones sombres représentent la chaîne d'ADN alors que les zones claires correspondent probablement à la bicouche de paCDs.

La délivrance *in vitro* de la pDNA, l'efficacité de transfection et la viabilité des cellules ont été évaluées (Figure 41). La transfection est le processus de transfert de gènes et correspond à l'introduction de matériel génétique exogène dans des cellules eucaryotes.

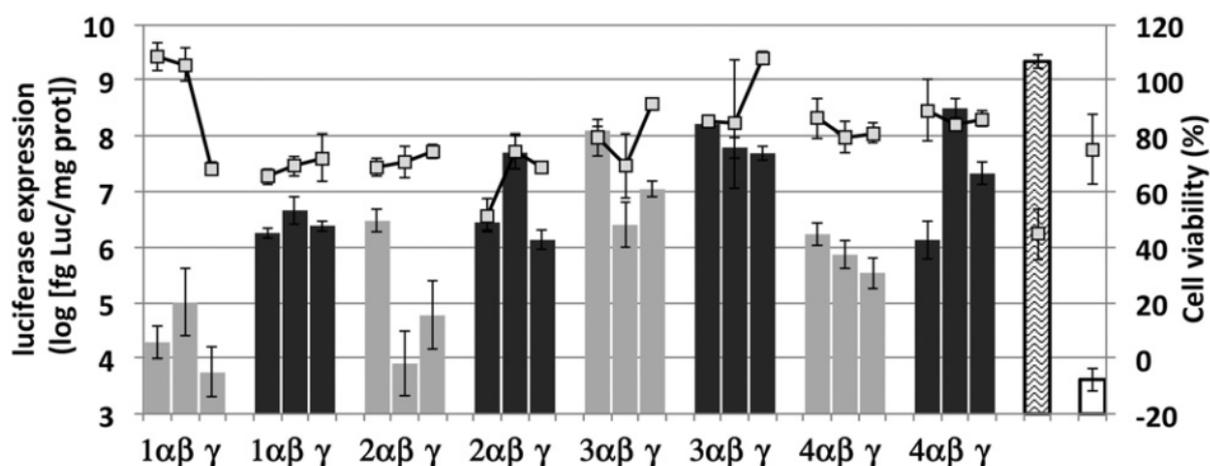


Figure 41 : Efficacité de la transfection de gène (axe gauche ; barres) et la viabilité cellulaire (axe droit ; carrés et lignes) des complexes préparés à partir des paCDs à N/P = 5 (barres grises) et N/P = 10 (barres noires)

Toutes les paCDs servent de médiateurs pour le transfert de gènes et l'expression sous les mêmes conditions à N/P = 5 et 10. Il a été montré que les N/P = 10 sont généralement plus efficaces que les N/P = 5. L'efficacité de transfection des complexes pa- β CDs à N/P = 10 suit la tendance $1\beta < 2\beta \approx 3\beta < 4\beta$ qui reflète leur efficacité relative dans la complexation réversible des groupes phosphates dans les chaînes de pDNA. Cependant, pour les complexes pa- α CDs et les pa- γ CDs la capacité de transfection suit la tendance $1\alpha,\gamma \approx 2\alpha,\gamma \approx 4\alpha < 4\gamma \ll 3\alpha,\gamma$.

En conclusion, les complexes pa- β CDs formulés à N/P = 10 montre une efficacité de transfection renforcée comparés aux complexes pa- α et γ CDs probablement due à la capacité de la cavité de la β -CD à accueillir du cholestérol augmentant ainsi la perméabilité des membranes. L'insertion de fonctions thio-urées et l'augmentation du nombre de centres cationiques primaires conduit à une amélioration significative du potentiel de transfection par augmentation de la stabilité des complexes de CD. Au regard de la taille de la CD, les données montrent que la plus petite plateforme α -CD manifeste la meilleure complémentarité

pour les chaînes du pDNA, qui commence à être particulièrement significative pour les formulations à $N/P = 5$.

III. Etudes sur modèle de Barrière Hémato-Encéphalique

C'est le physiologiste Paul Ehrlich, en 1885, qui découvrit l'existence de la Barrière Hémato-Encéphalique. En effet, l'injection d'un colorant vital dans la circulation sanguine de souris avait diffusé dans l'ensemble des organes mis à part le cerveau. Il a interprété cette observation par une faible affinité du colorant avec le tissu cérébral. C'est en 1913 que son étudiant, Edwin Goldmann, injecta le colorant dans le liquide céphalo-rachidien ce qui teinta l'ensemble du cerveau et ne diffusa pas dans la circulation sanguine. Il démontra donc qu'il existe une barrière entre le sang et le cerveau limitant la diffusion entre ces deux compartiments¹³⁸.

La BHE est une interface dynamique dont le rôle de filtre sélectif permet de maintenir l'homéostasie cérébrale nécessaire au bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales. Les capillaires cérébraux demeurent le site anatomique et sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales jointes reposant sur une membrane basale continue¹³⁸. (Figure 42)

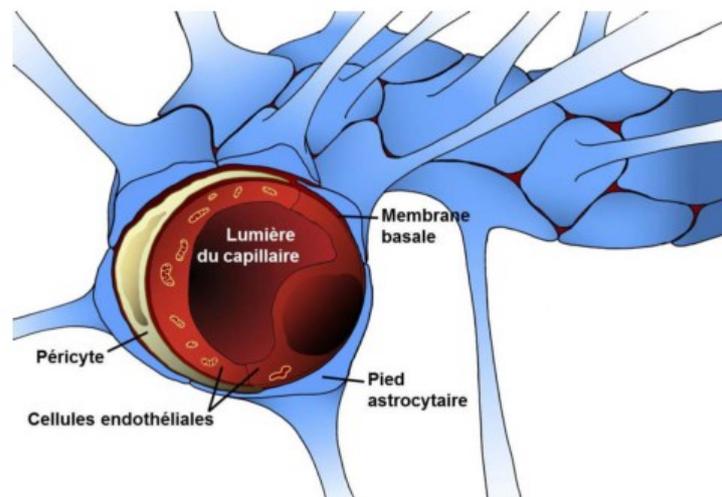


Figure 42 : Structure in vivo des capillaires cérébraux¹³⁸

La face interne des capillaires cérébraux est délimitée par les cellules endothéliales. Ces dernières sont intimement liées aux péricytes, enchâssés au sein de la membrane basale jouant un rôle majeur dans la mise en place et le maintien des propriétés de la BHE¹³⁹, avec lesquels

elles partagent une membrane basale commune servant de support, composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Les pieds astrocytaires émis par les astrocytes forment un manchon continu autour des capillaires cérébraux¹⁴⁰.

L'ensemble des éléments constituant les capillaires cérébraux contribue à l'élaboration d'une barrière à la fois physique et métabolique régulant les échanges entre le sang et le Système Nerveux Central (SNC) et assurant le maintien de l'homéostasie cérébrale.

De plus, cette barrière protège efficacement le SNC de composés toxiques. De ce fait, elle empêche l'acheminement de nombreux médicaments au cerveau. Les scientifiques ont développé différents modèles *in vitro* car il est difficile d'étudier les caractéristiques et la perméabilité de la BHE *in vivo*.

A. Modèles *in vitro*

Les modèles de BHE *in vitro* peuvent être classés en trois catégories :

- ✚ Les microvaisseaux cérébraux isolés
- ✚ Les modèles cellulaires
- ✚ Les modèles non cellulaires

1) Les microvaisseaux cérébraux isolés

Les microvaisseaux cérébraux isolés sont utilisés depuis longtemps pour l'étude des propriétés de la BHE. Cette méthode consiste en l'extraction des capillaires cérébraux soit de façon mécanique, soit en combinant la façon mécanique et enzymatique ou soit de façon uniquement enzymatique¹⁴¹. Ils présentent l'avantage d'être très proches de l'*in vivo* et ont permis de mettre en évidence quelques propriétés fondamentales des cellules endothéliales comme la présence de transporteurs et l'existence d'une polarité de la BHE¹⁴¹. Ce modèle a cependant des désavantages car il subit un découplage des chaînes respiratoires mitochondriales et les études de transport, généralement réalisées à partir du compartiment luminal, ne peuvent être effectuées qu'à partir du compartiment cérébral¹³⁸.

2) Les modèles cellulaires

Les modèles cellulaires nécessitent l'utilisation de matrices et de milieux de culture spécifiques permettant la croissance de ces cellules.

a) Les cultures endothéliales

Il y a eu plusieurs protocoles mis au point pour l'isolement et la mise en culture des cellules endothéliales cérébrales. Ces différentes méthodes suivent un schéma général en plusieurs étapes pouvant être résumé de la façon suivante. (Figure 43)

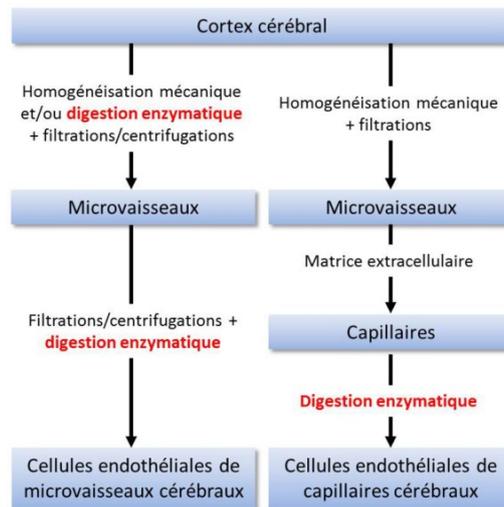


Figure 43 : Les deux principales méthodes d'isolement de cellules endothéliales à partir de micro- vaisseaux (à gauche) et de capillaires cérébraux (à droite)

Ces méthodes d'isolement suivent les mêmes grandes étapes à savoir : l'homogénéisation du tissu cérébral, l'isolement des microvaisseaux pour aboutir à l'isolement et la mise en culture des cellules endothéliales obtenues à partir des microvaisseaux.

b) Les cultures sur filtre

Le filtre est recouvert d'une matrice appelée « coating » permettant l'adhérence et la croissance des cellules endothéliales cultivées à sa surface. Le filtre est constitué d'une membrane microporeuse maintenue par une structure rigide.

De nombreux modèles de BHE *in vitro* ont pu être mis au point à partir de ce système. Il est donc possible de cultiver les cellules endothéliales seules (« soloculture ») ou avec d'autres types cellulaires. (Figure 44)

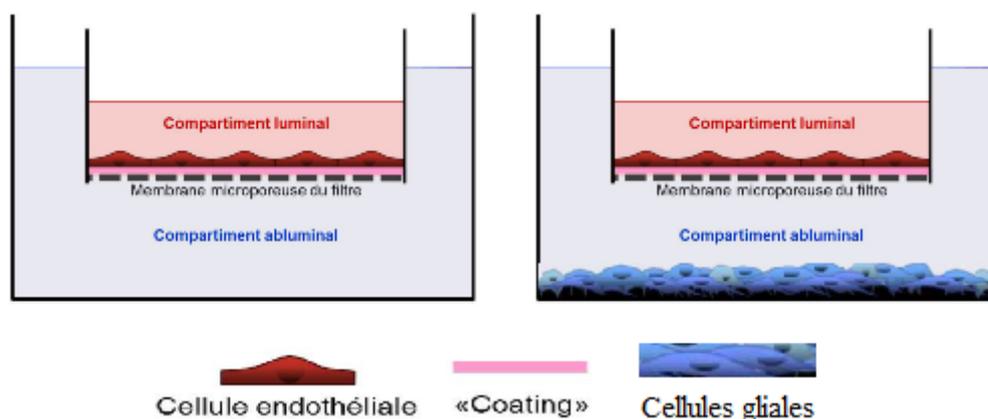


Figure 44 : Modèle *in vitro* basé sur la soloculture (à gauche) et basé sur la coculture entre cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et cellules gliales de rats. D'après¹³⁸

On distingue deux compartiments :

- ✚ Le compartiment luminal au niveau du filtre
- ✚ Le compartiment abluminal dans le puit en dessous de filtre

La présence de ces deux compartiments va permettre la coculture de cellules endothéliales-cellules gliales ou aussi de cellules endothéliales-péricytes. Des études de transport à travers la BHE vont ainsi pouvoir être réalisées.

3) Les modèles non cellulaires

Les membranes artificielles immobilisées (MAIS) ont été proposées pour la prédiction de la perméabilité de composés à travers la BHE¹⁴². Ce système ne mime pas les propriétés dynamiques des membranes biologiques telles que la diffusion latérale des lipides et ne tient compte que d'une seule monocouche phospholipidique. De ce fait, cette technique est limitée lorsque la molécule voit son transport restreint ou facilité par des protéines membranaires. En effet, elle ne peut pas prévoir la perméabilité d'une molécule à travers la BHE à part si son transport ne se fait que par diffusion passive¹⁴³.

Il existe aussi la technique des Parallel Artificial Membrane Permeability Assays (PAMPAs) qui a d'abord été développée pour prédire l'absorption gastro-intestinale de molécules. A partir de ce modèle, en modifiant la composition lipidique des membranes artificielles à l'aide d'un extrait lipidique de cerveau de porc, des BBB-PAMPA ont pu être formées¹⁴⁴. L'utilisation de ces modèles permet de déterminer la perméabilité de composés à travers la BHE. Cependant, ces PAMPAs présentent les mêmes inconvénients que les MAIS puisque seuls les composés transportés par diffusion passive pourront être étudiés.

Le fonctionnement et les caractéristiques de la BHE peuvent être étudiés par les différents modèles existants. Bien sûr, chacun d'eux a ses avantages et ses inconvénients et donc le choix du modèle est un choix primordial pour obtenir les informations recherchées. Les expériences *in vivo* sont indispensables mais elles se heurtent à des problèmes éthiques et de mise en œuvre. Les modèles *in vitro* constituent une approche plus aisée de la BHE et trouvent de nombreuses applications. L'utilisation de ces modèles va permettre la compréhension des interactions cellulaires et moléculaires au sein de la BHE, l'évaluation de la toxicité de composés, l'optimisation du passage de molécules d'intérêt, l'étude du transport de molécules à visée thérapeutique...

B. Modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* se divisent en deux grandes catégories :

- ✚ Les méthodes d'études invasives
- ✚ Les méthodes d'études non invasives

1) Les méthodes d'études invasives

Les principales méthodes d'études invasives sont énumérées dans la figure suivante. (Figure 45)

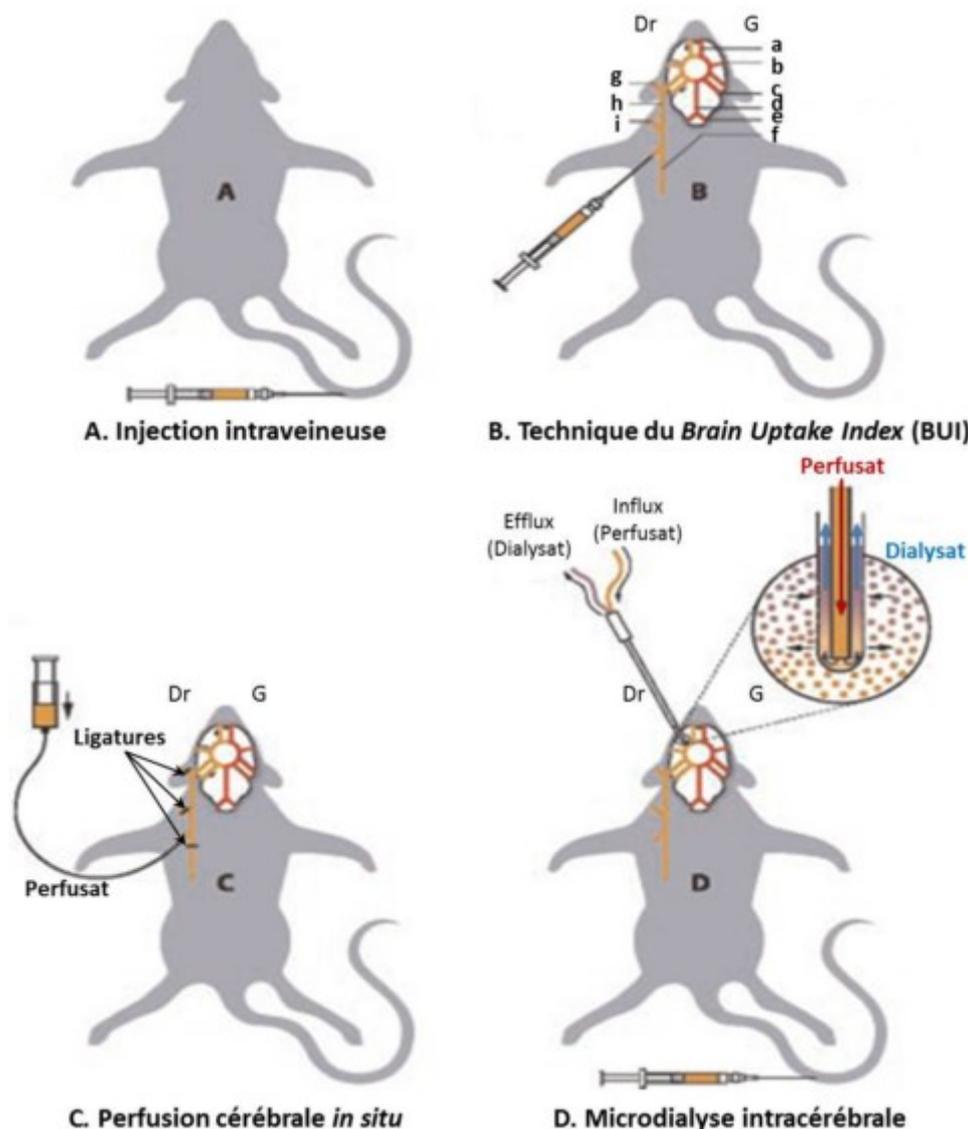


Figure 45 : Les principales méthodes d'études invasives de la BHE in vivo ¹³⁸

L'injection intraveineuse (Figure 45, [A]) est l'une des premières techniques employées pour l'évaluation du passage d'un composé à travers la BHE. Elle consiste à injecter par voie intraveineuse, au niveau de la queue, un bolus (dose de médicament injectée d'un seul coup) de concentration connue d'un composé marqué chez un animal (couramment rat ou souris). Puis, des prélèvements sanguins sont réalisés et l'animal est décapité afin de mesurer la quantité de molécules ayant atteint le cerveau¹⁴⁵. Cette technique permet une évaluation rapide et facile du passage de composé à travers la BHE sans grosse chirurgie mais nécessite toutefois un grand nombre d'animaux.

La technique du brain uptake index (BUI, indice d'absorption cérébrale)(Figure 45, [B]), est réalisée par injection du composé d'intérêt dans l'artère carotide qui draine le flux sanguin destiné à la face, la boîte crânienne et le cerveau. Ceci permet de s'affranchir de la

métabolisation du composé par les organes périphériques. Elle a été décrite pour la première fois en 1970 par Oldendorf¹⁴⁶. Elle consiste à injecter simultanément le composé radioactif testé (marqué au tritium ^3H) et une molécule de référence, aussi radioactive marquée au ^{14}C , connue pour passer facilement la BHE. Une mesure des concentrations cérébrales et plasmatiques des composés test et de référence est ensuite réalisée pour déterminer le BUI. Tout comme l'injection intraveineuse, elle est aisée à mettre en œuvre mais reste peu sensible pour les composés à faible perméabilité. Le problème majeur de cette technique est que la plupart de la dose injectée n'atteint pas le cerveau car une grande partie atteint l'artère carotide externe qui ne conduit pas au cerveau.

La perfusion de l'artère carotide interne (Figure 45, [C]) est une amélioration de la méthode BUI, puisqu'ici la totalité du composé est contrainte d'emprunter la circulation sanguine cérébrale via l'artère carotide interne. Ceci va donc nécessiter une intervention chirurgicale, contrairement aux deux précédentes techniques, qui consiste en la ligature des branches internes et externes de l'artère carotidienne¹³⁸. Cette méthode est très intéressante car en faisant varier la composition du perfusé, elle va permettre d'étudier un large éventail de facteurs.

La microdialyse intracérébrale (Figure 45, [D]) nécessite l'implantation d'une sonde dans le parenchyme cérébral d'un animal¹⁴⁷. Elle est constituée d'une membrane semi perméable et est irriguée par une solution physiologique. Suite à l'injection intraveineuse d'une molécule d'intérêt, ce système va permettre d'étudier la quantité de cette molécule qui a pénétré le parenchyme cérébral puisque la molécule va diffuser à travers la membrane de la sonde. Le recueil des échantillons à différents temps, grâce au milieu de perfusion qui est renouvelé continuellement, va permettre de réaliser une cinétique complète sur le même animal. Le dosage de la molécule d'intérêt est réalisé par la méthode analytique appropriée. Cette technique diminue considérablement le nombre d'expérimentation et donc d'animaux nécessaires, contrairement aux techniques citées précédemment. La mise en place de la sonde constitue son principal inconvénient. De plus, une variation des résultats est observée selon l'endroit où est posée la sonde, ce qui peut être vu comme un inconvénient mais aussi comme un avantage puisque ceci va permettre à l'expérimentateur de cibler la perméabilité de sa molécule sur une zone cérébrale particulière.

D'autres méthodes ont aussi été développées, non invasives, avec possibilité d'étendre leur utilisation à l'homme.

2) Les méthodes d'études non invasives

Les méthodes d'études non invasives utilisent des techniques d'imagerie comme :

- ✚ La tomographie par émission de positrons (ou positons)
- ✚ L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

La tomographie par émission de positrons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle pouvant être utilisée chez l'Homme ou chez l'animal. L'utilisation chez l'Homme va nécessiter un TEP-scan alors que chez l'animal un micro-TEP-scan sera utilisé. L'injection d'un radionucléide émettant des positons ou d'un composé test marqué avec un isotope est nécessaire. Le choix du traceur est réalisé selon l'objectif de l'étude. Le patient est placé dans le TEP-scan après avoir reçu une injection intraveineuse du radio-traceur. Le TEP-scan va donc détecter les photons émis lors de la destruction des positons permettant d'observer la distribution du traceur, en temps réel, dans le cerveau, avec une grande résolution spatiale. Par la suite, des techniques de reconstruction d'images qui représentent le cerveau en une série de coupes en temps réel vont permettre d'observer la cinétique d'entrée du traceur et de calculer la perméabilité de la BHE pour le composé étudié¹³⁸. C'est une technique *in vivo* très puissante qui permet d'obtenir de nombreuses informations tout en étant non invasive, rapide, très sensible et reproductible. Son usage est tout de même limité en raison du temps de demi-vie très courte des radioéléments et de leur coût onéreux.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique s'appuyant sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui n'implique pas d'irradiation contrairement au TEP. Elle se base sur la RMN des protons de l'eau contenus dans l'organisme. C'est-à-dire à l'observation de la réponse des noyaux d'hydrogène soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Elle nécessite l'utilisation d'un agent de contraste permettant d'augmenter l'intensité des signaux pour visualiser plus aisément les contrastes comme, par exemple, pour révéler les tissus lésés et les tumeurs. Ceci va donc permettre de réaliser le suivi de la progression des lésions de la BHE lors d'affections cérébrales telles que la sclérose en plaques et les accidents vasculaires cérébraux. L'agent de contraste généralement utilisé, par injection intraveineuse, est le Gadolinium qui pénètre la BHE lésée.

Iqbal et son équipe¹⁴⁸ ont décrit une méthode permettant de visualiser le passage d'un médicament encapsulé dans le parenchyme cérébral et de quantifier son transport à travers la BHE de manière non invasive.

L'étude du passage de molécules à travers la BHE et/ou l'intégrité de cette barrière peut être réalisée *in vivo*. Les méthodes non invasives applicables chez l'Homme sont très coûteuses, dépendent de la disponibilité de composés particuliers et nécessitent du matériel de pointe mais restent complexes à mettre en place lorsqu'il s'agit d'étudier le transport de molécules à moyen et haut débit. C'est en cela que les modèles *in vitro* et *in vivo* trouvent leur complémentarité.

L'étude bibliographique nous a montré la richesse des techniques physicochimiques disponibles afin de réaliser toutes sortes d'études intéressantes. Les études présentées quant à l'influence de la structure des CDs amphiphiles ont montré des modifications du caractère tensioactif, du comportement à l'interface air-eau, de la taille et morphologie des autoassemblages, de l'encapsulation et aussi de la complexation et des propriétés de délivrance. Il y a donc un intérêt de réaliser une étude structure/activité. Dans le cadre d'un partenariat avec les laboratoires du BMBI et du GEC de Compiègne, différentes techniques physicochimiques vont pouvoir être mises en œuvre afin d'étudier l'effet de la structure des CDs amphiphiles, synthétisées au laboratoire du LG2A, sur les interactions avec des membranes biomimétiques. Puis, une étude d'intégrité et de transport sur un modèle de BHE *in vitro* sera réalisée. Ceci sera une application directe de nos composés sur ce type de modèle.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

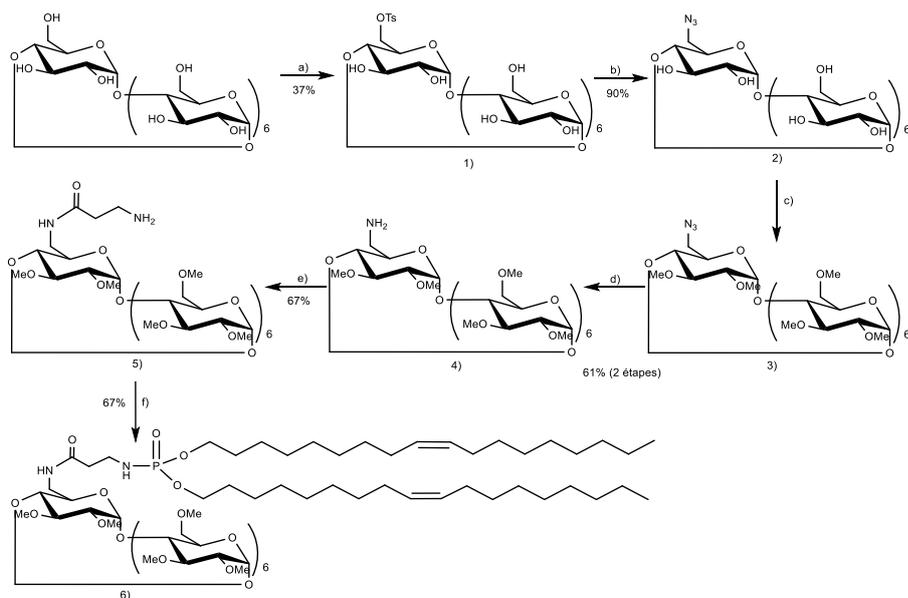
I. Voie de synthèse et produits obtenus

La famille de composés choisie pour cette étude est celle qui a déjà été abordée au sein de notre laboratoire par Cédric Gervaise¹⁰, les phosphoramidyls β -CDs.

A. Synthèse des phosphoramidyl- β CDs

Etant donné que mon projet concerne une étude structure/activité, une librairie de composés a été synthétisée en modifiant, tout d'abord, les longueurs de chaînes des composés puis en modifiant la tête polaire.

Cédric Gervaise avait décrit une voie de synthèse linéaire pour aboutir à la phosphoramidyl- β CD perméthylée ayant deux chaînes aliphatiques de type oléyle (C18 :1) (Schéma 23)



a) NaOH, CuSO₄, TsCl, t. amb (4h). H₂O; b) NaN₃, 80°C (4h). H₂O; c) NaH, MeI, 0°C à t. amb (24h). DMF anhydre; d) PPh₃, NH₃ aq. t. amb (24h). DMF anhydre; e) i. Fmoc- β -alanine, HOBT, DIC, t. amb (24h). DMF anhydre. ii. Pipéridine, 90°C (2h). DMF anhydre; f) Dioleyle phosphite, DIPEA, Bromotrichloromethane. CH₂Cl₂ anhydre sous Ar. 1h à 0°C et 1h à T amb.

Schéma 23 : Voie de synthèse linéaire de la phosphoramidyl- β CD-C18 :1

Comme pour toute CD mono-modifiée, l'étape clef de la synthèse est l'obtention de la β -CD monomodifiée par encapsulation du composé sulfoné dans la cavité de la CD en ayant le soufre pointé vers l'extérieur de la cavité à proximité des alcools primaires. (Schéma 24)

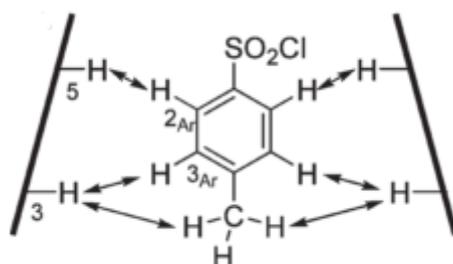


Schéma 24 : Représentation schématique d'une des possibilités de l'orientation du TsCl dans la cavité de la β -CD ³⁷

Les travaux de Law et de son équipe³⁷ ont pu montrer que l'utilisation du cuivre Cu^{2+} dans l'eau permet d'orienter la réaction, entre le chlorure de paratoluène sulfonyle (p-TsCl) et la β -CD, uniquement, vers l'obtention de la β -CD monotosylée en position 6. Nous avons donc opté pour ce mode opératoire et avons obtenu le composé d'intérêt avec un rendement d'environ 37%. Ensuite une réaction de substitution va permettre de déplacer le groupement tosyle par l'azoture de sodium dans l'eau avec un rendement de 90%³⁵. Ensuite, l'azido β -CD, est totalement méthylée³⁵ puis le groupement azoture est réduit en amine par la réaction de Staudinger (61% sur les deux étapes)³⁵. Ensuite, le bras espaceur (β -alanine-Fmoc) est greffé par couplage peptidique en utilisant le couple HOBT/DIC, comme agents de couplage, et l'amine est déprotégée par la pipéridine¹¹ (67%). Lors de l'étape de déprotection, il faut purifier le produit sur résine échangeuse d'ions. Cette purification est assez fastidieuse, et n'a pas conduit au produit totalement pur comme le spectre RMN ¹H le montre. (Figure 46)

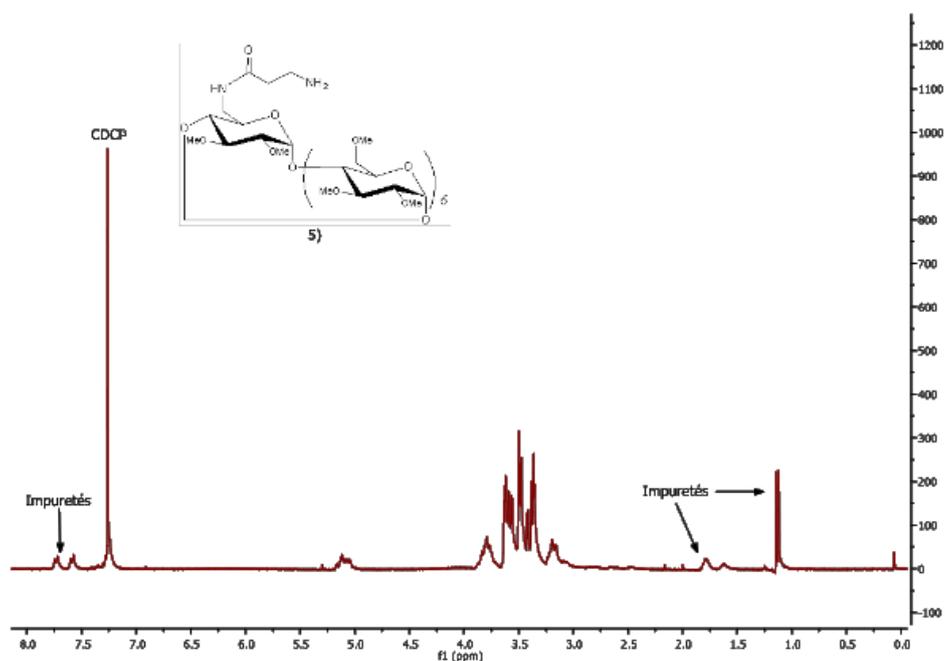


Figure 46 : Spectre RMN ¹H du composé 5) après purification sur résine échangeuse d'ion

La dernière étape est la réaction de Todd-Atherton¹⁴⁹ entre la β Ala β -CD perméthylée (5) et le dioléyl phosphite qui permet d'obtenir notre phosphoramidyl-CD (6)¹¹. Cette réaction est réalisée en condition anhydre, elle est difficile à mettre en œuvre et quelques fois, le produit n'est pas obtenu. De plus, cette voie de synthèse a permis, uniquement, d'obtenir phosphoramidyl β -C18:1 dont voici le spectre RMN après purification sur colonne de silice. (Figure 47)

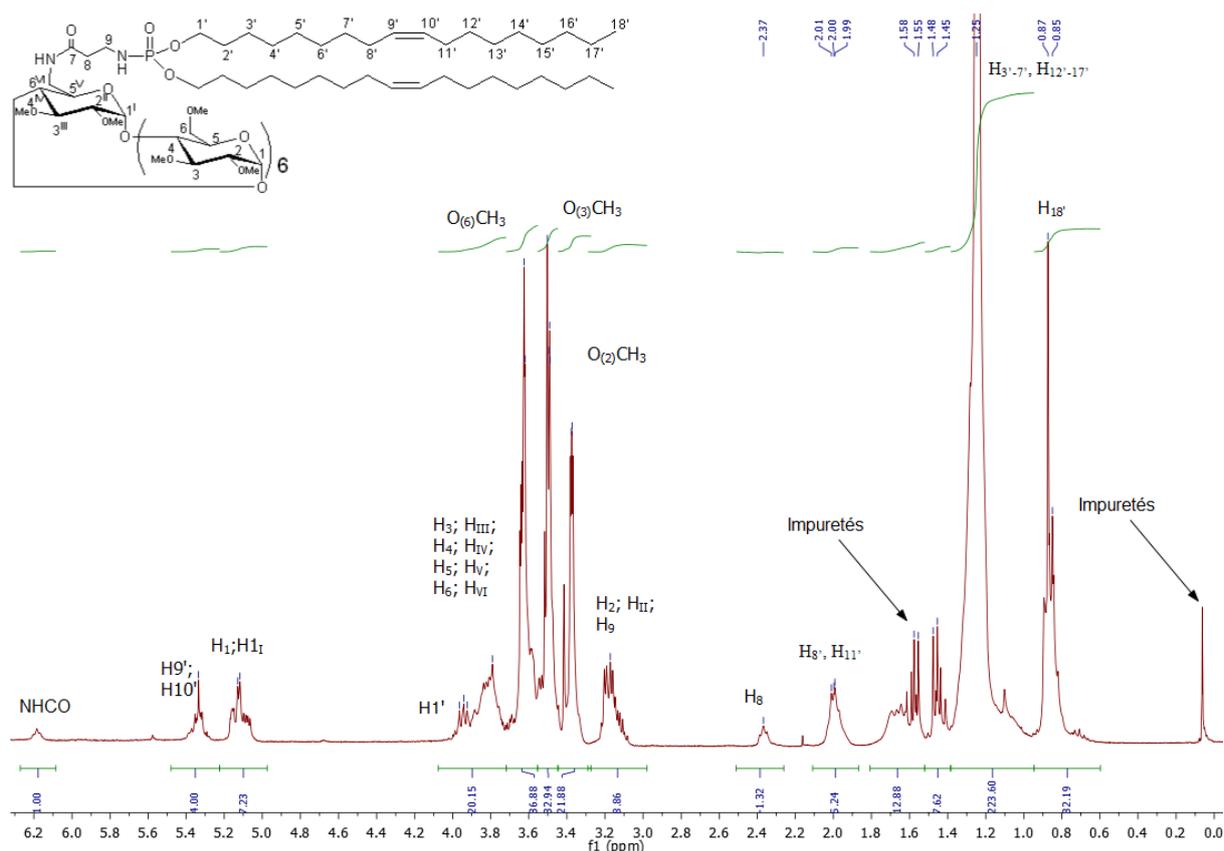


Figure 47 : Spectre RMN ^1H de (6) dans le CHCl_3

Nous pouvons observer sur ce spectre RMN ^1H la présence d'impuretés qui n'ont pas été retirées par purification. Ce spectre RMN ^1H nous montre aussi qu'il y a une incohérence avec les intégrations de la chaîne aliphatique. En effet, ce spectre nous donne une intégration d'environ 224 protons (H) pour les CH₂ des deux chaînes aliphatiques alors que l'on devrait avoir une intégration de 44 H. La même chose est observée pour les protons des deux CH₃, intégration attendue de 6 H alors qu'une intégration d'environ 32 H est observée. Nous avons donc pensé qu'il restait du phosphite C18:1 dans le milieu, pour vérifier cela nous avons réalisé un spectre RMN du phosphore (^{31}P). (Figure 48)

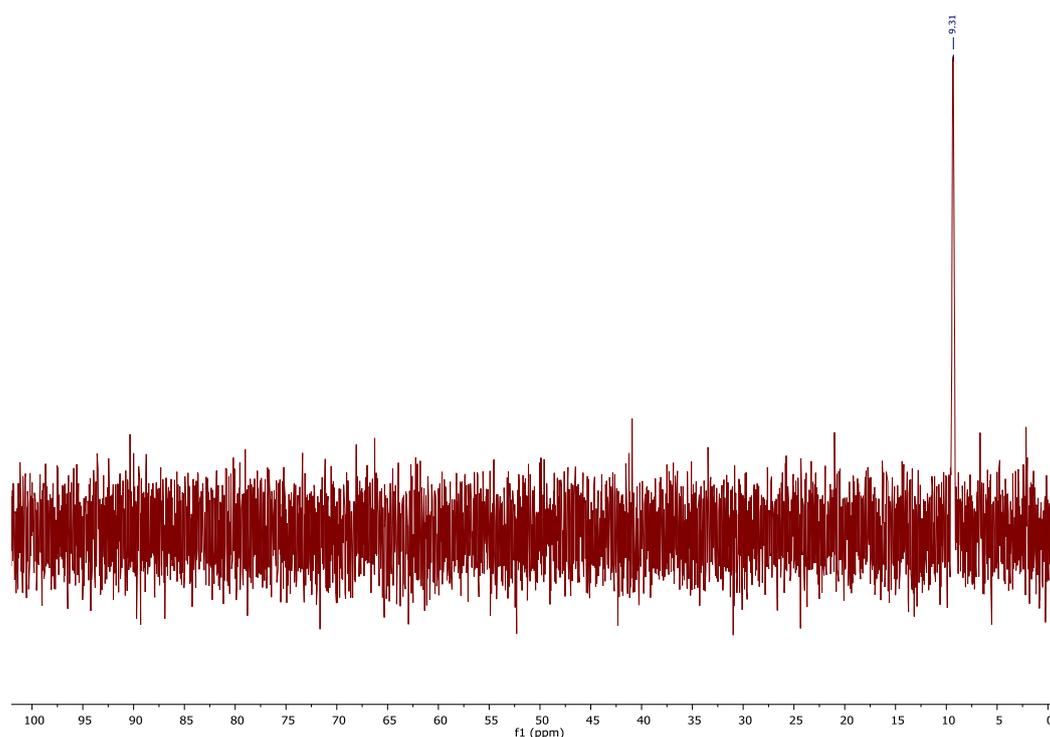


Figure 48 : Spectre RMN ^{31}P de (6)

En sachant que le phosphore couple avec l'hydrogène, si notre hypothèse est juste alors, nous devrions obtenir un doublet (pour le phosphite) et un singulet pour la fonction phosphoramide. Le spectre présente un singulet spécifique de la fonction phosphoramide et aucun doublet n'est observé. Ce grand nombre d'intégrations observés sur le spectre RMN ^1H ne provient donc pas de la présence de phosphite de départ dans le milieu.

Il a donc fallu remédier à ce problème ainsi qu'au problème d'obtention de molécules avec des longueurs de chaînes variées car cette voie de synthèse permettait seulement d'obtenir la $\beta\text{-C18:1}$. De ce fait, une nouvelle voie de synthèse convergente a été élaborée conduisant à la synthèse d'une librairie de composés. (Schéma 25)

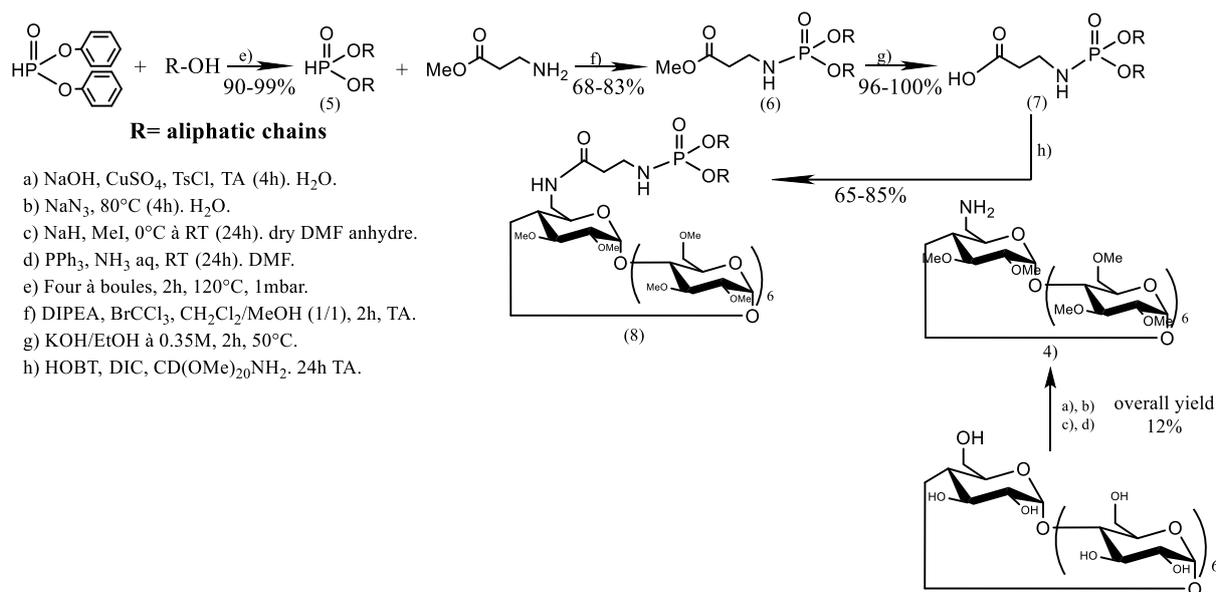


Schéma 25 : Voie de synthèse convergente permettant l'obtention de phosphoramidyl β-CD

Nous avons donc synthétisé nos phosphoramidyl β-CD suivant cette voie de synthèse convergente. Dans un premier temps, la monoaminée β CD perméthylée est synthétisée comme dans la voie de synthèse précédente (Schéma 23)³⁴⁻³⁷. En parallèle, le bras espaceur portant les chaînes aliphatiques (7) est synthétisé. Premièrement, la réaction de transestérification entre le diphenyle phosphite et différents alcools gras comme le dodécanol (C₁₂H₂₆O), le tétradécanol (C₁₄H₃₀O), l'héxadécanol (C₁₆H₃₄O) et l'octadécanol (C₁₈H₃₈O) est conduite pour obtenir le composé (5), avec les différentes longueurs de chaînes citées, avec un excellent rendement variant de 90 à 99%. Cette réaction est réalisée dans un four à boules qui va permettre de déplacer l'équilibre de la réaction. En effet, le phénol formé au cours de la réaction est évaporé et cristallisé dans les boules restées à l'extérieur du four. (Schéma 26)

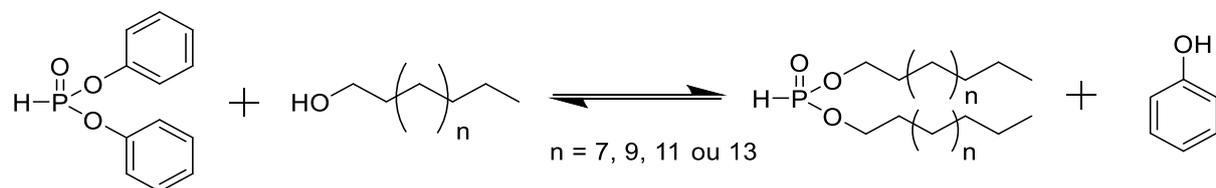


Schéma 26 : Equilibre de la réaction de transestérification

Cette méthode permet de réaliser une réaction sans solvant et facile à mettre en œuvre avec de bons rendements. Aucune purification n'est nécessaire à cette étape. Ensuite, le composé (5, Schéma 25) est couplé avec le bras espaceur par la réaction de Todd-Atherton qui est une réaction de couplage entre un phosphite et une amine primaire¹⁴⁹ en utilisant les conditions

réactionnelles proposées par Mével *et al*^{150,151}. Cette réaction passe par la formation d'un dialkylhalogénophosphate qui réagit ensuite sur l'amine pour donner, par substitution nucléophile, le phosphoramide correspondant. Troev et son équipe¹⁵² ont proposé un mécanisme pour la formation de l'intermédiaire dialkylbromophosphate. (Schéma 27)

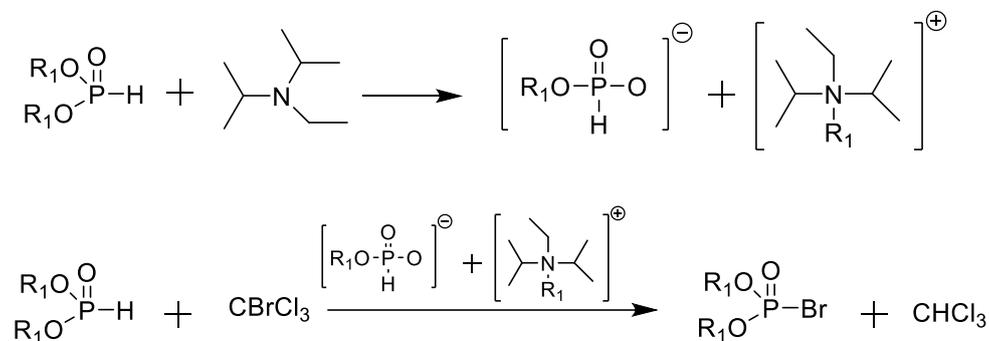


Schéma 27 : Mécanisme possible de formation de l'intermédiaire dialkyle halogénophosphate

Tout d'abord, le phosphite réagit avec la base pour donner un sel de monoalkylphosphonate d'alkylammonium. Il a été montré qu'il jouait le rôle de catalyseur dans la réaction entre le phosphite et le bromotrichlorométhane (CBrCl₃), ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire dialkylbromophosphate. L'utilisation du CBrCl₃ permet l'introduction d'un brome qui rend l'intermédiaire phosphate plus réactif, pour la substitution nucléophile avec l'amine primaire, que son homologue chloré formé en utilisant le CCl₄ à la place de CBrCl₃. Cette réaction appliquée à nos produits conduit à des rendements satisfaisants allant de 68 à 83% après purification sur colonne de silice.

Le produit (6, Schéma 25) va subir une saponification de son ester de méthyle pour obtenir l'acide carboxylique correspondant en présence de potasse alcoolique. Ensuite, le composé (7, Schéma 25) est couplé avec la β-CD perméthylée monoaminée par couplage peptidique dans des conditions classiques avec les dérivés de CDs. Les CDs amphiphiles voulues sont ainsi obtenues avec de bon rendement compris entre 65 et 85%. La librairie de composés obtenus en série β-CD est ainsi résumée (Schéma 28).

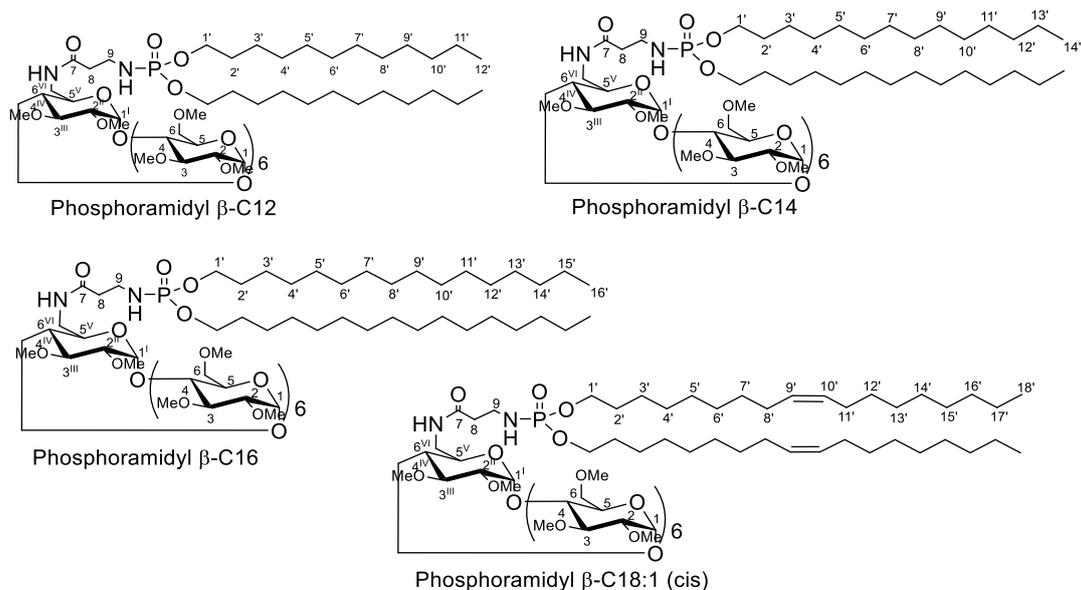


Schéma 28 : Phosphoramidyl β -CDs obtenues

Le spectre RMN ^1H de la phosphoramidyl β -C18:1 a été enregistré pour sa caractérisation complète. (Figure 49)

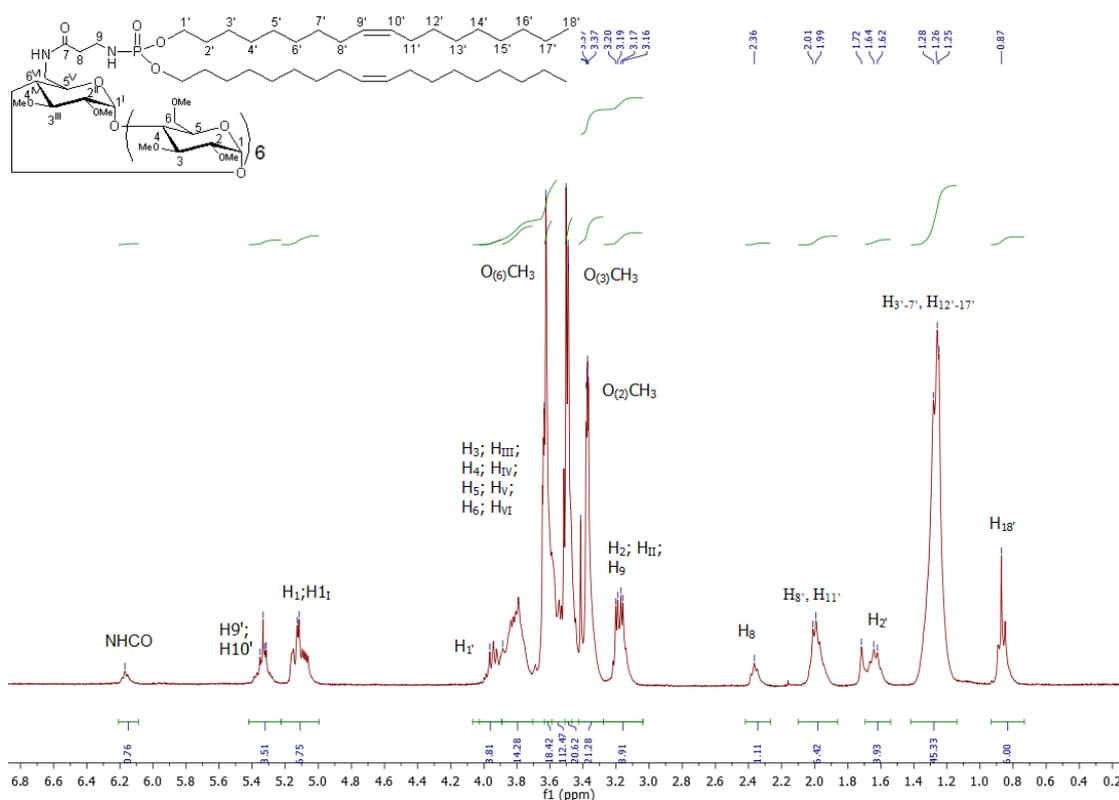


Figure 49 : Spectre RMN ^1H de la phosphoramidyl β -C18:1 dans le CHCl_3

En comparant, ce spectre avec celui obtenu avec la voie linéaire, nous observons le pic du proton 8 qui n'était pas observé. Les intégrations des CH_2 des chaînes aliphatiques ainsi que

des CH₃ correspondent avec le nombre de protons attendus. Cette voie de synthèse, nous a permis de remédier aux problèmes de synthèse rencontrés et nous a permis d'obtenir des produits purs, de longueurs de chaînes variées, comme en témoigne le spectre RMN ¹H de la phosphoramidyl β-C12. (Figure 50)

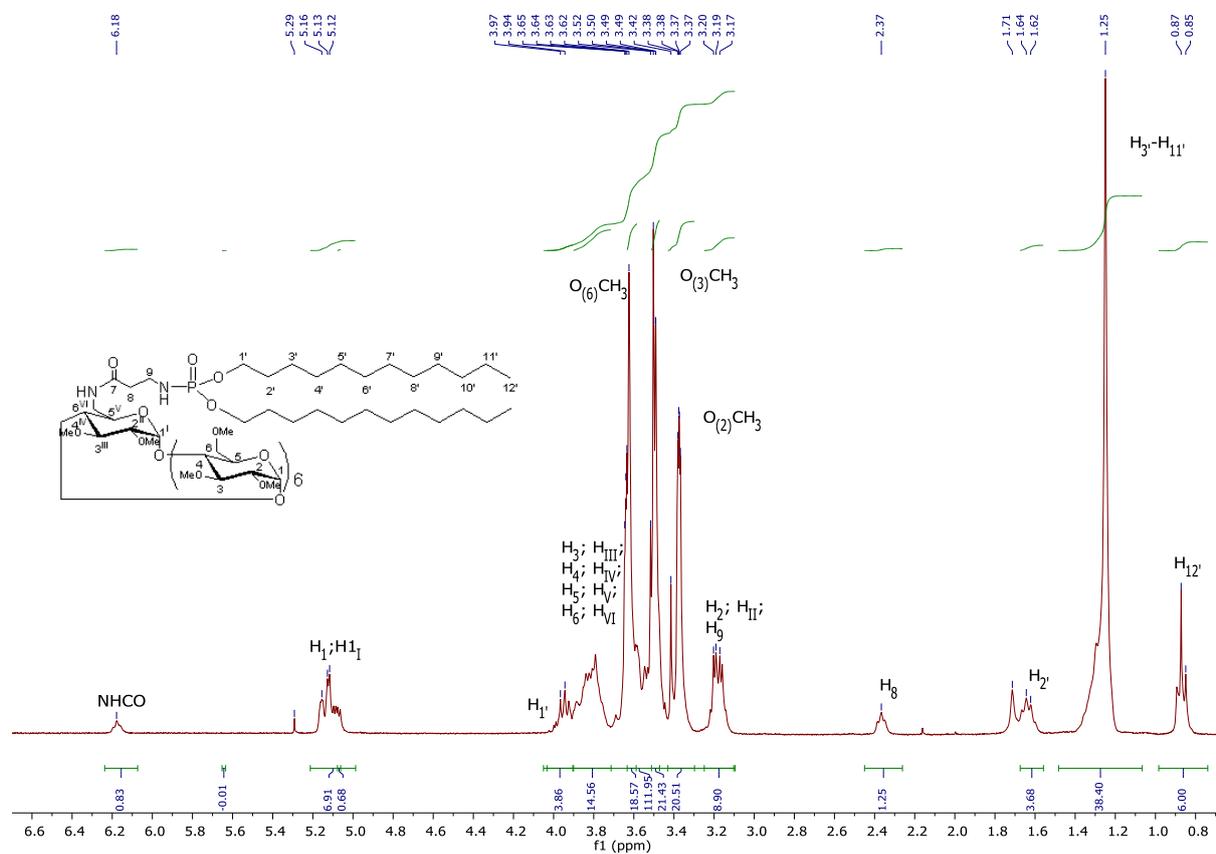


Figure 50 : Spectre RMN 1H de la phosphoramidyl β-C12 dans le CHCl₃

La Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS) a aussi été utilisée pour montrer la structure exacte de notre composé β-C12. (Figure 51)

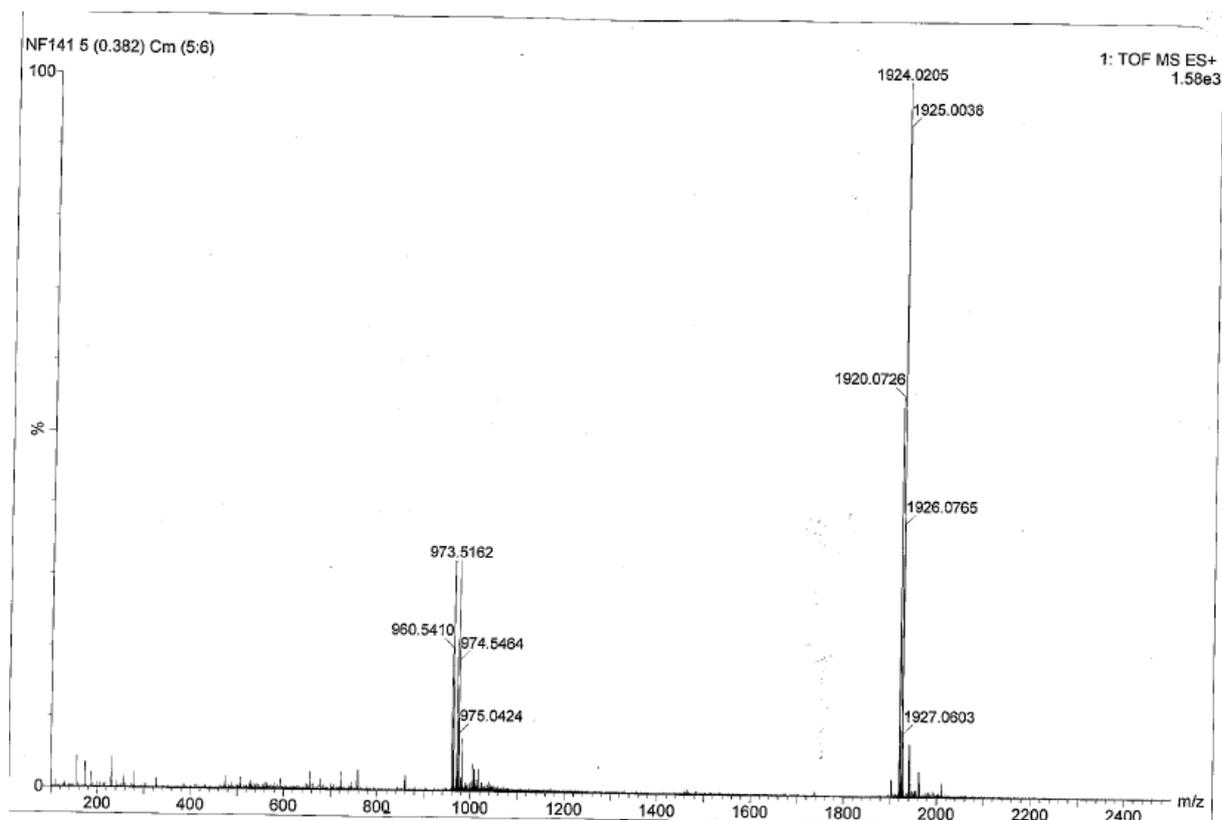


Figure 51 : Spectre HRMS de la phosphoramidyl β -C12

Nous observons deux amas isotopiques, celui vers 973, 5162 g/mol correspond à la molécule dichargée avec deux Na^+ ($\frac{1901+2 \times 23}{2} = 973,5 \text{ g/mol}$), quant à celui à 1924,0205 g/mol, il correspond à la molécule avec un Na^+ ($1901 + 23 = 1924 \text{ g/mol}$). La HRMS atteste bien de la pureté de ce composé. L'absence de signaux entre 0 et 2500 g/mol donne une indication de la pureté du produit.

Une dernière caractérisation a été mise en œuvre en utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). (Figure 52)

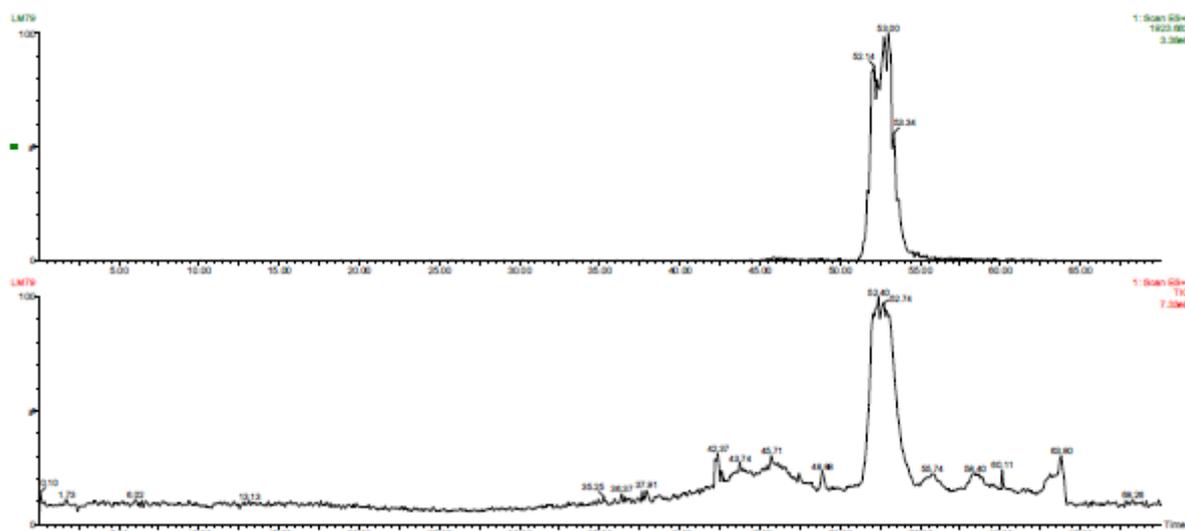


Figure 52 : Spectre LCMS de la phosphoramidyl β -C12

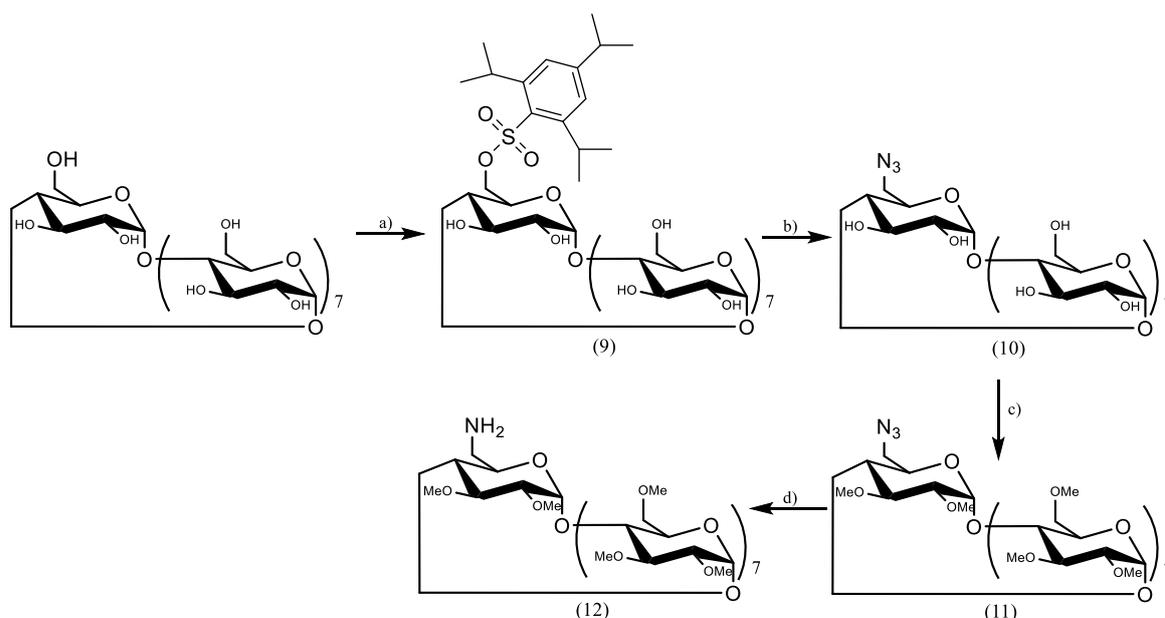
Toutes les techniques de caractérisation ont montré la grande pureté de la β -C12 ainsi que des autres composés qui ont été synthétisés.

B. Synthèse des phosphoramidyl- γ CDs

Après avoir effectué des modifications au niveau des longueurs de chaîne, nous nous sommes intéressés à la modification de la tête polaire en utilisant une γ -CD à la place de la β -CD.

Il est connu que la γ -CD possède une plus grande cavité que la β -CD, de ce fait, l'utilisation du chlorure de para toluène sulfonyle n'est plus adapté car cela va conduire à une polysulfonation de la γ -CD¹⁵³. Une étude sur la monofonctionnalisation de la γ -CD par des dérivés sulfonates a été réalisée par Palin et son équipe¹⁵⁴. Ils ont pu montrer que l'utilisation du chlorure de 2,4,6-triisopropylbenzènesulfonyle dans la pyridine donne la γ -CD monomodifiée avec le meilleur rendement et la meilleure pureté décrit dans la littérature. De plus, il a été rapporté que l'utilisation de la pyridine forme un complexe de pyridinium avec la cavité de la CD et dirige la réaction vers la position 6 alors que dans le diméthylformamide (DMF) la sulfonation a lieu sur les deux faces de la CD¹⁵⁴.

Après ce constat, nous avons donc opté pour l'utilisation du mode opératoire mis en œuvre par Palin et son équipe¹⁵⁴ (Schéma 29). Ceci nous a permis d'obtenir le composé voulu et de poursuivre la synthèse jusqu'à l'obtention de la monoaminée γ -CD perméthylée, avec un rendement global de 5 % sur 4 étapes, en utilisant les mêmes étapes que pour la β -CD. (Schéma 29)



a) 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, Pyridine. TA, 24h.

b) NaN_3 , DMF. 80°, 24h.

c) NaH, MeI, DMF anhydre. 0°C, TA, 24h.

d) PPh_3 , NH_3 aq, DMF. 0°C, TA, 24h.

Schéma 29 : Voie de synthèse pour l'obtention de la monoaminée γ -CD perméthylée (12)

Ensuite, nous avons réalisé le couplage peptidique entre (12, Schéma 29) et (7, Schéma 25). Ceci a conduit à l'obtention de phosphoramidyl γ -CD avec des longueurs de chaînes variées. Pour les phosphoramidyl γ -CD, nous nous sommes limités à synthétiser les composés en C12 et C14 avec, respectivement, un rendement sur la dernière étape de 52 et 54 %. (Schéma 30)

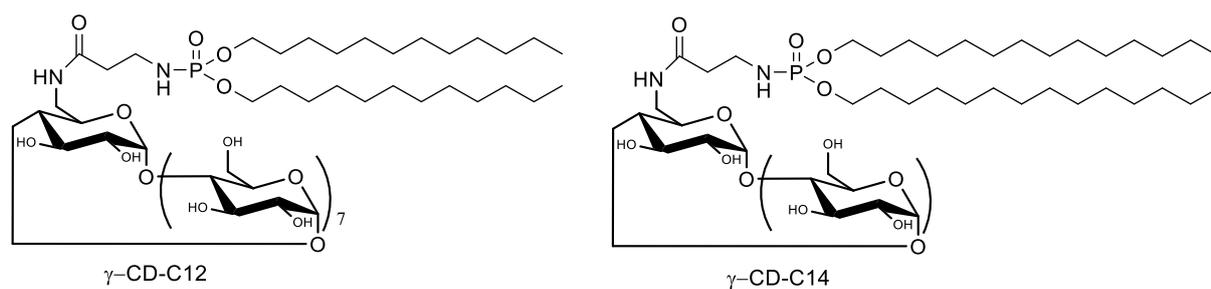


Schéma 30 : Phosphoramidyls γ -CDs obtenus

Ces produits ont également été caractérisés par RMN et ils ont montré une bonne pureté comme le montre la Figure 53.

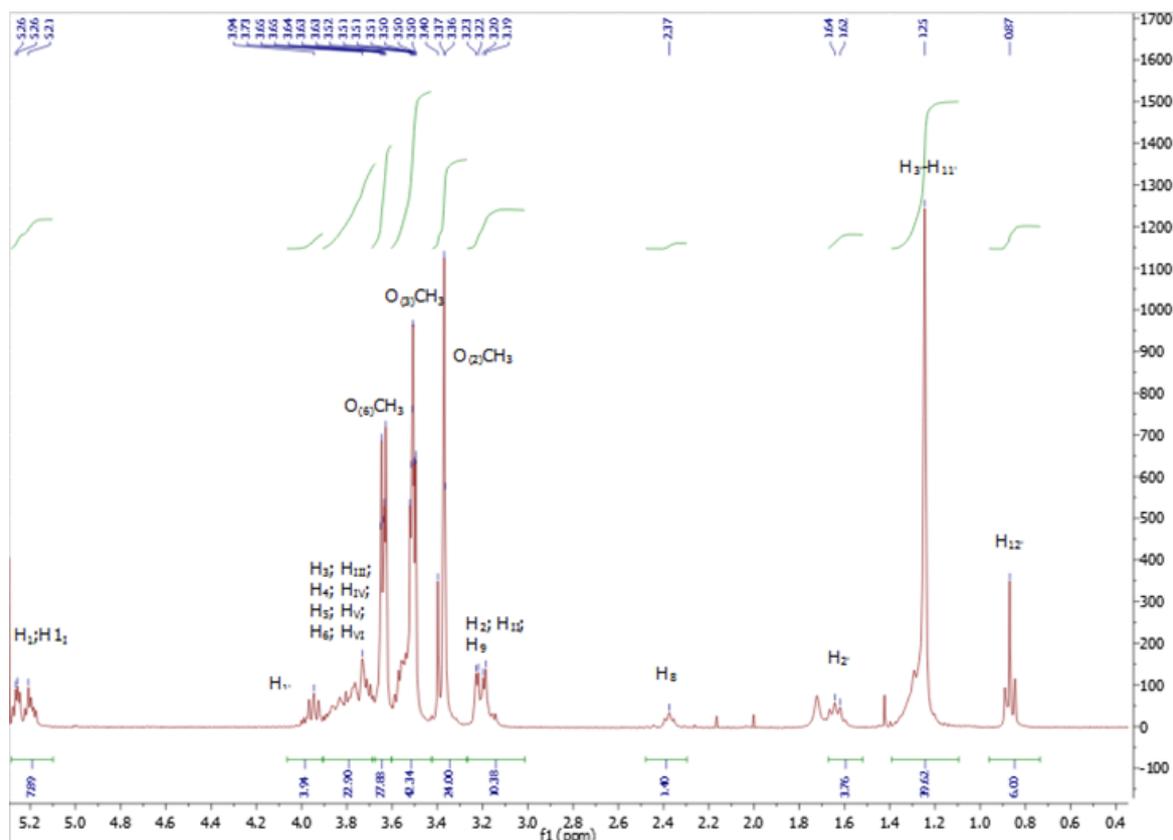


Figure 53 : Spectre RMN ^1H de la γ -C12 dans CHCl_3

Le faible rendement pour obtenir la monoaminée γ -CD perméthylée limite l'accès à une grande quantité de ces produits. De ce fait, les tests de physicochimie n'ont pas pu être réalisés sur ces composés.

C. Synthèse des phosphoramidyls glucoses

Pour continuer sur la modification de la tête polaire, nous avons choisi le glucose qui est un monomère de la CD perméthylée monoaminée qui permettra de comparer avec son homologue oligosaccharidique, la CD. Nous avons donc transposé la voie de synthèse utilisée pour la synthèse des phosphoramidyls β et γ -CDs. (Schéma 31)

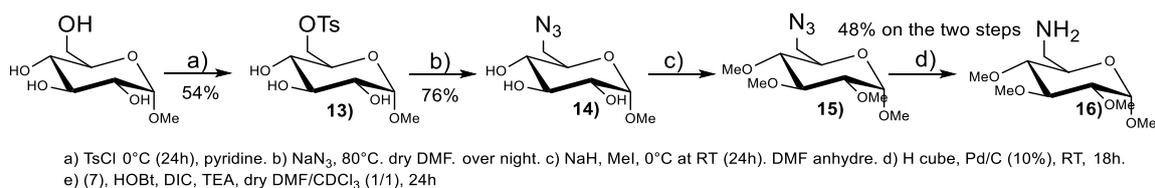


Schéma 31 : Voie de synthèse suivie pour la synthèse des phosphoramidyls glucoses

Pour rendre la caractérisation plus facile et pour être assez proche de la structure des cyclodextrines, nous sommes partis de l' α méthyle glucose. Après la tosylation de la position 6 par le chlorure de para toluène sulfonyle avec 54 % de rendement et son déplacement par l'azoture de sodium avec 76 % de rendement, les hydroxyles restants ont été méthylés et nous avons réduit le groupement azoture en amine. En dernier lieu, nous couplons le glucose monoaminé (16, Schéma 31) avec le (7, Schéma 25) avec des rendements sur l'étape du couplage peptidique de 67 à 86 %. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir plusieurs phosphoramidyls glucoses avec des longueurs de chaînes variées. (Schéma 32)

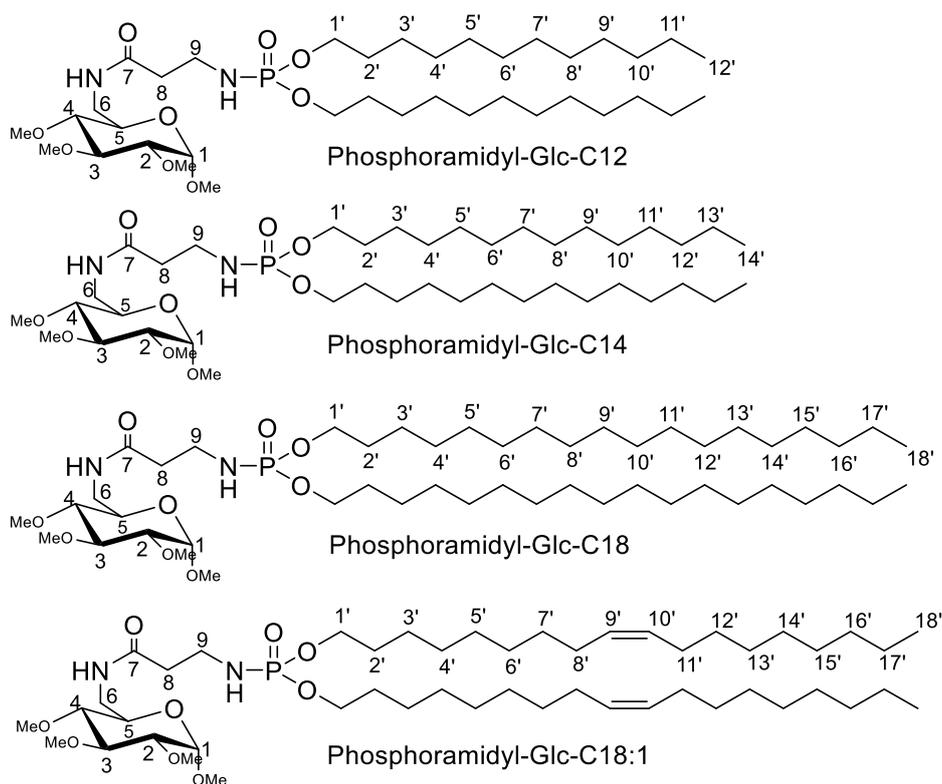


Schéma 32 : Les phosphoramidyls Glucoses obtenues

Chacun de ces composés ont été caractérisés par RMN et ont montré une bonne pureté comme le Glc-C14. (Figure 54)

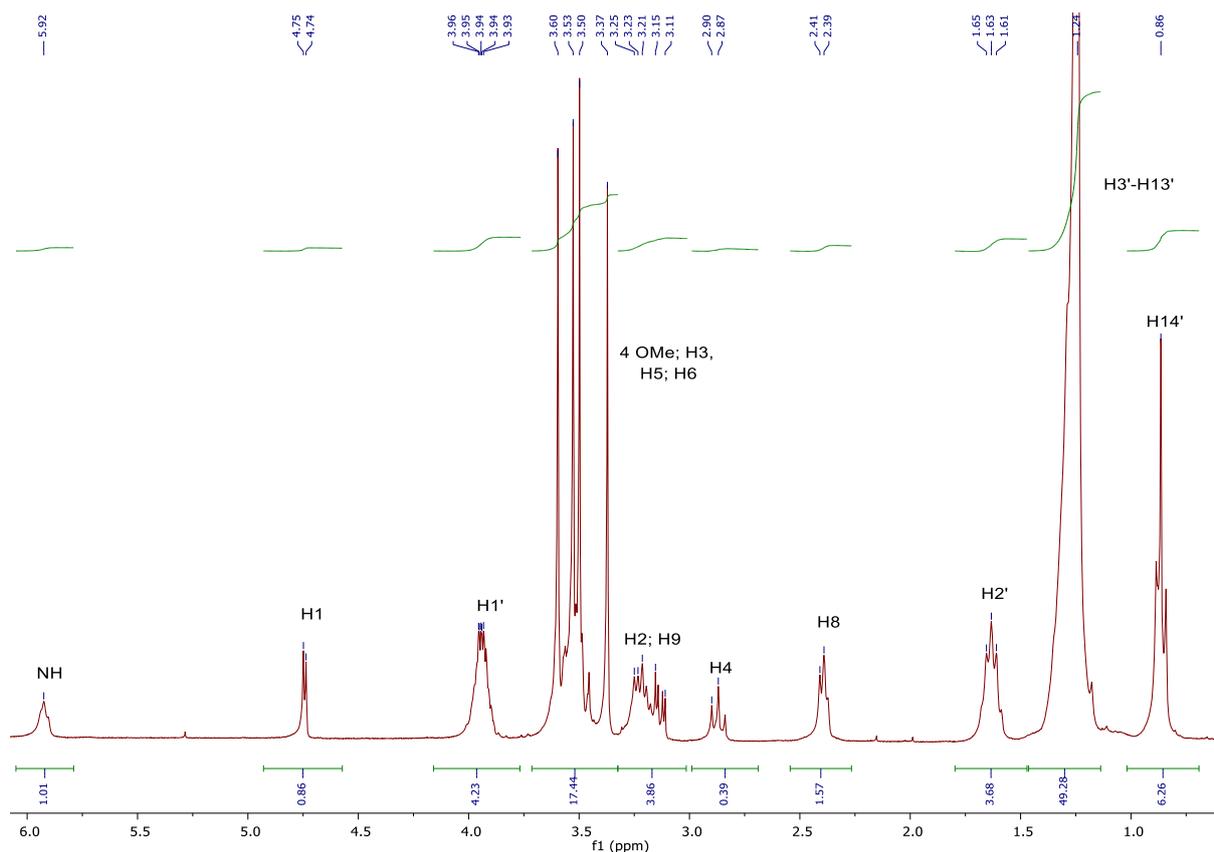


Figure 54 : Spectre RMN ^1H du Glc-C14 dans le CHCl_3

Ces composés n'étant pas soluble dans l'éthanol, ils n'ont pas pu être testés lors des tests physicochimiques. Ceci montre d'emblée l'importance de la CD dans cette structure.

II. Etudes physicochimiques des composés synthétisés

Les études physicochimiques ont été uniquement réalisées sur les phosphoramidyl β -CDs car elles se sont avérées les plus faciles à obtenir en quantité suffisantes avec des propriétés de solubilité en solution aqueuse indispensables aux études physico-chimiques.

A. Etude du caractère tensioactif

1) Détermination de la Concentration d'Agrégation Critique (CAC)

Tout d'abord, la CAC de nos composés a été déterminé pour connaître leur caractère tensioactif. Ainsi, nos molécules ont été injectées dans un puits en Téflon à différentes concentrations et la tension superficielle de l'eau est ensuite mesurée à l'aide de la balance de Wilhelmy. Les tensions superficielles obtenues pour chaque concentration vont nous

permettre de déterminer la CAC, en traçant la courbe de variation de la tension superficielle en fonction du logarithme décimal de la concentration du tensioactif en solution.

Ainsi nous avons pu déterminer la CAC pour chacun de nos composés comme dans le cas de la phosphoramidyl β -C12. (Figure 55)

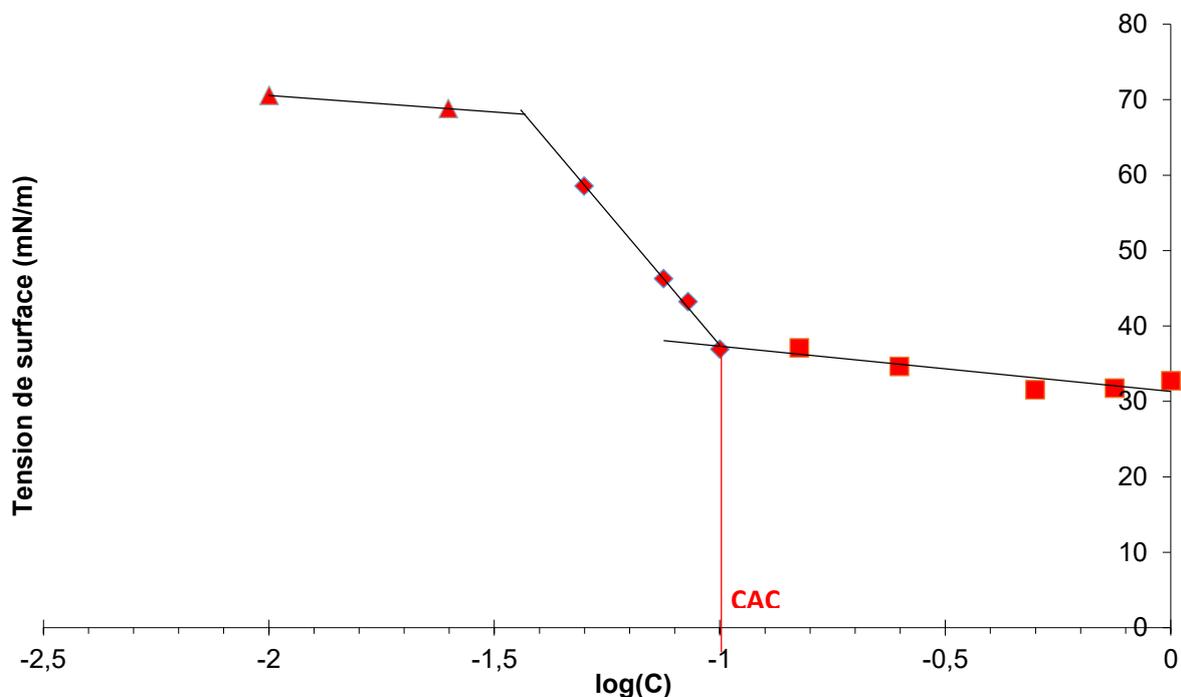


Figure 55 : Détermination de la CAC de la phosphoramidyl β -C12 à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

D'après ce graphique et les équations de droites nous avons pu calculer la CAC de ce composé, ainsi que celles des autres phosphoramidyls β -CDs. Les valeurs des CAC sont récapitulées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs de CAC des phosphoramidyl β -CD obtenues à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Phosphoramidyl β -CD	CAC (nM)
C12	101
C14	284
C16	199
C18:1	358

Ces résultats montrent de faibles valeurs de CAC pour chacun des composés ce qui prouve que chacun des composés testés forme des agrégats (ou micelles) à de faibles concentrations.

En se plaçant à une concentration supérieure à la CAC de chaque composé, des mesures de DLS ont été réalisées afin de confirmer la formation de ces autoassemblages en ajoutant, dans une cuve contenant 1mL de tampon phosphate, 25 μ L d'une solution à 5 mM (dans l'éthanol) du composé à analyser. (Tableau 11)

Tableau 11 : Détermination de la taille des autoassemblages à 21°C à une concentration de 37,5 μ M

Phosphoramidyl- β -CD	Size (d.nm)	PdI
C12	514	0,27
C14	387	0,19
C16	440	0,25
C18:1	430	0,08

La formation des autoassemblages est ainsi bien démontrée par DLS et des tailles variant de 387 nm pour le C14 à 514 nm pour le C12 ont été mesurées pour les agrégats spontanés obtenus.

2) Isothermes de compression des phosphoramidyls- β CDs

Par cette étude, nous allons obtenir, par simple tracé de l'isotherme de compression (π -A), des informations sur la capacité des composés à former des monocouches et à rester de manière stable à l'interface au cours de la compression, cela va également nous permettre d'obtenir l'aire moléculaire, les phases de la monocouche et les pressions de collapse des différents composés. (Figure 56)

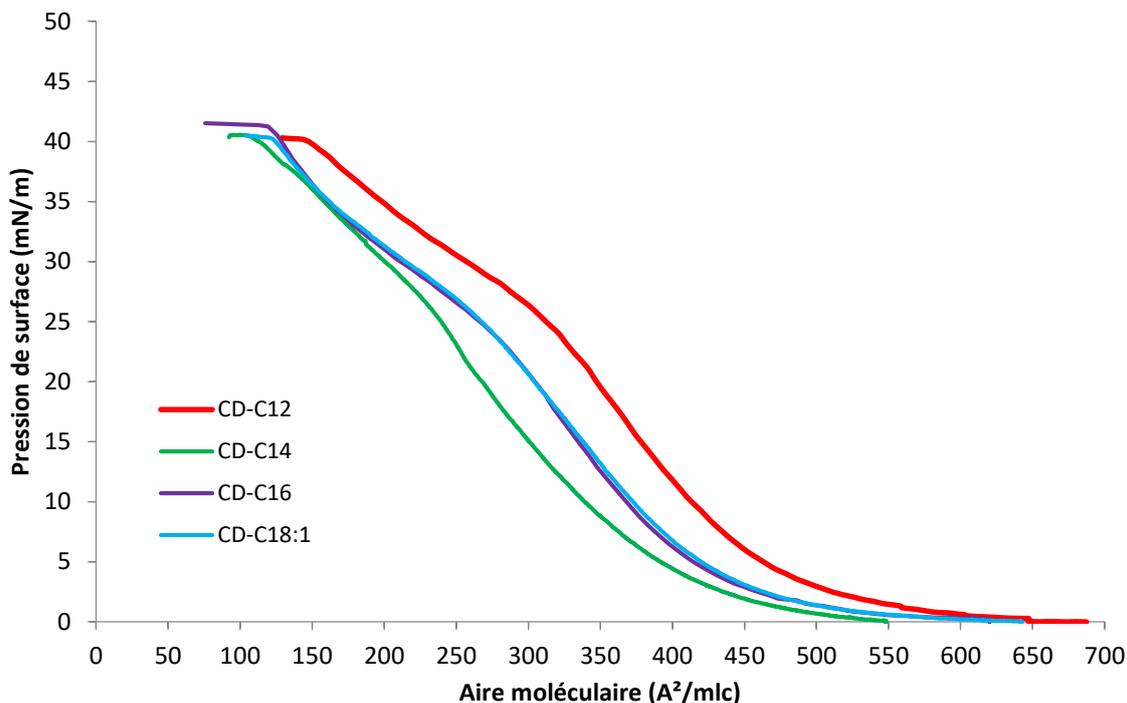


Figure 56 : Isotherme de compression des phosphoramidyls β -CDs à 21°C sur l'eau pure

L'obtention de ces isothermes de compression nous montre que chacun des composés forme une monocouche stable à l'interface air-eau. Au regard de ces isothermes, nous observons un pseudo-plateau pour chacune d'entre elles. Comme discuté auparavant (voir chapitre II.A.1.c)), l'observation d'un changement de phase sur l'isotherme indique un changement structural de la monocouche. De ce fait, nos composés se réarrangent au sein de la monocouche et ceci rejoint les résultats obtenus par Bauer et son équipe⁷⁹ pour la monocholestéryle β -CD. Vu l'allure similaire des profils d'isotherme entre nos composés et leur monocholestéryle β -CD, nous pouvons émettre l'hypothèse que nos composés subissent le même réarrangement que leur monocholestéryle β -CD. (Figure 57)

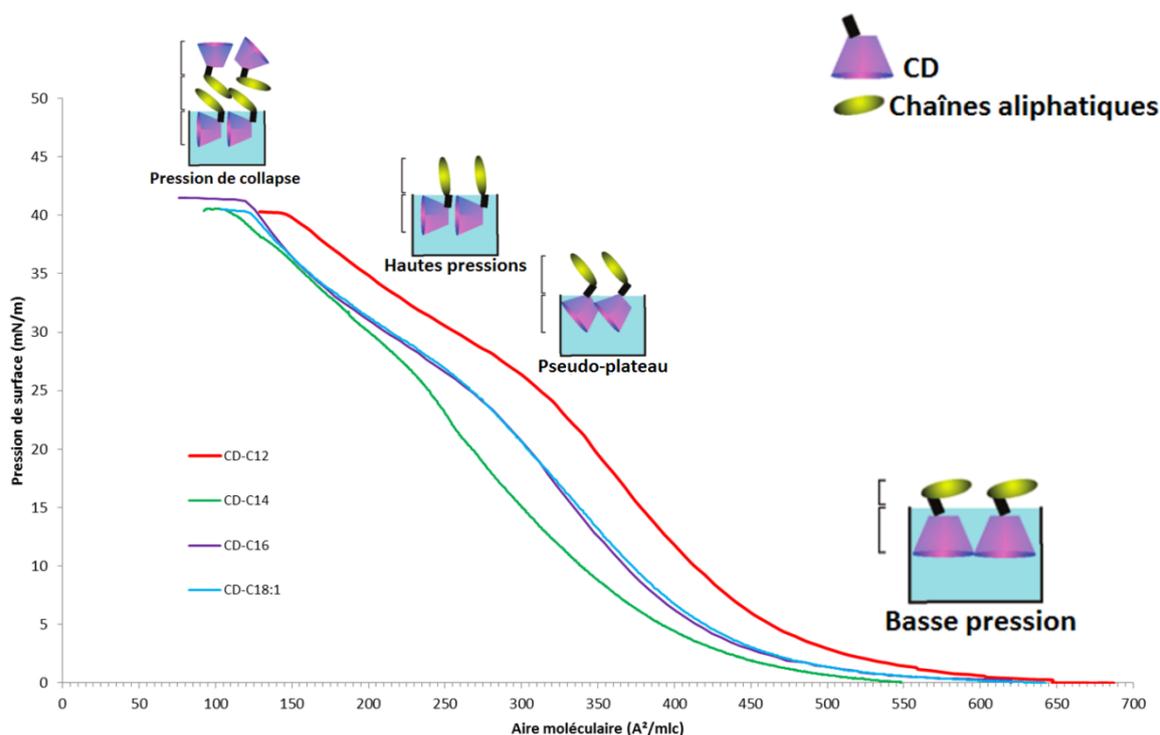


Figure 57 : Hypothèse pour l'organisation des molécules au sein de la monocouche durant la compression

Nous avons aussi pu déterminer les aires moléculaires des composés en projetant la valeur de 30mN/m (pression latérale des membranes biologiques¹⁵⁵) sur l'axe des abscisses par rapport à l'isotherme de compression. (Tableau 12)

Tableau 12 : Aires moléculaires des phosphoramidyls β -CDs prises à 30 mN/m d'après les isothermes de compression

Phosphoramidyl- β -CD	Aire moléculaire (\AA^2 /molécule)
C12	284
C14	201
C16	211
C18:1	215

En comparant, par exemple, l'aire moléculaire de la β -C16 avec son homologue phospholipidique, la DPPC¹⁰⁴ (2 chaînes de 16 carbones), nous trouvons une aire moléculaire de 211 \AA^2 alors que la DPPC à une aire moléculaire d'environ 54 \AA^2 . Cela signifie que seule la partie CD est responsable de cette grande valeur d'aire moléculaire. Les aires moléculaires de nos composés sont comparables à l'aire moléculaire de la TBSC ($\approx 200 \text{\AA}^2$ à 30 mN/m)⁷⁹.

Sur les isothermes de compression, nous avons pu aussi déterminer les pressions de collapse pour chacun des composés. L'ensemble des résultats ont été réunis dans ce tableau. (Tableau 13)

Tableau 13 : Pressions de collapse des phosphoramidyls β -CDs

Phosphoramidyl- β -CD	Pression de collapse (mN/m)
C12	40
C14	41
C16	40
C18:1	40

Ces hautes pressions de collapse témoignent de la stabilité de la monocouche à l'interface air-eau comme celle obtenue pour la TBSC (≈ 35 mN/m)⁷⁹

A partir de ces isothermes de compression et de la formule du module d'élasticité (Ks), nous avons pu déterminer le Ks de chacune des molécules pour ainsi connaître l'état physique de notre composé à l'intérieur de la monocouche. Voici le tracé du Ks pour la β -C12. (Figure 58)

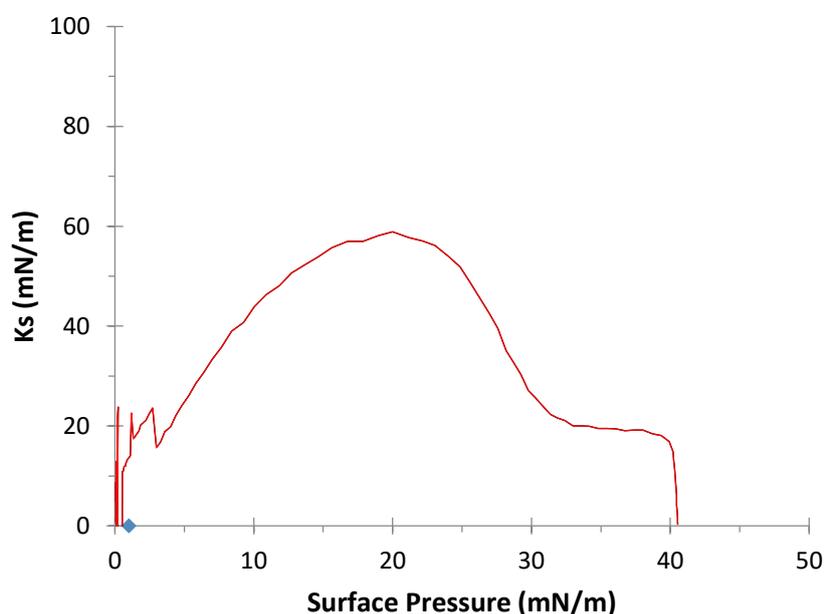


Figure 58 : Tracé du module d'élasticité de la β -C12

Les valeurs du Ks à une pression de surface de 30 mN/m pour chacun des composés ont été récapitulées dans le tableau suivant. (Tableau 14)

Tableau 14 : Valeurs du module d'élasticité des phosphoramidyls β -CD à 30 mN/m

Phosphoramidyls β -CDs	Ks (mN/m)
C12	20
C14	27
C16	19
C18 :1	19

Etant donné que le Ks est ici inférieur à 100mN/m, ceci signifie que notre molécule reste en phase liquide expansée tout au long de la compression¹⁵⁶ (Figure 58). Et il en est de même pour les autres molécules testées.

Ensuite, nous avons réalisé des images de la monocouche à différentes pression de surface à l'aide du Microscope à l'angle de Brewster. (Figure 59)

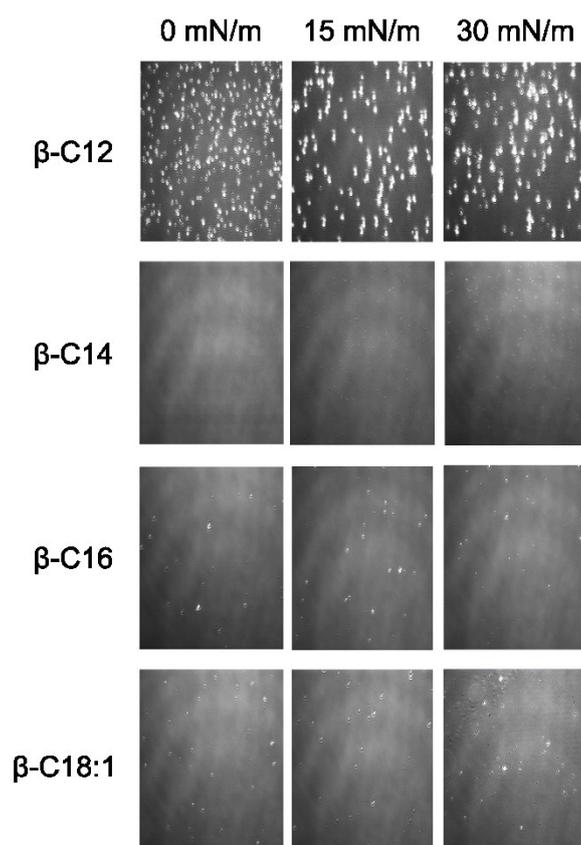


Figure 59 : Images BAM des β -C12, C14, C16 et C18 :1 à différentes pression de surface sur une sous phase d'eau pure thermostatée à 21°C

Ces images montrent que l'ensemble des composés présentent des taches blanches plus ou moins intenses. La même observation avait été faite par Klaus et son équipe⁶⁴ lors de l'étude de leur dicholestéryl β -CD (TBdSC) à l'interface air-eau. Ils avaient pu conclure que ceci était

dû à la formation d'agrégats de leur composé à l'interface. On peut remarquer qu'aucun domaine ou phase n'est observé tout au long de la compression. Ce résultat confirme bien que nos molécules restent en phase liquide expansée comme déterminé auparavant. Des images BAM ont aussi été réalisées sur la POPC pur mais n'ont pas fourni d'information complémentaire.

Dans le but de formuler des vésicules mixtes de nos composés avec la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) comme vecteur membranaire, nous avons donc réalisé des isothermes de compression à différents ratios molaires CD/POPC. Ceci va permettre de nous renseigner sur le type de mélanges entre ces deux composés (favorable ou défavorable).

3) Isothermes de compression des phosphoramidyls- β CDs en mélange avec la POPC

Les isothermes obtenues à partir du mélange β -C12/POPC ont été tracés. (Figure 60)

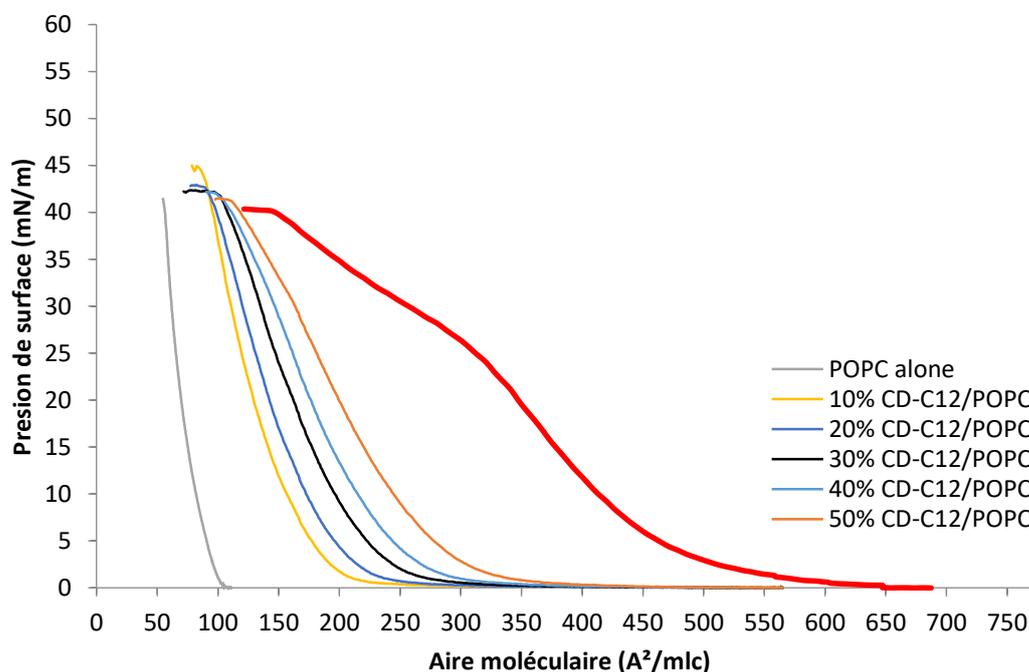


Figure 60 : Isothermes de compression du mélange phosphoramidyl β -C12 avec la POPC

A partir de ces isothermes obtenues pour chacun des composés, nous avons pu déterminer les aires moléculaires, les pressions de collapse et les Ks de chaque ratio molaire.

Nous avons pu ainsi avoir une idée de l'idéalité du mélange en traçant l'aire moléculaire en fonction du % en CD (Figure 61).

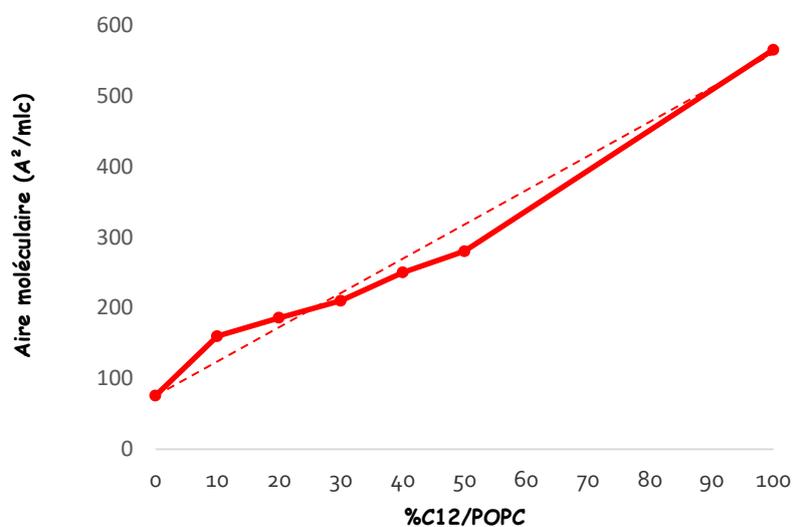


Figure 61: Représentation de l'aire moléculaire en fonction du % molaire de β -C12/POPC

La courbe suit la droite d'idéalité du mélange (droite en pointillé), ceci laisse entendre qu'il n'y a pas d'interaction particulière, pas de répulsion ni d'attraction, entre la β -C12 et la POPC aux différents ratios molaires. La même chose a été observée pour les autres composés. Ce résultat mérite d'être confirmé ou infirmé par le calcul de la variation d'énergie libre du mélange (ΔG_{ex}).

Le ΔG_{ex} a donc pu être déterminé pour l'ensemble des composés testés en mélange avec la POPC. (Figure 62)

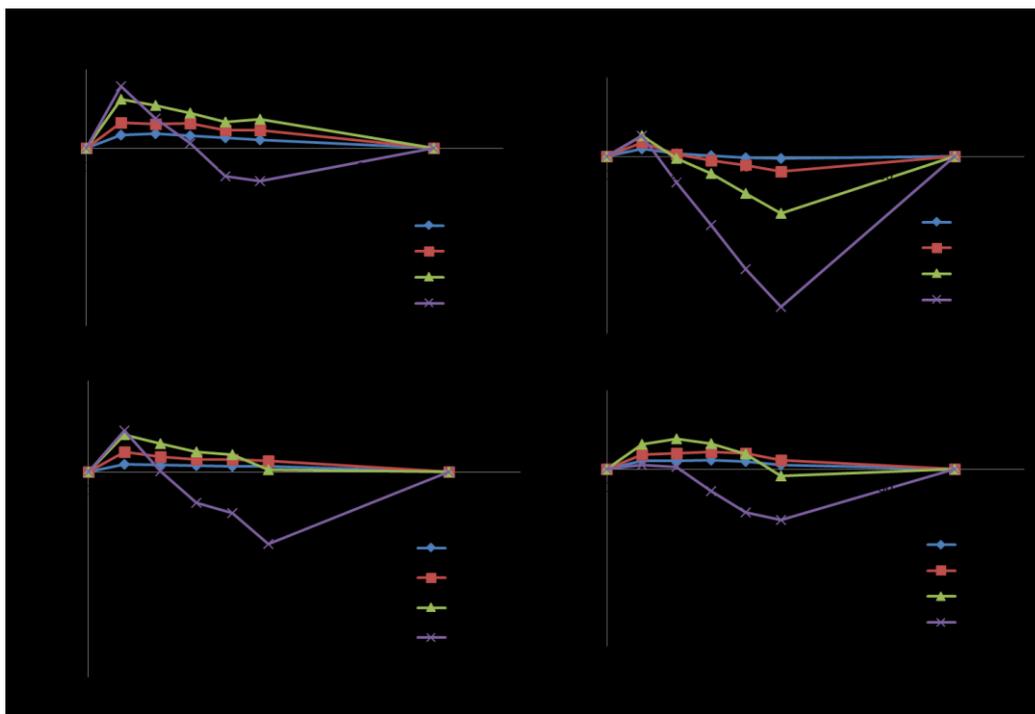


Figure 62 : ΔG_{ex} des β -CD en mélange avec la POPC sur une sousphase d'eau pure à 21°C

Une attraction des β -C12, C16 et C18:1 avec la POPC est observé pour des pressions de surface allant de 5 à 20 mN/m alors qu'à 30 mN/m, une répulsion est observée (Figure 62, 1, 3 et 4). Pour la β -C14, une plus forte répulsion est observée pour chaque pression (Figure 62, 2). Cette répulsion observée entre nos composés et la POPC peut laisser penser que la formation de vésicules avec ces deux composés va permettre une bonne interaction avec les membranes biologiques.

Ensuite, nous avons représenté le K_s en fonction du pourcentage de CD/POPC qui nous renseigne quant à l'état physique du mélange dans la monocouche en fonction du % CD/POPC (Figure 63).

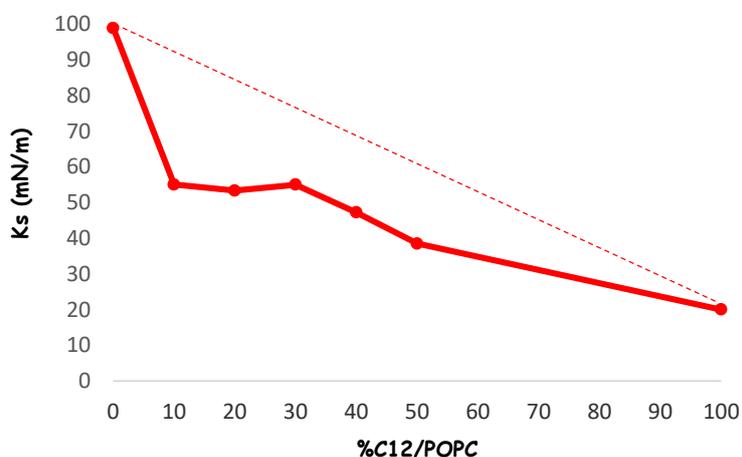


Figure 63 : Représentation du K_s en fonction du % en β -C12/POPC

La courbe obtenue n'est pas linéaire et ne suit donc pas la droite d'idéalité (droite en pointillé). De plus, la courbe est sous la droite d'idéalité ce qui signifie que la membrane est moins élastique qu'attendue. De ce fait, elle peut supporter d'avantage de changement ce qui rend la fusion plus favorable. Le même comportement a été observé pour l'ensemble des composés.

Des images BAM ont aussi été réalisées sur les mélanges de nos composés avec la POPC à l'interface air-eau au ratio molaire 30% CD/POPC. Voici quelques images que nous avons obtenues. (Figure 64)

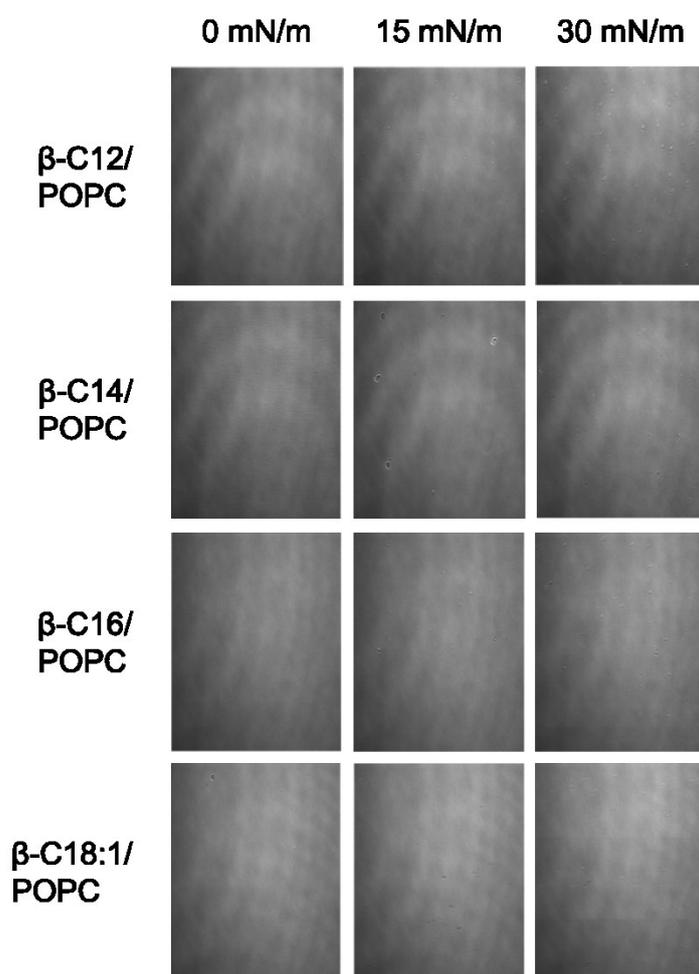


Figure 64 : Images BAM des β -C12, C14, C16 et C18 :1/POPC (3:7 en mol) à différentes pression de surface sur une sous phase d'eau pure thermostatée à 21°C

Des images similaires à celles de nos produits purs ont été obtenues mise à part que la formation d'agrégats de CD est moins visible. On peut voir aussi, d'après ces images, que la

monocouche reste en phase liquide expansée tout au long de la compression car aucun domaine ou phase n'est observé.

Toute cette étude a permis de montrer que nos composés forment des monocouches stables à l'interface air-eau. Leurs aires moléculaires, leurs pressions de collapse et leurs modules d'élasticité ont été déterminés. Le mélange de nos composés avec la POPC a pu être réalisé à l'interface air-eau. Ceci a permis de montrer la miscibilité, l'idéalité du mélange et a permis de déterminer la variation d'énergie libre du mélange. Au vu des résultats favorables à la formation d'édifices binaires de nos composés avec la POPC, nous avons donc envisagé la formation de vésiculaires binaires comme nanovecteurs.

Avant de réaliser ces tests, nous avons évalué la capacité de nos molécules à interagir avec des membranes préformées et de connaître l'influence de la longueur des chaînes aliphatiques sur cette interaction.

B. Etude du caractère membranotrope

1) Détermination de la concentration de travail

Pour tester nos molécules sur les monocouches de Langmuir, il faut au préalable déterminer la concentration optimale de travail. Des remontées de nos molécules ont donc été réalisées en les injectant en sous phase à différentes concentrations sans déposer de lipides à l'interface. Les composés solubilisés dans l'éthanol sont injectés en sous phase d'un puits contenant une solution de tampon phosphate et la mesure de tension de surface est réalisée au cours du temps. (Figure 65)

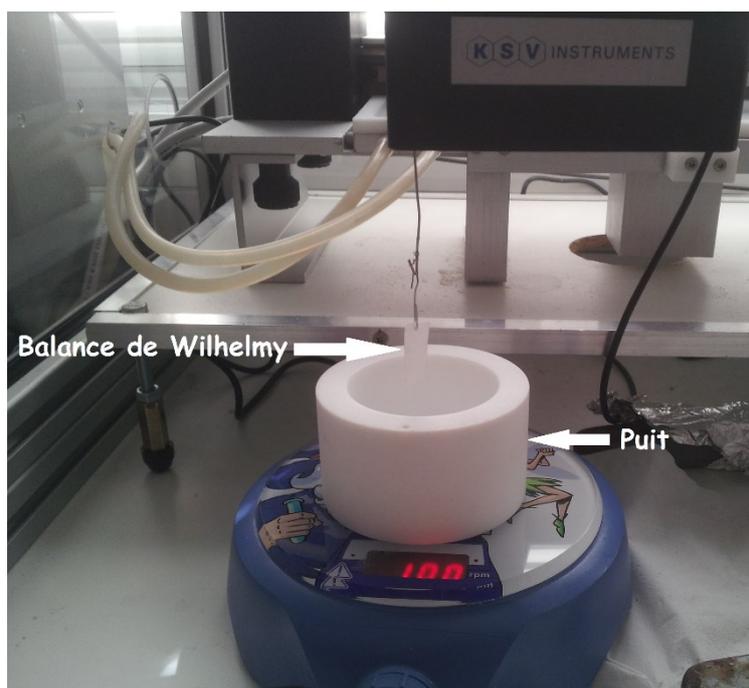


Figure 65: Système utilisé pour déterminer la concentration optimale ainsi que pour les tests d'interaction

Seuls les résultats obtenus avec la β -C12 sont présentés. (Figure 66)

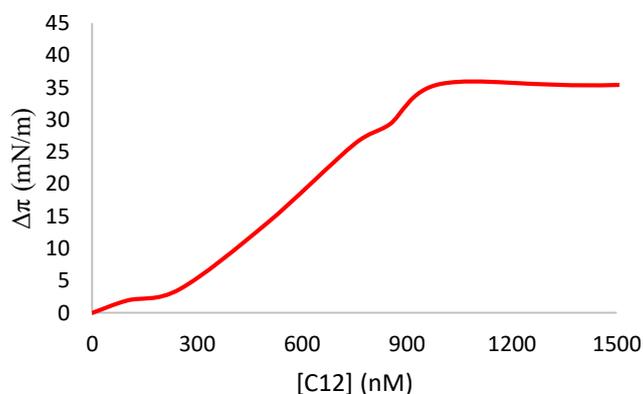


Figure 66 : Détermination de la concentration optimale de travail réalisé à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Nous pouvons noter que plus la concentration injectée est faible et plus la variation de la pression de surface est faible. Afin de tester la capacité d'un composé à s'insérer dans une membrane préformée, il est primordial de choisir la concentration optimale de travail pour laquelle la molécule injectée sous une surface non recouverte de lipides n'induit pas de variation de pression. Nous avons ainsi pu choisir, d'après le tracé de tension de surface finale après injection ($\Delta\pi$) en fonction de la concentration du composé injectée en sous phase

(Figure 66), la concentration de 100 nM pour l'ensemble des composés que nous injecterons dans la sous-phase d'une monocouche de lipides.

2) Etude de l'interaction de nos composés sur un modèle simplifié

Parmi les phospholipides composant les membranes des animaux, la POPC est le phospholipide majoritaire et il est un bon modèle pour faire un premier « screening ».

L'injection de nos composés en sous phase, avec la POPC à la surface, vont donc nous permettre de savoir si nos molécules interagissent avec la membrane de POPC préformée. Pour cela, nous avons réalisé ces injections en fixant la pression initiale (π_0) à différentes valeurs. Elle correspond à la pression de surface après dépôt et stabilisation de la POPC à l'interface. Les résultats obtenus avec la β -C12 sont donnés. (Figure 67)

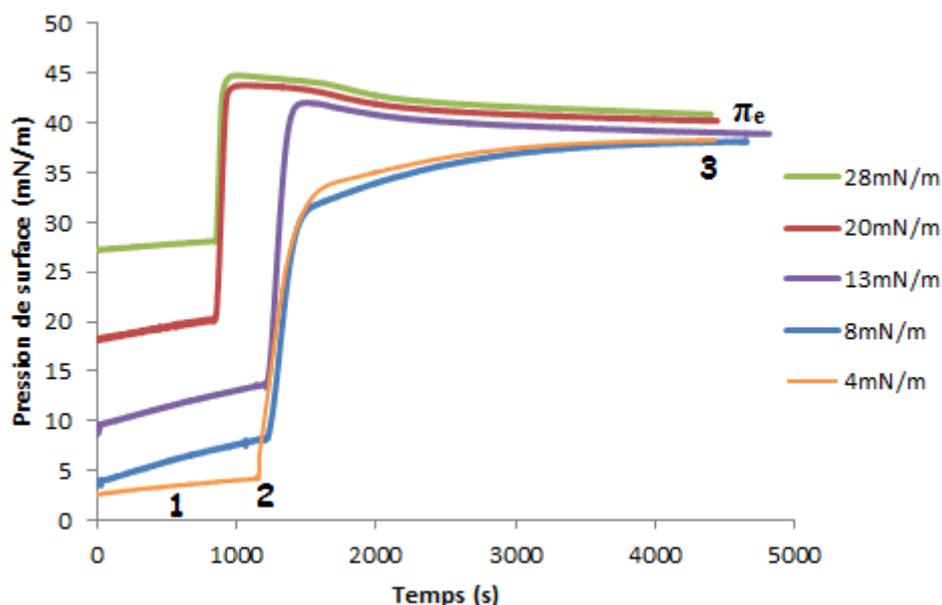


Figure 67 : Résultats de l'injection de la phosphoramidyl β -C12 en sous phase d'une monocouche de POPC réalisé à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Ce type de courbe se constitue de trois parties : (Figure 67)

- 1) Le temps d'attente pour que le solvant organique s'évapore (observation d'un palier)
- 2) L'injection de la molécule à tester en sous phase (croissance brusque)
- 3) La formation d'un palier à une pression π_e (qui n'est pas toujours observé)

Après avoir constaté sa remontée à l'interface, il faut déterminer si la molécule interagit avec la membrane. En effet, pour qu'une molécule soit considérée comme membranotrope, il faut

que la Pression d'Insertion Maximale (PIM) soit supérieure à 30 mN/m (ce qui correspond à la pression interne des membranes biologiques) et $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ non nul. Le $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ va nous renseigner sur la quantité de molécules en interaction avec la monocouche⁹⁷. Pour déterminer la PIM et le $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$, il faut tracer le $\Delta\pi$ en fonction de π_0 . Le $\Delta\pi$ correspond à la différence en π_e et π_0 . Voici les résultats obtenus pour l'ensemble des phosphoramidyls β -CD (Figure 68)

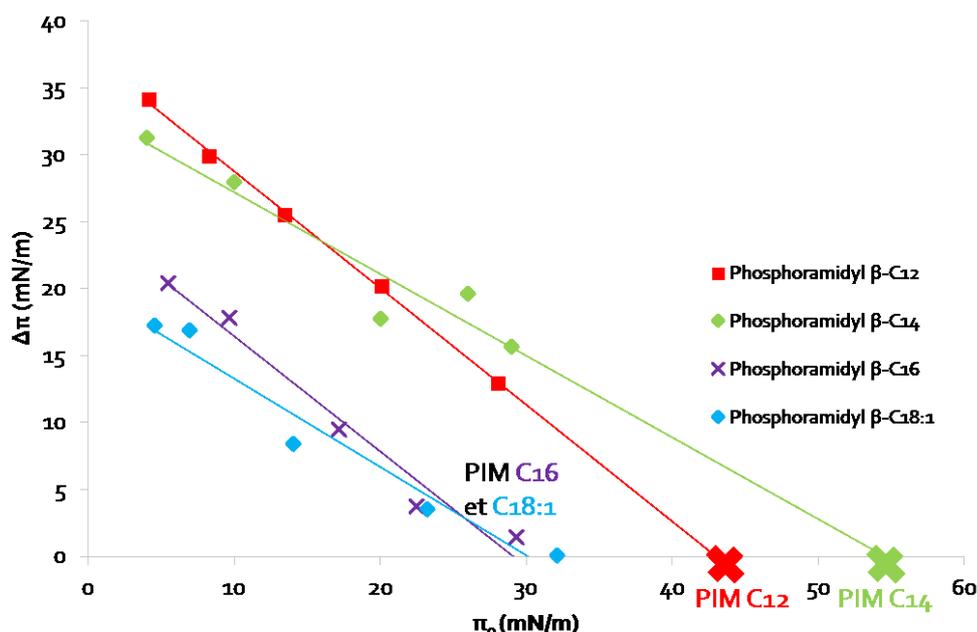


Figure 68 : Détermination de la PIM et du $\Delta\pi_{30}$ des phosphoramidyls β -CDs réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Sur la Figure 68, nous observons une diminution du $\Delta\pi$ avec l'augmentation de π_0 , ce type de comportement traduit l'interaction de la molécule testée avec la monocouche. La PIM est obtenue par extrapolation des droites de régression linéaire à $\Delta\pi=0$. Les valeurs de PIMs et de $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ sont présentées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs des PIMs et $\Delta\pi_{30}$ obtenues

Phosphoramidyls β -CDs	PIM (mN/m)	$\Delta\pi$ (mN/m)
C12	43	11
C14	55	15
C16	29	0
C18:1	30	0

On en déduit que les β -C12 et C14 sont bien membranotropes car elles ont une PIM supérieure à 30 mN/m (43 et 55 mN/m, respectivement) et un $\Delta\pi_{30}$ non nul (11 et 15 mN/m, respectivement). Quant aux β -C16 et C18:1, elles ont un comportement équivalent entre elles : leur PIM est inférieure ou égale à 30 mN/m avec un $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ de zéro. Il nous est donc impossible d'obtenir la valeur du $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$. Au vu de ces résultats, seules les β -C12 et C14 semblent capables d'interagir avec une membrane lipidique préformée.

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier l'importance de la tête polaire CD de cette molécule amphiphile et aussi celle des chaînes aliphatiques sur ces résultats obtenus. De plus, il est connu que la CD seule non fonctionnalisée peut interagir avec des membranes¹⁵⁷ donc elles sera testée comme témoin.

3) Importance de la tête polaire CD et des chaînes aliphatiques

Dans un premier temps, des phospholipides ont été choisis pour réaliser les tests négatifs. Les phosphoramidyls β -C12, C14, C16 et C18:1 ont été remplacées respectivement par la DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine), DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine) et DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine) Ces lipides ont les mêmes chaînes aliphatiques que nos molécules mais par contre, ils ont une tête polaire, phosphatidylcholine. (Figure 69)

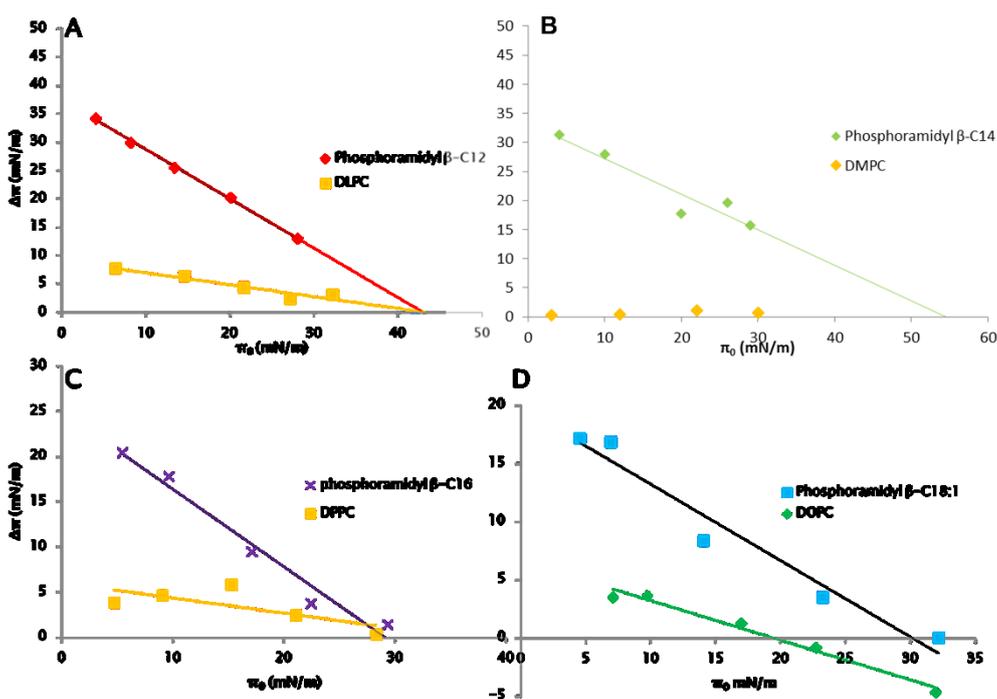


Figure 69 : Comparaison des PIMs des phosphoramidyls β -CDs avec leurs homologues phospholipidiques respectifs

Une grande différence d'interaction est observée dans chaque cas entre nos molécules et leur témoin négatif respectif (Figure 69). La DLPC et la β -C12 ont une PIM similaire mais les valeurs de $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ sont très différentes. En effet, le $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$ de la DLPC est non significatif (<5 mN/m) et est donc bien inférieur à celui de la β -C12 (11 mN/m) ce qui veut dire qu'il y a une plus grande quantité de notre composé en interaction avec la membrane préformée (Figure 69, [A]). Concernant les β -C14, C16 et C18:1, une très grande différence de comportement est observée, ce qui montre, une fois de plus, l'effet indispensable de la tête polaire CD (Figure 69, [B ; C ; D]). Nous pouvons donc affirmer que la CD a un effet non négligeable quant au caractère membranotrope.

Il est connu des CDs qu'elles peuvent inclure des lipides dans leur cavité¹⁵⁷. Pour être assuré que l'interaction de notre molécule avec la monocouche n'est pas due au phénomène d'inclusion des lipides, nous avons testé la CD monoaminée perméthylée (4), intermédiaire réactionnel sans chaîne aliphatique. (Figure 70)

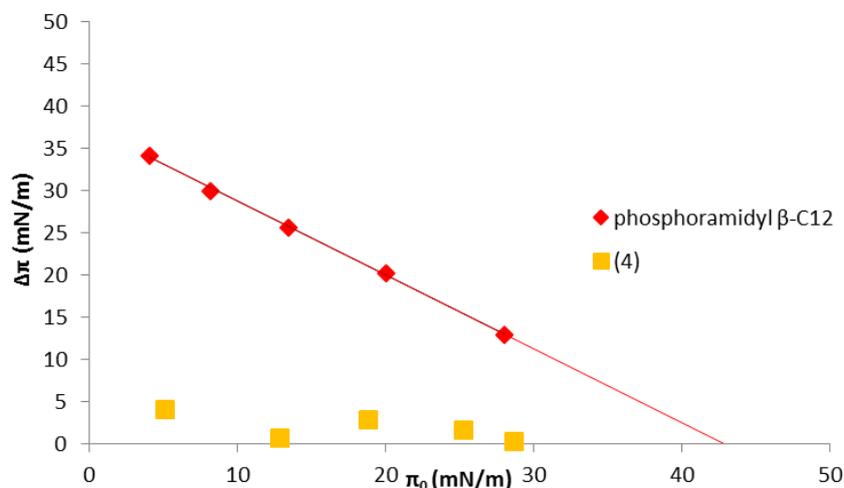


Figure 70 : Comparaison de la PIM de la phosphoramidyl β -C12 et (4) réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Elle n'induit pas de variation de la pression de surface qui soit significative. Elle n'interagit donc pas avec la monocouche de POPC et ne possède pas de caractère membranotrope (Figure 70). Ainsi, les chaînes aliphatiques des phosphoramidyl-CDs sont indispensables pour que les composés possèdent une activité membranotrope leur permettant ainsi de vectoriser efficacement des molécules.

En conclusion, pour les monocouches de Langmuir, les β -C12 et C14 sont bien capables d'interagir avec des membranes préformées alors que les β -C16 et C18:1 ne le sont pas. De plus, il a été prouvé que c'est bien l'ensemble CD/phosphoramidate aliphatique qui fournit le caractère membranotrope et non pas seulement la CD ou les chaînes aliphatiques, séparément. De plus, le changement de la tête polaire CD pour une tête polaire glucose rend le composé amphiphile non soluble en phase aqueuse, marquant encore l'effet de la CD sur cette structure.

Après ces tests d'interaction sur un modèle simplifié de membrane biomimétique (POPC), nous avons complexifié la membrane préformée à l'interface pour augmenter le biomimétisme de cette dernière afin d'obtenir une membrane plus proche de la membrane cellulaire des capillaires cérébraux (plusieurs types de phospholipides, avec sphingomyéline et cholestérol). tester l'interaction de nos composés avec celle-ci.

4) Du modèle simplifié au modèle biomimétique

Pour cela, nous avons élaboré une monocouche mimant la composition lipidique des cellules endothéliales des capillaires cérébraux en se basant sur les travaux de Christine Bénistant et son équipe¹⁵⁸. Nous avons donc effectué le mélange suivant (Figure 71) :

- ✚ Phospholipides constitués de phosphatidylcholine (PC) : POPC (16:0, 18:1), PLPC (16:0, 18 :2) et SAPC (18:0, 20 :4)
- ✚ Sphingomyéline (SM, oeuf de poule)
- ✚ Cholestérol (Chol)

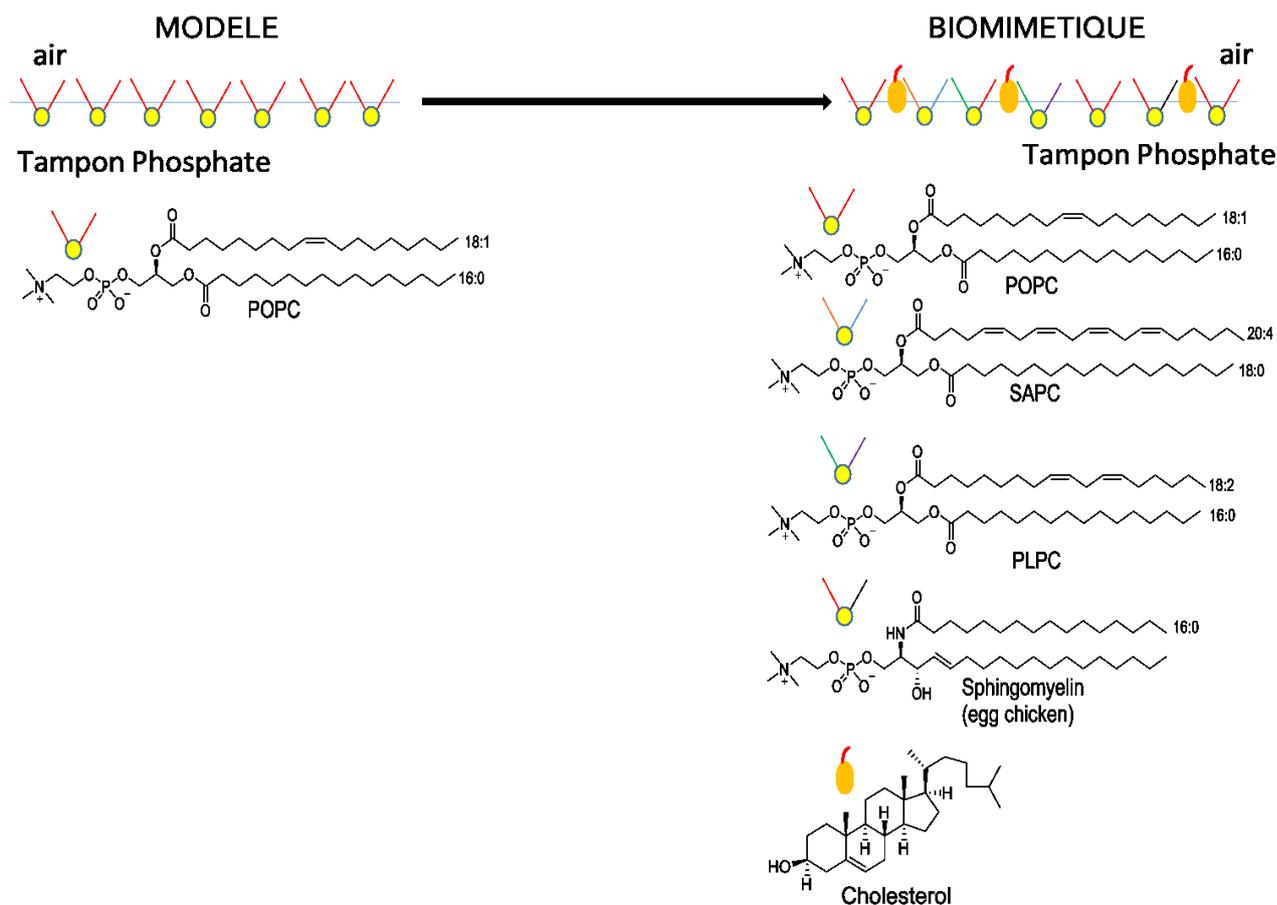


Figure 71 : Structures des molécules composant le modèle biomimétique

Chacune des PC (POPC, SARC, PLPC) a été introduite au même ratio molaire donc POPC :PLPC : SARC (1:1:1). Quant aux différents constituants (PC/SM/Chol), ils ont été introduits suivant deux ratios molaires différents : le premier en 4:3:1 pour mimer la membrane plasmique et le deuxième en 2:1:1 pour mimer les rafts lipidiques. Ces derniers représentent une partie de la membrane plasmique riche en sphingolipides et cholestérol augmentant ainsi sa compaction¹⁵⁹⁻¹⁶². De ce fait, il est un endroit privilégié pour certaines protéines comme la cavéoline, protéine caractéristique des cavéoles qui sont très nombreuses dans les cellules endothéliales¹⁶³. En premier lieu, nous avons voulu voir s'il y avait une différence d'interaction de nos molécules avec les 3 modèles membranaires (POPC et biomimétiques (4:3:1 et 2:1:1) selon la concentration de nos molécules (CAC ou 2xCAC). Pour cela, nous nous sommes placés à une pression de surface initiale π_0 de 20mN/m puis nous avons injecté nos molécules en sousphase et nous avons reporté les valeurs des $\Delta\pi$ obtenus dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Injections en sous phase de monocouches de POPC et biomimétiques 4:3:1 et 2:1:1 à une concentration de C12, C14, C16 et C18 :1 égale à la CAC ou 2 fois la CAC réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

	POPC		4:3:1		2:1:1	
	$\Delta\pi$ (mN/m)					
CD	CAC	2x[CAC]	CAC	2x[CAC]	CAC	2x[CAC]
C12	20	16	20	18	17	18
C14	25	24	20	20	19	20
C16	12	15	10	18	11	16
C18:1	10	8	4	4	5	8

Au vu des résultats, nous pouvons en déduire qu'il n'y a pas de différence d'interaction de nos molécules, qu'elles soient sous forme monomérique (CAC) ou d'autoassemblage (2xCAC), avec les différents modèles membranaires. Ceci implique que c'est la molécule monomérique qui induit cette interaction et elle est donc à même d'interagir avec à la fois les rafts lipidiques ou les autres zones de la membrane plasmique. Pour cela, il a fallu étudier le caractère membranotrope de nos molécules avec ce modèle biomimétique.

Pour la suite de l'étude, nous nous sommes limités, en premier lieu, à la membrane biomimétique 4:3:1. Nous avons pu déterminer la PIM et le $\Delta\pi_{30}$ pour chacun des composés (Figure 72).

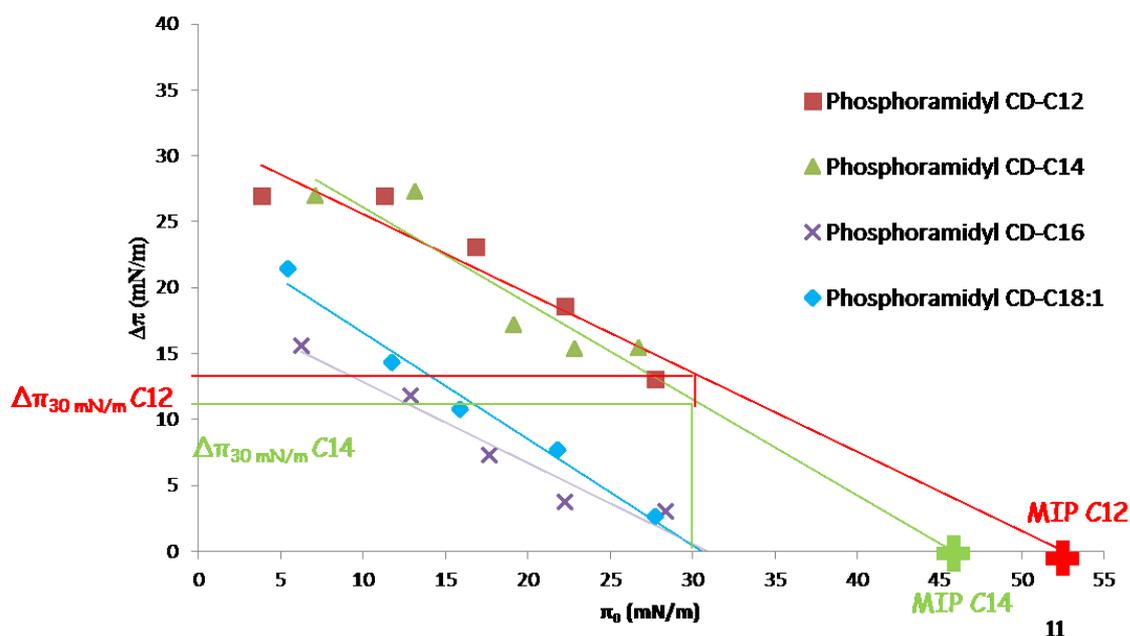


Figure 72 : Détermination de la PIM des phosphoramidyls β -CDs sous la monocouche biomimétique de composition 4:3:1 réalisée à 21°C dans tampon phosphate (10 mM phosphate, 150 mM NaCl) à pH 7,4

Ces résultats nous montrent que les β -C12 et C14 sont bien membranotropes avec une PIM, respectivement, de 53 et 46 mN/m et un $\Delta\pi_{30\text{mN/m}}$, respectivement, de 14 et 12 mN/m respectivement, bien supérieurs aux valeurs limites. Ceci est un très bon résultat car d'une part, les β -C12 et C14 sont encore bien membranotropes avec cette monocouche biomimétique et d'autre part c'est une validation du modèle simplifié de POPC car les résultats obtenus sont comparables.

Les monocouches de Langmuir nous ont permis de prouver le caractère membranotrope de nos molécules. Nous pouvons donc en conclure que les β -C12 et C14 interagissent bien avec les monocouches alors que les β -C16 et C18:1 ne montrent pas d'interaction significative avec elles.

Ensuite, nous avons testé les vésicules mixtes CD/POPC, qui seront utilisées pour les tests de fusogénicité, en monocouches de Langmuir pour savoir si nos composés sous forme de vésicules mixtes (de nanovecteurs) interagissent également avec la monocouche.

5) Interaction des vésicules mixtes avec la monocouche

Les résultats positifs obtenus pour les isothermes de compression des différents mélanges CD/POPC, nous ont amené à tester l'interaction de vésicules mixtes contenant nos composés et la POPC avec une monocouche préformée à l'interface air-eau. Ces vésicules mixtes sont préparées en utilisant la technique de réhydratation du film sec, qui sera décrit peu après, ainsi que la sonication. Nous avons choisi d'injecter les vésicules mixtes à 30% molaire de CD par rapport à la POPC en sous phase de la membrane biomimétique 4:3:1 à $\pi_0=20$ mN/m pour ainsi pouvoir comparer les interactions entre elles. (Figure 73)

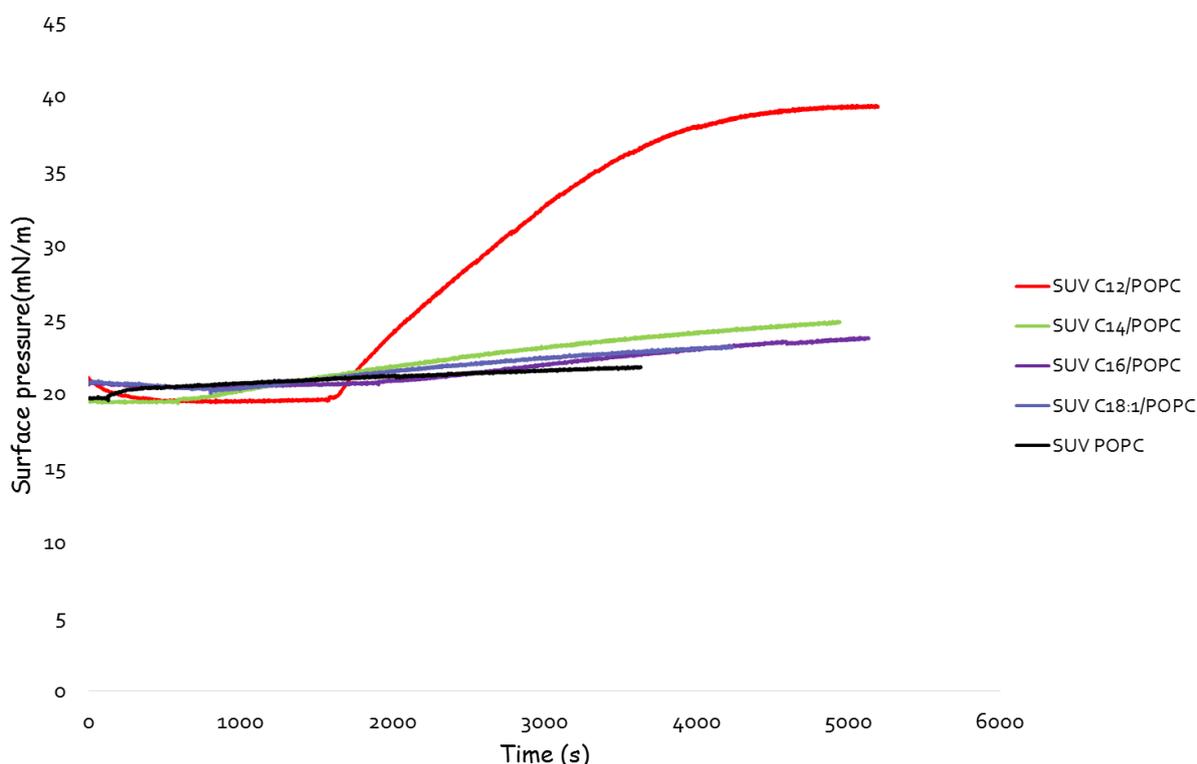


Figure 73 : Injections des vésicules mixtes à 30% C12, C14, C16 et C18 :1/POPC en mol et vésicule POPC sous la monocouche biomimétique 4 :3 :1 à $\pi_0=20$ mN/m dans tampon phosphate 10 mM et NaCl 150 mM à pH 7,4

Ces résultats indiquent que la vésicule C12/POPC interagit fortement et fusionne avec la monocouche alors que les vésicules C14, C16 et C18:1/POPC n'interagissent que faiblement.

Ensuite nous nous sommes placés dans les conditions physiologiques qui seront utilisées pour les tests *in vitro* en utilisant, comme sous phase, le tampon Ringer-HEPES. Pour cela, nous avons injecté les vésicules mixtes C12 et C14/POPC chargées ou non d'Atazanavir (ATV). Avant cela, pour être sûr que l'interaction observée ne sera pas dû à l'ATV, nous avons déterminé sa capacité à interagir avec la membrane préformée en déterminant sa PIM.(Figure 74)

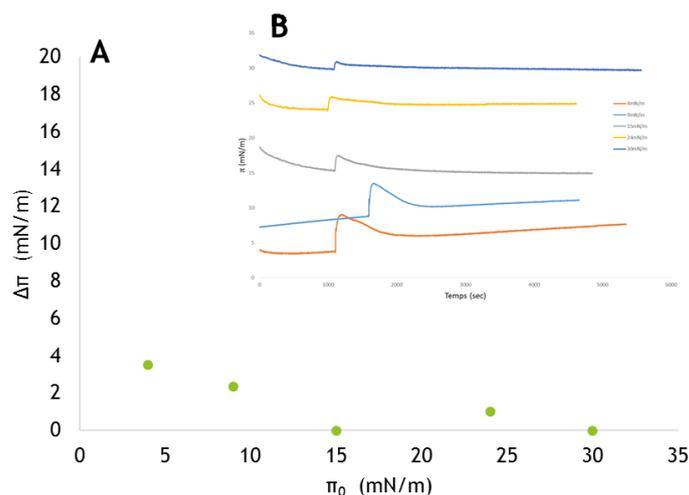


Figure 74 : Résultats de l'interaction de l'ATV avec une monocouche de POPC (A) et détermination de sa PIM (B)

Ces résultats nous indiquent que l'ATV n'interagit pas avec la membrane préformée donc l'observons d'une interaction entre les vésicules chargées et la membrane préformée ne sera pas dû à celui-ci.

Voici les résultats obtenus pour l'interaction des vésicules mixtes, chargées ou non, avec la membrane préformée biomimétique PC:SM:Chol. (Figure 75)

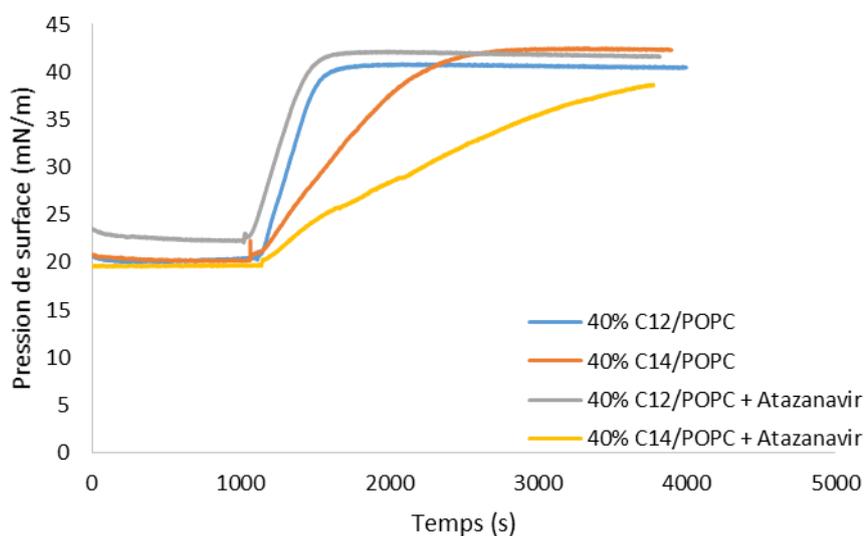


Figure 75 : Résultats de remontées des vésicules mixtes 40% β -C12 et β -C14/POPC chargées ou non en ATV

Nous pouvons voir que l'ensemble des vésicules mixtes interagissent fortement avec la membrane préformée. On observe une différence de profil entre la β -C12 et la β -C14, qu'elles

soient chargées ou non, avec une augmentation de la pression de surface plus forte dans les premiers temps de l'injection pour la β -C12 mais avec des $\Delta\pi$ comparables entre elles.

Afin de vérifier le caractère fusogène de nos composés et de mieux comprendre le phénomène d'interaction, nous avons réalisé des tests de fusogénicité sur l'ensemble de nos composés.

C. Etude du caractère fusogène

1) Sur modèle simplifié

Cette étude va nous permettre de déterminer le caractère fusogène de nos molécules, c'est-à-dire leur capacité à induire la fusion membranaire. Ceci nous renseigne sur la capacité d'une molécule à passer au travers des membranes biologiques par voie passive.

La formation de vésicules mixtes CD/POPC et sonde fluorescente/POPC est réalisée suivant la méthode de réhydratation du film sec. (Schéma 33)

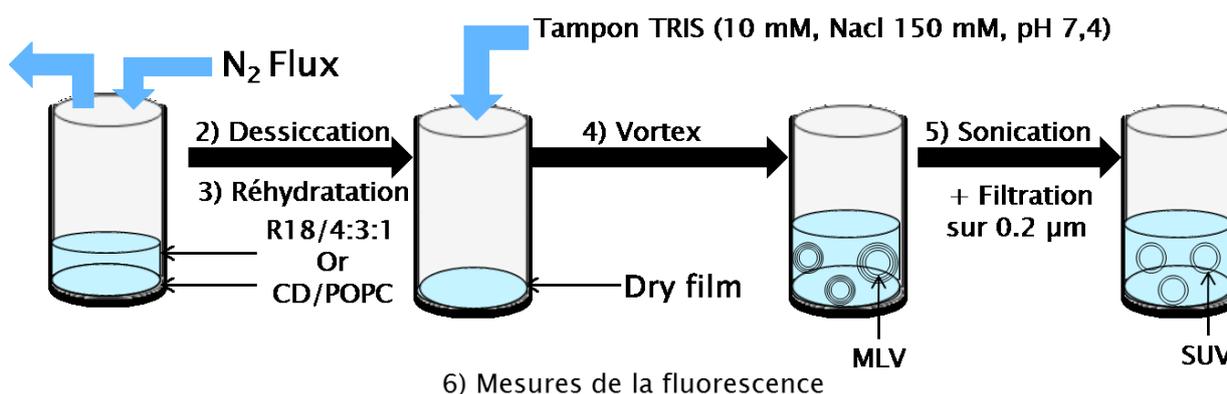


Schéma 33 : Préparation des vésicules pour l'étude de fusogénicité

Les SUVs mixtes POPC/R18 sont toujours préparées à une concentration totale de $100 \mu M$ et avec la sonde fluorescente R18 introduite à 6,3% en masse par rapport à la POPC. Tandis que les SUVs mixtes POPC/CD sont préparées avec une concentration totale de $400 \mu M$ avec différents ratio de CD (10, 20, 30, 40 et 50% en mol par rapport à la POPC). Pour réaliser la mesure, la concentration totale de la cuve est de $50 \mu M$ avec un ratio molaire 1:4 (SUV R18:SUV CD) pour un volume de cuve de 1mL.

Une cinétique de fluorescence est réalisée afin d'observer l'évolution de la fluorescence dans le temps. Pour cela, $800 \mu L$ d'une solution tampon Tris (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) puis $100 \mu L$ de SUV POPC/R18 sont ajoutés. La mesure est réalisée durant 1 min afin d'obtenir un

plateau correspondant au zéro fusion puis 100 μL de SUV POPC/CD sont ajoutés. Le pourcentage d'augmentation de fluorescence est obtenu par cette formule :

$$\%F = \frac{F_t}{F_{tot} - F_0}$$

Avec :

- ✚ F_0 : l'intensité de la SUV R18/POPC seul
- ✚ F_t : l'intensité de fluorescence après ajout de la SUV CD/POPC
- ✚ F_{tot} : l'intensité de la fluorescence totale obtenue après lyse complète des liposomes par le Triton X-100 à 10% (v/v)

Cette technique, en utilisant la sonde R18, permet d'observer la fusion entre deux vésicules par « quenching/dequenching » de cette sonde. En effet, lorsque cette dernière est introduite dans les SUV de POPC, sa fluorescence est « quenchée » à cause de la proximité spatiale des sondes entre elles, ce qui se traduit par une diminution de sa fluorescence. Lors de l'ajout des SUV contenant la molécule à tester, si celle-ci permet la fusion membranaire alors les sondes vont être éloignées les unes des autres pour obtenir un « dequenching » qui va se traduire par une augmentation nette de la fluorescence. (Schéma 34)

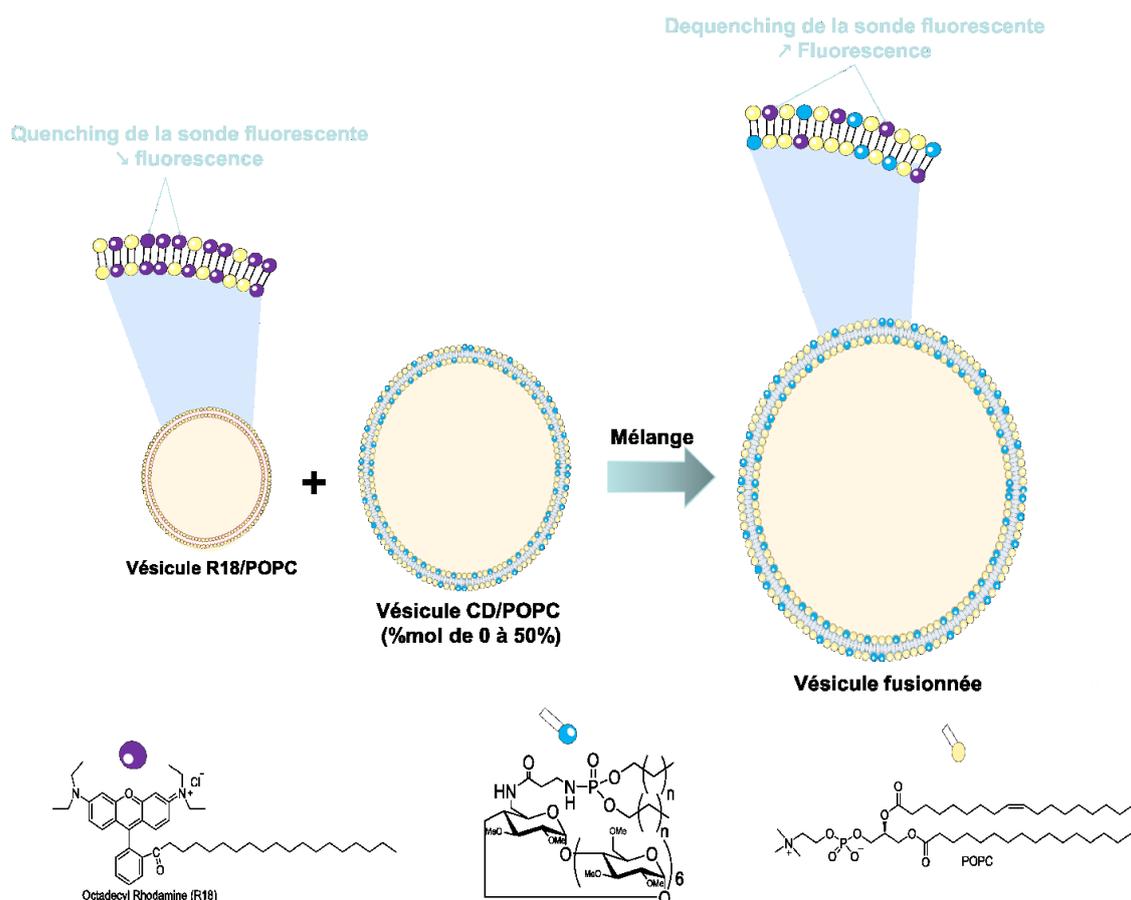


Schéma 34 : Représentation schématique de la technique du « quenching/dequenching » employée

Afin de pouvoir comparer efficacement les résultats des différentes molécules entre elles, nous avons tracé le pourcentage de fluorescence (%F) en fonction du temps.(Figure 76)

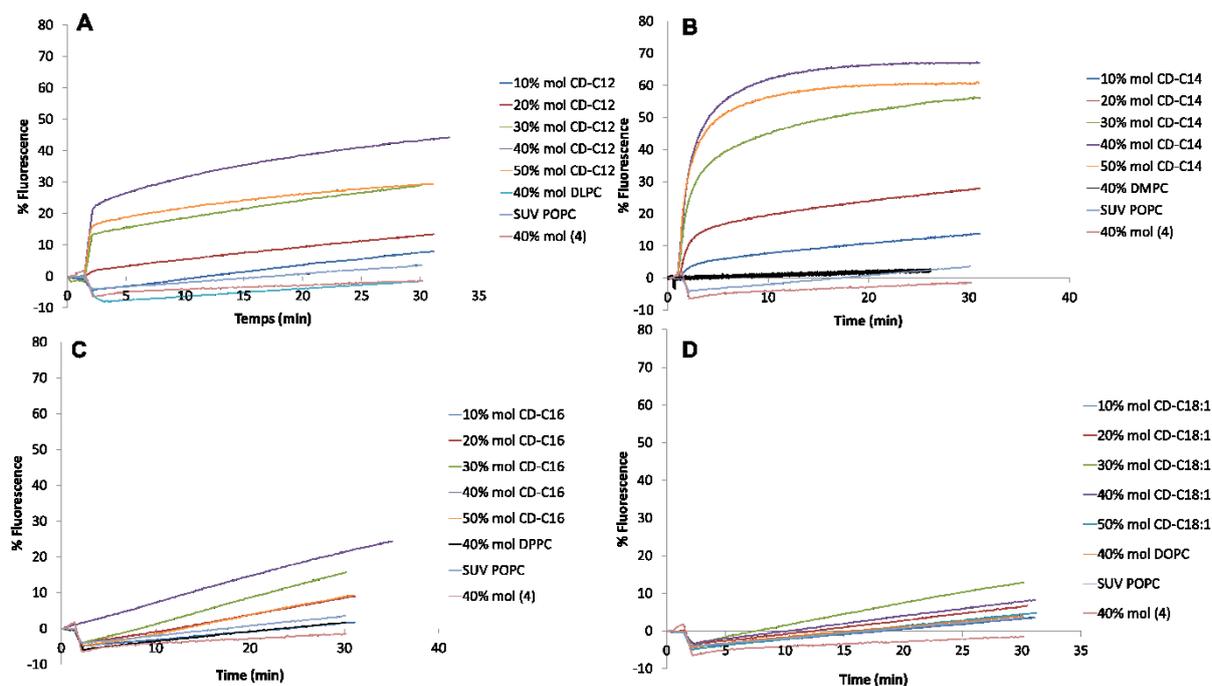


Figure 76 : Résultats de fusogénicité des phosphoramidyls β -CDs sur R18/POPC réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). β -C12 (A), β -C14 (B), β -C16 (C) et β -C18:1 (D)

Les résultats montrent le caractère fusogène des β -C12 et β -C14 comparé aux β -C16 et C18:1. De plus, les témoins négatifs : la DLPC, DMPC, DPPC DOPC et la monoaminée β CD perméthylée (4) ont été testées aux ratios molaires pour lequel nos composés ont la meilleure fusogénicité (Figure 76). Ces résultats montrent que c'est effectivement la structure complète phosphoramidyl-CD qui est responsable du caractère fusogène.

Ensuite, nous avons réalisé ces mêmes mesures en utilisant, cette fois ci, des SUVs biomimétiques contenant la sonde fluorescente R18.

2) Sur modèle biomimétique

Comme pour les études d'interaction, nous avons complexifié la composition des SUVs contenant la sonde fluorescente. En effet, nous avons formé une SUV mimant la composition lipidique des cellules endothéliales des capillaires cérébraux en utilisant le mélange 4:3:1 qui a permis de réaliser les études d'interaction en monocouches de Langmuir. En revanche, les vésicules mixtes de nos molécules sont toujours préparées avec la POPC seule à différents ratios molaires.(Figure 77)

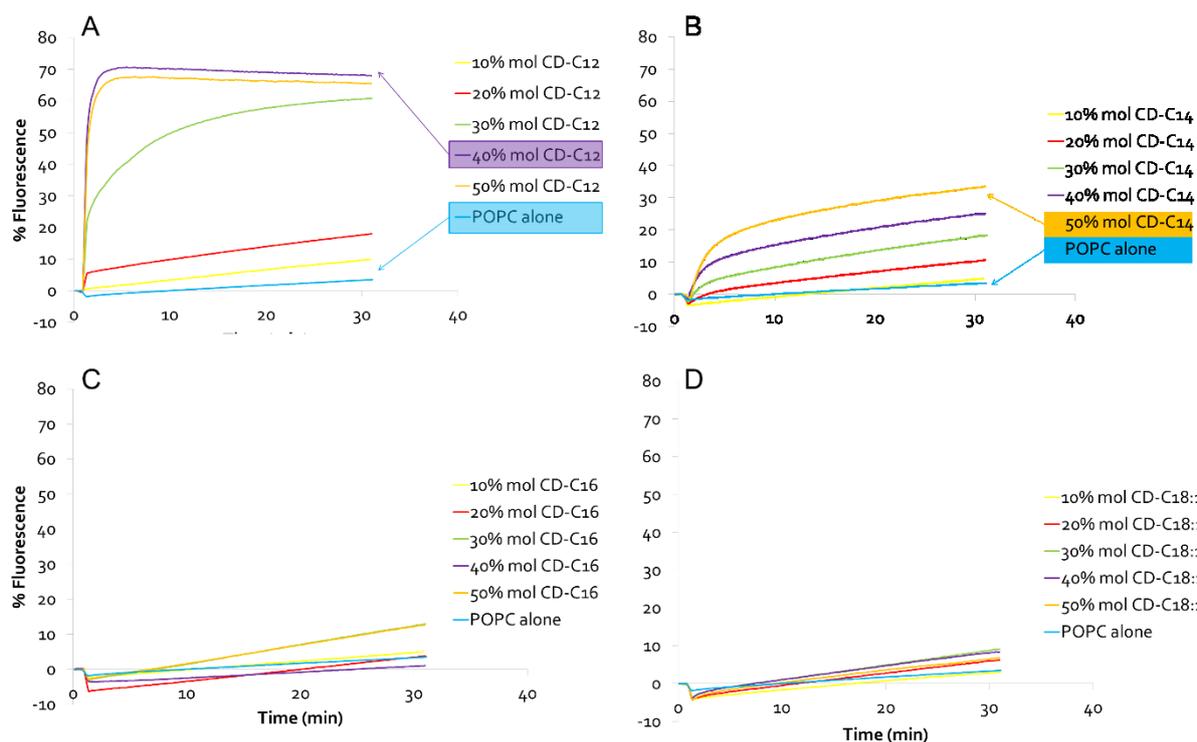


Figure 77 : Résultats de fusogénicité des phosphoramidyls β -CDs sur R18/4:3:1 réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). β -C12 (A), β -C14 (B), β -C16 (C) et β -C18:1 (D)

Ces résultats nous montrent une très forte fusogénicité de la β -C12. Son taux de fluorescence maximum est passé de 45% lorsque la fusion est réalisée avec des SUVs de POPC (Figure 76) à 70% avec des SUVs de composition biomimétique (Figure 77), ce qui traduit un caractère fusogène bien plus prononcé avec la membrane biomimétique 4:3:1. A l'inverse, le C14 a vu son taux de fluorescence maximum diminuer de 70% lorsque la fusion est réalisées avec des SUVs de POPC (Figure 76) à 35% avec des SUVs de composition biomimétique (Figure 77) donc celle-ci montre un caractère fusogène moindre avec la membrane biomimétique mais qui reste toujours intéressante. Pour ce qui est des composés C16 et C18:1, nous observons toujours une faible fusogénicité qui est semblable à celle obtenue avec des SUVs de POPC seules.

En sachant que les études *in vitro* sur le modèle de BHE sont réalisées dans le tampon RH, nous avons donc voulu tester l'effet du tampon RH sur la fusogénicité de nos composés. Pour cela, les vésicules ne sont pas préparées dans du tampon Tris mais dans du RH. Voici les résultats obtenus avec les β -C12 et C14 sont présentés. (Figure 78)

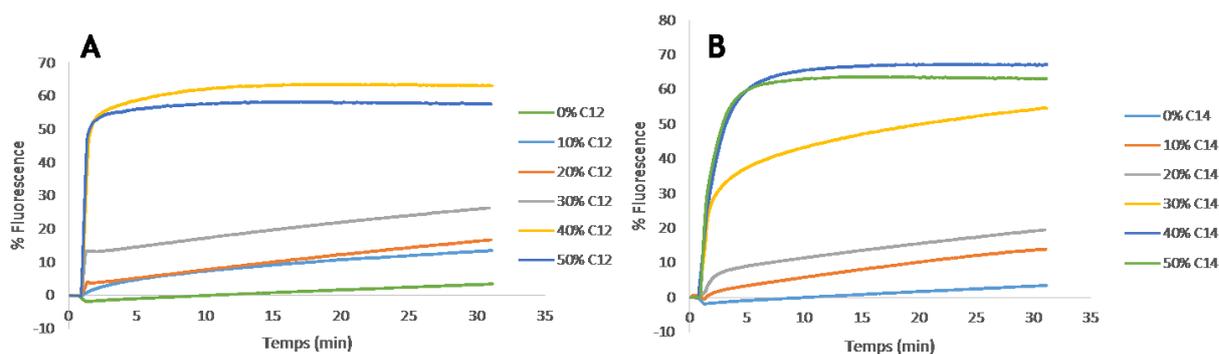


Figure 78 : Résultats de fusogénicité de la β -C12 (A) et de la β -C14 (B) sur R18/4:3:1 réalisé dans le tampon RH à pH 7,4.

Ils montrent une augmentation significative de la fusogénicité pour la β -C14. En effet, pour les ratios 40 et 50% β -C14/POPC, leur fusogénicité a augmenté, respectivement, de 20 et 30% (Figure 77, [B]) à 65 et 60% (Figure 78, [B]).

L'ensemble des résultats de fusogénicité ont suscité beaucoup d'interrogations. Notamment, sur le mécanisme d'interaction et de fusion de nos molécules avec les membranes. La principale hypothèse que nous avons émise est que l'interaction de nos molécules va conduire à la formation de vides hydrophobes au sein de la bicouche qui sont d'autant plus accentués par la tête polaire CD encombrante de nos molécules. Pour vérifier cela, nous avons réalisé deux tests complémentaires. Le premier consiste en l'étude de l'ordre lipidique en utilisant les sondes fluorescentes Laurdan et Prodan. Le deuxième consiste en l'ajout d'une quantité croissante de cholestérol à nos SUVs mixtes CD/POPC au ratio présentant la meilleure fusogénicité. Pour la suite des études, nous nous sommes limités à la β -C12 et la β -C14.

Un test complémentaire a été mis en œuvre afin de renforcer les résultats obtenus et prouver, une nouvelle fois, que le phénomène que l'on observe est bien de la fusion et non pas de l'agrégation qui se traduirait également par une augmentation de la fluorescence.

Nous avons donc réalisé des injections de la β -C12 et β -C14 à des SUVs de POPC et de R18/4:3:1. Ces tests ont été schématisés. (Schéma 35)

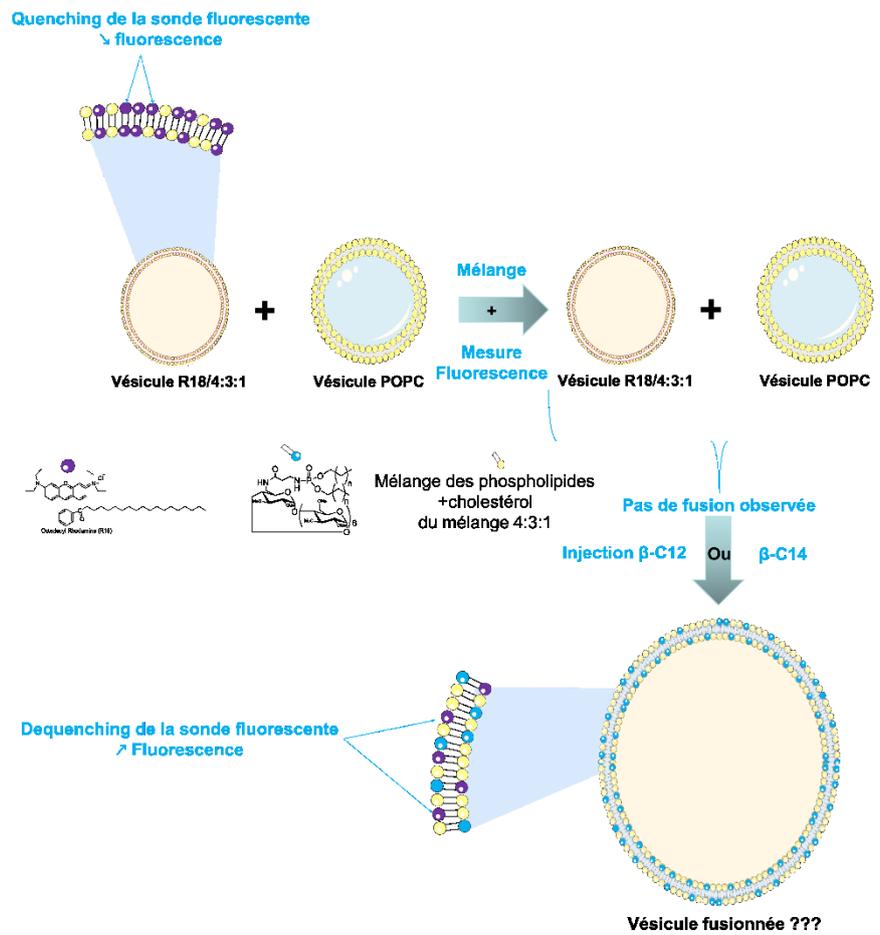


Schéma 35 : Schéma explicatif de l'ajout externe des β -C12 et C14

Pour réaliser ces tests, nous avons injecté les produits β -C12 et C14 à deux concentrations différentes, à la CAC et à 2 fois la CAC. Voici les résultats obtenus. (Figure 79)

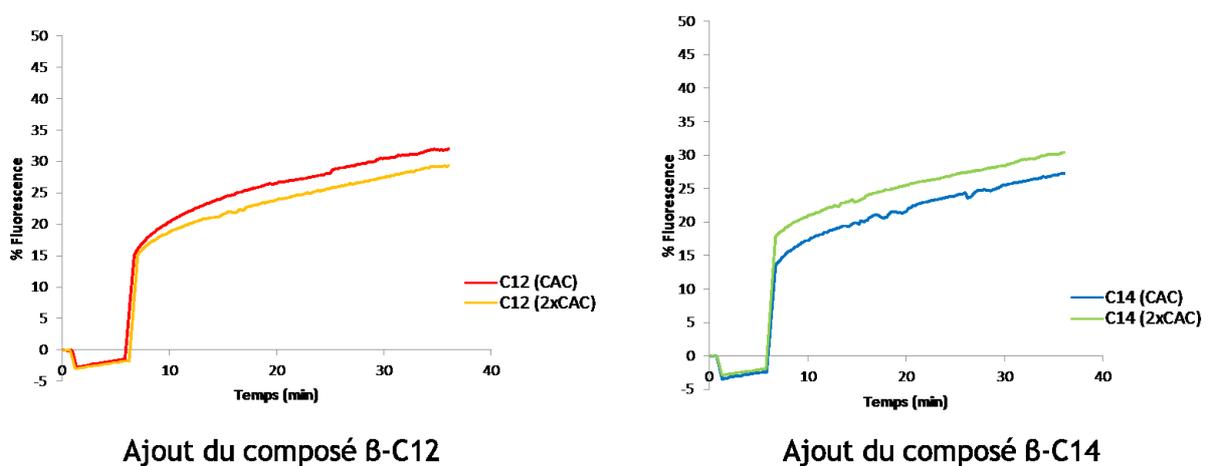


Figure 79 : Résultats de fusogénicité des composés β -C12 et C14 en ajout externe réalisé dans le tampon TRIS (10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4)

Ces résultats nous montrent que lors de l'ajout des vésicules de POPC seule, une augmentation non significative est observée qui est probablement due à de l'agrégation, puis lors de l'ajout de nos composés, une nette augmentation est observée ce qui traduit la fusion entre les vésicules de POPC et celle contenant la sonde R18 (Figure 79).

Enfin, pour appuyer ce dernier test, nous avons réalisé une expérience afin de montrer que l'augmentation de la fluorescence observée n'est pas due à une solubilisation des membranes des liposomes ce qui conduirait au dequenching de la sonde fluorescente. Nous avons donc procédé de la façon suivante. (Schéma 36)

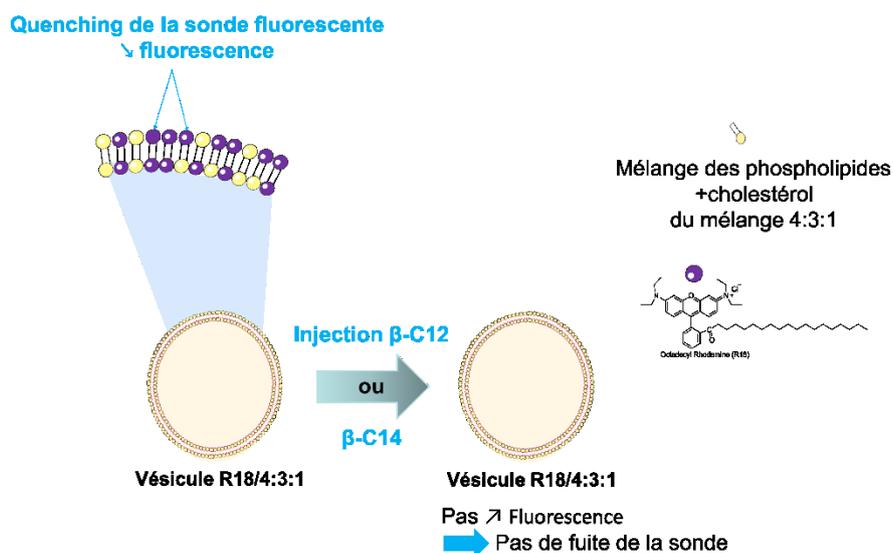


Schéma 36 : Schéma explicatif du test de fuite de la sonde R18 sous l'action de nos composés

Ce test nous a permis d'obtenir les résultats présentés. (Figure 80)

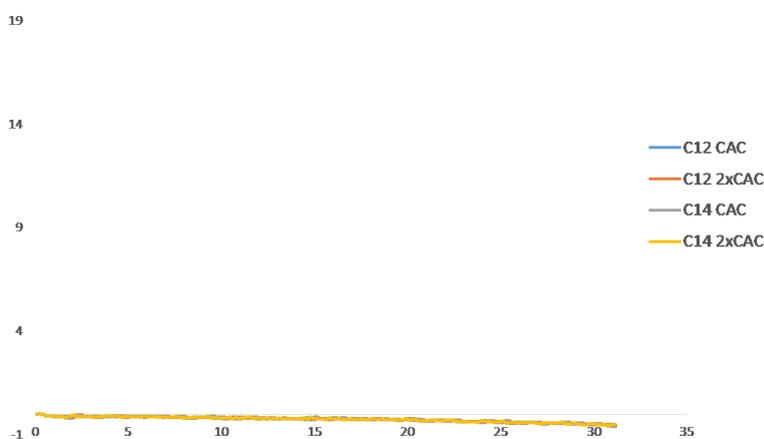


Figure 80 : Résultats du test de fuite de la sonde R18 sous l'action des β-C12 et C14

Ils montrent bien que les augmentations de fluorescence observée jusqu'alors n'étaient pas dues à une fuite de la sonde R18 dans le milieu car aucune augmentation significative de fluorescence n'est observée pour les deux composés testés aux deux concentrations CAC et $2 \times \text{CAC}$.

A partir des différents tests de fusogénicité réalisés, nous pouvons conclure, avec certitude, que nos composés présentent bien un caractère fusogène et favorisent donc la fusion membranaire. Mais une question reste en suspens, comment nos composés peuvent favoriser la fusion membranaire, par quel mécanisme ?

3) Compréhension du mécanisme de fusion

a) Etude de l'ordre lipidique

L'utilisation d'un modèle membranaire en bicouche est nécessaire pour l'élaboration de cette étude d'où le choix des liposomes, et des sondes fluorescentes suivantes : le Laurdan et le Prodan. Nous nous sommes donc intéressés à l'insertion de nos composés dans des liposomes de POPC, ce qui permettra d'extrapoler les interactions se produisant à l'échelle cellulaire entre le feuillet externe et nos composés.

Nous avons utilisé des SUVs de $\beta\text{-C12/POPC}$ et de $\beta\text{-C14/POPC}$ à 40% de CD/POPC, conformément aux résultats obtenus (Figure 77), et de POPC seule. Les mesures de DLS ont montré qu'elles étaient dans le même ordre de tailles avec 120-130 nm pour les SUVs mixtes et 90 nm pour les SUVs de POPC seule. Ceci est important pour pouvoir comparer les résultats car le GP (cf p 46) dépend de l'ordre lipidique mais aussi de la taille des liposomes⁹⁶. Nous avons réalisé les mesures à deux températures différentes : 21°C (température d'étude en monocouche) et 37°C (température physiologique) (

Tableau 17). Pour une lecture simplifiée, nous avons représenté les valeurs de ΔGP . Le ΔGP a pour formule :

$$\Delta\text{GP} = \text{GP}_{\text{CD/POPC}} - \text{GP}_{\text{POPC}}$$

Avec :

-  $\text{GP}_{\text{CD/POPC}}$: GP obtenu pour les vésicules contenant nos composés
-  GP_{POPC} : GP obtenu pour les vésicules de POPC seule

Tableau 17 : Valeurs du ΔGP du Laurdan et du Prodan pour les vésicules mixtes β -C12/POPC et β -C14/POPC à 21 et 37°C

ΔGP à 21 °C	Laurdan	Prodan
40% C12/POPC	0,21	0,25
40% C14/POPC	0,16	0,25
ΔGP à 37 °C	Laurdan	Prodan
40% C12/POPC	0,19	0,33
40% C14/POPC	0,22	0,37

L'obtention d'un ΔGP positif pour les deux composés aux deux températures testées traduit une diminution de l'exposition à l'eau de la membrane qui représente donc une augmentation de l'ordre des lipides¹⁶⁴. Ce résultat est surprenant car il ne semble pas corroborer notre hypothèse sur les vides hydrophobes. En effet, la présence de ces vides devrait induire une augmentation du désordre membranaire et non l'inverse.

Un deuxième test a donc été réalisé pour venir confirmer ou infirmer ces résultats.

b) Par ajout croissant de cholestérol

Pour réaliser ces expériences, du cholestérol à différents ratios molaires (de 10 à 50%) a été introduit lors de la préparation des liposomes mixtes CD/POPC 2:3 (mol:mol).

Le cholestérol est connu pour combler les vides hydrophobes qui peuvent se former dans les bicouches. De ce fait, si des vides hydrophobes sont formés lors de l'interaction de nos composés avec la SUV de R18/4:3:1 et que ces derniers sont un intermédiaire dans le mécanisme de fusion alors le cholestérol les comblera et nous devrions observer une diminution de la fusion donc de la fluorescence de la sonde R18. (Figure 81)

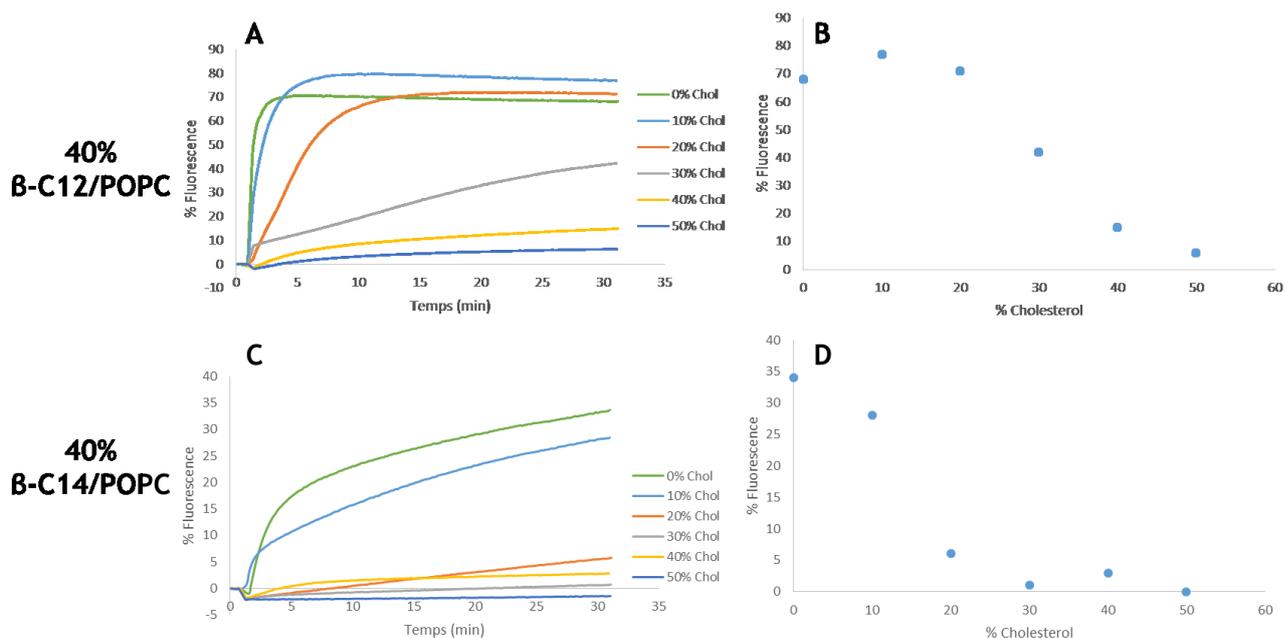


Figure 81 : Résultats de fusogénicité des vésicules mixtes à 40% de β -C12/POPC et β -C14/POPC avec ajout constant de cholestérol. (A) et (C) mesure de fluorescence de β -C12/POPC et β -C14/POPC, respectivement. (B) et (D) tracé du % de fluorescence par rapport au % de cholestérol, pris à 30 min après ajout, de β -C12/POPC et β -C14/POPC, respectivement.

Pour la β -C12, à 10% de cholestérol, nous pouvons noter une légère augmentation de la fluorescence puis une diminution en fonction de l'ajout de cholestérol jusqu'à atteindre un minimum de 6% de fluorescence à 50% de Cholestérol (Figure 81, [B]). Des résultats comparables ont été obtenus avec la β -C14 (Figure 81, [C] et [D]). Il est à noter que pour la β -C12, il faut plus de cholestérol que pour la β -C14 pour induire une diminution de la fluorescence. Ceci suggère que les vides hydrophobes formés par la β -C12 sont plus importants ou plus nombreux que ceux formés par la β -C14.

Ce test s'est révélé être positif et nous a permis de prouver notre hypothèse de la formation des vides hydrophobes engendrés par nos molécules dans la bicouche conduisant à la fusion des deux vésicules. Une incohérence subsiste quant à l'étude de l'ordre lipidique, un ΔGP négatif traduisant une augmentation de l'exposition à l'eau de la membrane correspondant à une perte d'ordre et donc l'apparition de vides hydrophobes, ce que nous n'avons pas pu mettre en évidence.

La première hypothèse est que le phénomène d'interaction puis formation des vides hydrophobes et de fusion sont trop rapides et, de ce fait, ne nous permettent d'observer que la vésicule déjà fusionnée ne présentant plus de vides hydrophobes.

La deuxième est que ceci provient de l'encombrement de la tête polaire CD qui empêche l'eau d'accéder à l'intérieur de la bicouche.

En conclusion, nous pensons que le mécanisme de fusion de nos composés avec une bicouche passe par la formation de vides hydrophobes amenant du désordre dans la membrane pour ainsi conduire à la fusion membranaire.

D. Etude du relargage de l'Atazanavir

Cette étude a été réalisée en préparant les vésicules mixtes β -C12 et β -C14/POPC ainsi que des vésicules de POPC toutes chargées en ATV pour une concentration totale de 400 μ M. Pour cela, l'ATV est ajouté lors de la préparation du film sec à une concentration de 50 μ M. Voici les résultats obtenus. (Figure 82)

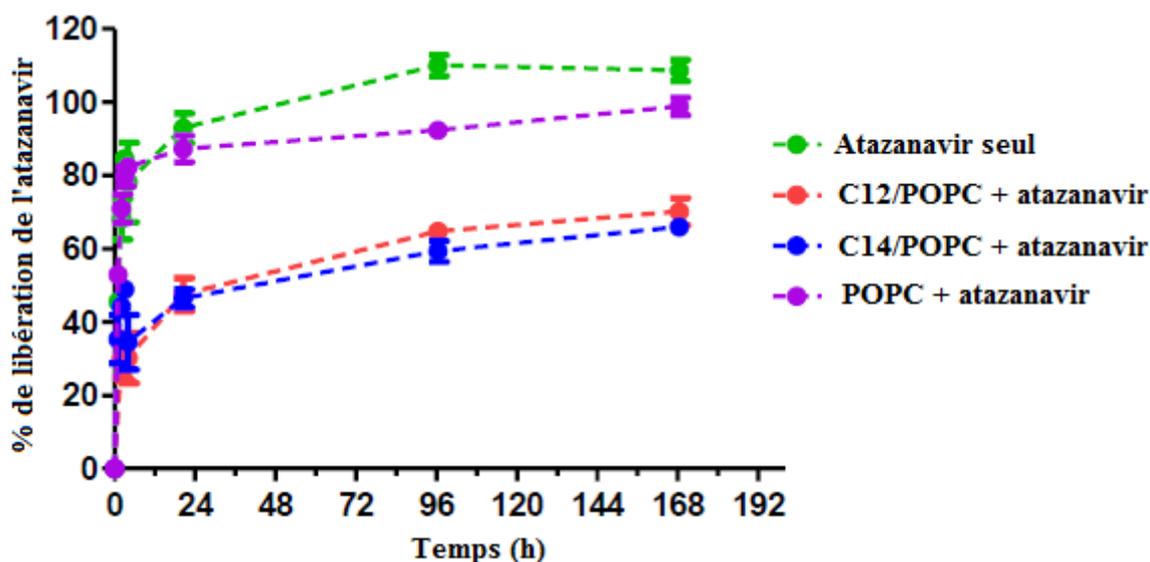


Figure 82 : Relargage in vitro de l'ATV encapsulé dans des vésicules de POPC (violet), de β -C12 (rouge) et β -C14/POPC (bleu) (4:6 en mol)

Ces résultats montrent que le relargage de l'ATV est très fortement ralenti dans les NPs de β -C12 et β -C14/POPC alors qu'avec les vésicules de POPC son relargage est comparable à l'ATV seul (Figure 82). Ceci montre un relargage contrôlé de l'ATV.

Ensuite, nous avons voulu observer l'interaction de nos composés avec des bicouches en utilisant l'AFM. Ceci va nous permettre d'observer l'insertion de nos composés dans des bicouches ainsi que l'effet de nos composés ajoutés sur une bicouche de PC:SM:Chol.

E. Etudes en AFM sur bicouches supportées

1) Etude de l'insertion des β -C12 et C14 dans des SLBs

Cette étude en AFM a nécessité la formation de SLBs. Ces dernières ont été obtenues par la méthode de la fusion de SUVs. En effet, des SUVs de DPPC, β -C12/DPPC et β -C14/DPPC, POPC/DPPC et encore β -C12/POPC/DPPC et β -C14/POPC/DPPC ont été préparées et fusionnées sur du mica en suivant un protocole bien décrit dans la littérature¹⁶⁵.

Dans un premier temps, une SLB de DPPC pure a été préparée puis imagée par AFM. (Figure 83)

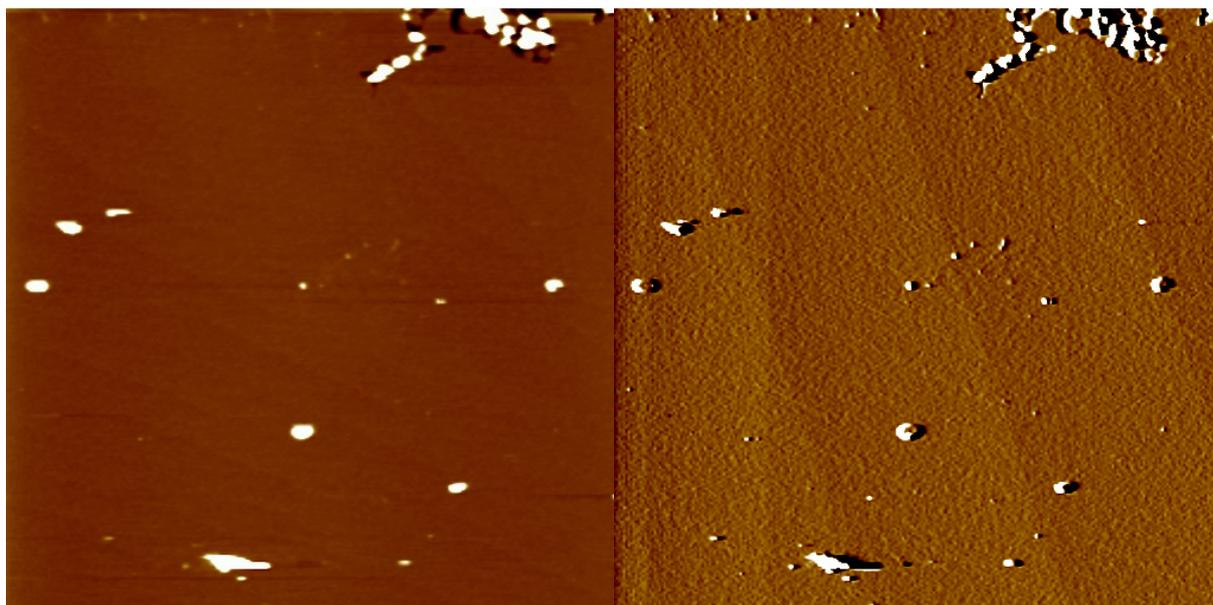


Figure 83 : Image AFM de la SLB de DPPC pur en mode statique ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, $Z = 5 \text{ nm}$)

Les images obtenues laissent apparaître la surface de la SLB avec des domaines blancs (Figure 83) correspondant à des SUVs en surface de la SLB qui n'ont pas fusionnées. Ces images montrent aussi des zones noires qui correspondent à des trous dans la bicouche (Figure 83). Ces trous dans la bicouche vont permettre de mesurer la taille des deux feuillettes et ainsi vérifier si le mode de préparation nous a permis de former une bicouche de DPPC conforme à ce que l'on peut trouver dans la littérature. Une valeur de $5,8 \pm 0,2 \text{ nm}$ a été obtenue pour les mesures de hauteur ce qui est conforme avec la littérature¹⁶⁶. De ce fait, elle pourra être utilisée comme référence pour comparer avec les SLBs contenant nos composés.

Ensuite, une SLB de β -C12/DPPC (1:9 mol/mol) a été formée et elle a ensuite été imagée par AFM. (Figure 84)

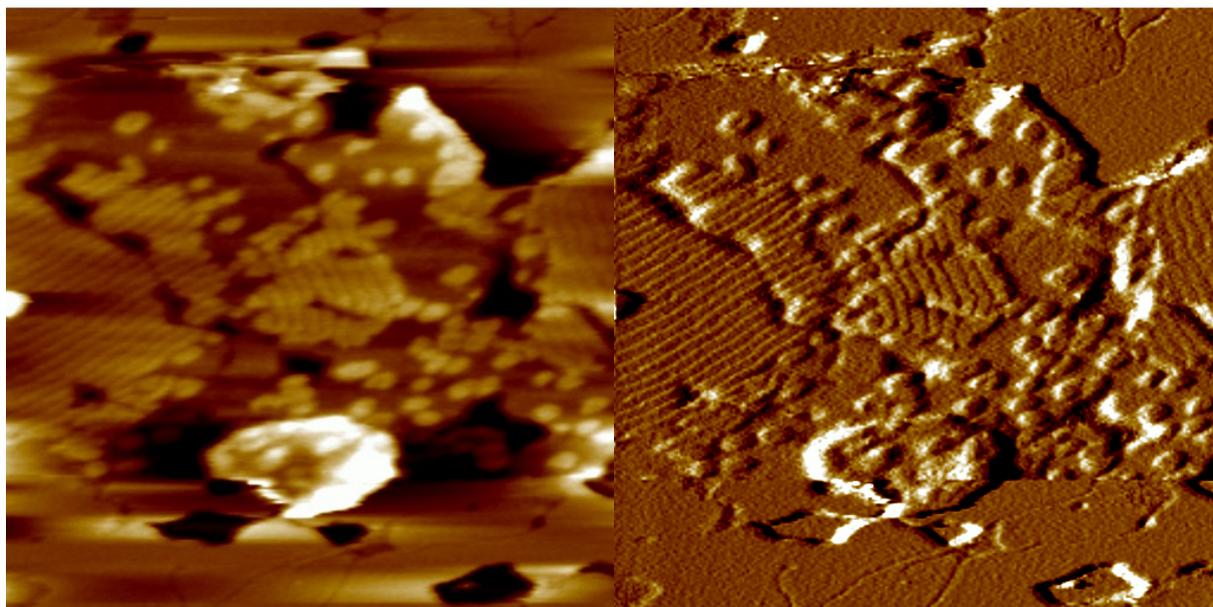


Figure 84 : Image AFM de la SLB de β -C12/DPPC (1:9 en mol) ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$, $Z = 5 \text{ nm}$)

Ces images révèlent un remaniement total de la bicouche. En effet, la bicouche de DPPC n'a plus du tout le même aspect que celle obtenue avec le lipide pur (Figure 84). On peut voir la formation d'une double bicouche présentant des zones situées dans la bicouche supérieure. L'hypothèse émise est que ces stries seraient formées par la β -C12 insérée dans la bicouche de DPPC avec un arrangement linéaire de la tête polaire CD. Pour vérifier cela, des mesures de hauteur, entre le dessus de la bicouche la plus haute et le dessus d'une strie ont été réalisées et nous avons obtenu une hauteur de $2,5 \pm 0,2 \text{ nm}$. Pour vérifier notre hypothèse, à savoir que les stries seraient dues à l'arrangement de la β -CD à la surface de la bicouche, nous avons comparé la valeur de hauteur des stries avec les dimensions de la β -CD (hauteur de $0,79 \text{ nm}$ et diamètre extérieur de $1,54 \text{ nm}$). Ceci nous a montré qu'il n'y avait aucune concordance entre la hauteur des stries et les dimensions de la β -CD. Il se peut que ces stries proviennent de la DPPC elle-même car il est connu que la DPPC peut former des domaines striés sous certaines conditions^{167,168}.

Pour remédier à ce possible artefact, nous avons utilisé un autre système lipidique constitué d'un mélange de POPC et de DPPC (1:1 en mol). L'utilisation de ce mélange lipidique va permettre de nous affranchir de la possible formation de stries par la DPPC et va nous permettre d'avoir une zone de défaut (différence de hauteur) entre la phase gel et la phase fluide, ce qui devrait faciliter l'insertion de nos composés.

Pour avoir une référence, nous avons préparé des SUVs de POPC/DPPC puis nous les avons fusionnées sur du mica et nous avons imagé la SLB obtenue. (Figure 85)

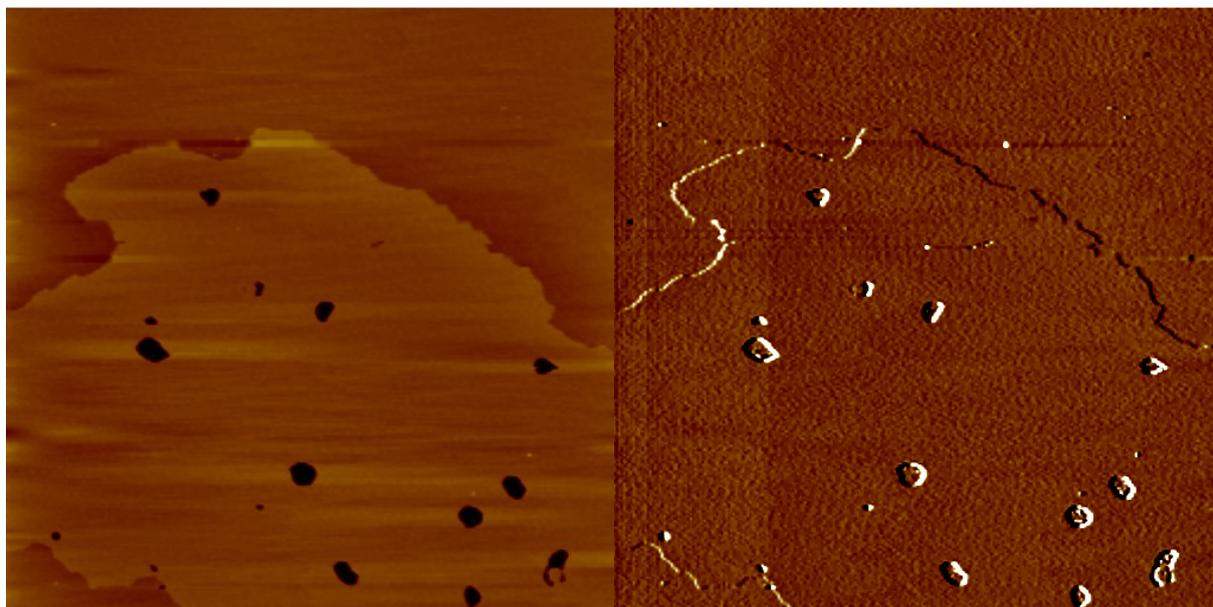


Figure 85 : Images AFM de la SLB de POPC/DPPC (1:1 en mol) ($10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, $Z = 5\text{ nm}$)

Nous obtenons une image typique du mélange POPC/DPPC. On peut observer la distinction de la phase gel de la DPPC (zone légèrement plus claire) par rapport à la phase fluide de la POPC (zone légèrement plus sombre) avec une différence de hauteur de $1,0 \pm 0,2\text{ nm}$. Ceci est en accord avec les travaux de la littérature¹⁶⁹.

A ce système lipidique, nous avons ajouté, au moment de la préparation des SUVs, la β -C12 (Figure 86) ou la β -C14 (Figure 87) à 5% en mol par rapport au système lipidique.

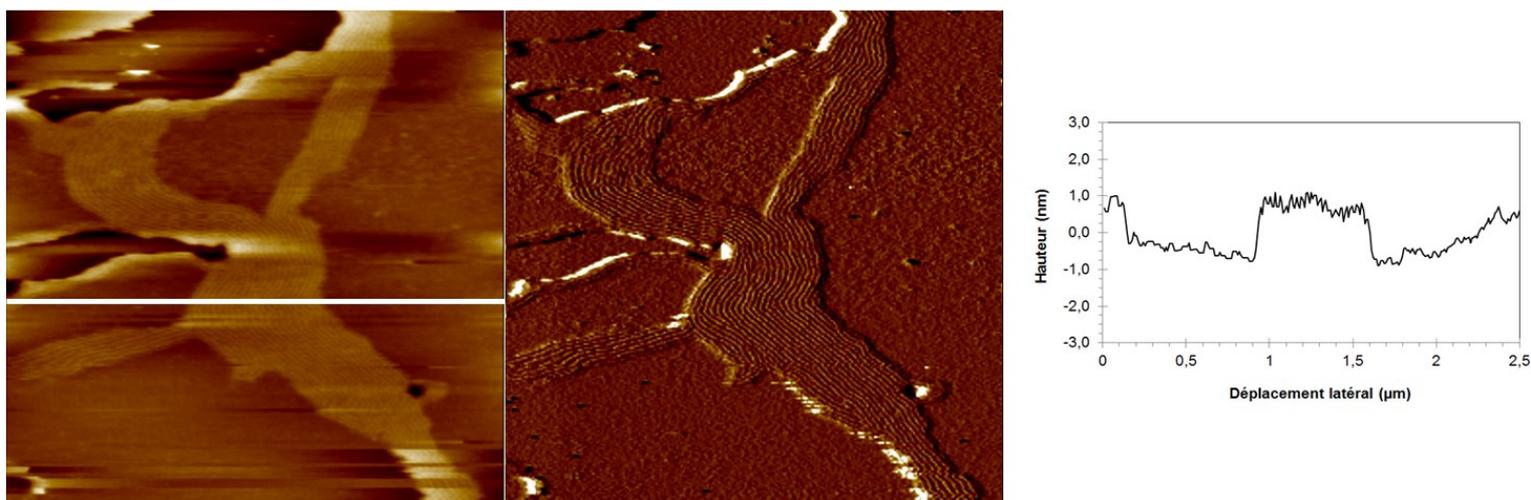
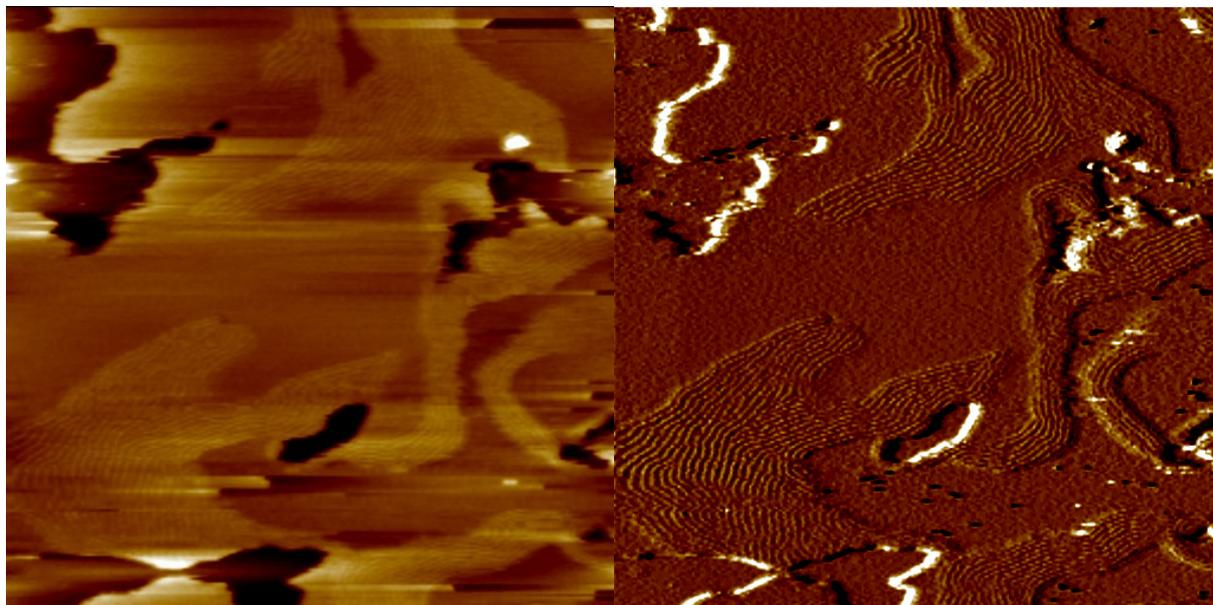


Figure 86 : Images AFM de la SLB de β -C12/POPC/DPPC (à gauche) (0,05:1:1 en mol) ($2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$, $Z = 5\text{ nm}$). Section de hauteurs (à droite)

L'ajout de la β -C12 à la bicouche de POPC/DPPC a, de nouveau, révélé un remaniement total de la bicouche avec la formation de stries alors qu'aucune double bicouche n'est obtenue. Du fait que ce système lipidique ne permet pas à la DPPC d'être impliquée dans la formation de

stries, ceci implique que c'est la β -C12, elle-même, qui forme ces stries. Ceci a pu être vérifié par des mesures de hauteur. En effet, la hauteur observée est de $1,6 \pm 0,2$ nm ce qui correspond directement au diamètre extérieur de la β -CD qui est d'environ 1,54 nm.



*Figure 87 : Images AFM de la SLB de β -C14/POPC/DPPC (0,05:1 :1 en mol)
($2,5\mu\text{m} * 2,5\mu\text{m}$, $Z = 5$ nm)*

Le même résultat qu'avec la β -C12 est obtenu, c'est-à-dire la formation de stries à la surface de la bicouche avec une différence de hauteur de $1,4 \pm 0,3$ nm.

L'ensemble de ces résultats appuie et prouve la validité des résultats obtenus en monocouche quant à la capacité des β -C12 et C14 à interagir avec le feuillet externe d'une bicouche lipidique. Ces images AFM ont aussi permis de montrer l'insertion de ces composés dans des bicouches de DPPC pure et dans un mélange POPC/DPPC, ainsi que l'arrangement membranaire de ces composés dans la membrane. Cet arrangement des CDs, lors de leur insertion dans des bicouches de DMPC, a déjà été observé par Roux et son équipe^{170,171} avec leur dilauryle et lauryle CD dont les hydroxyles sont non métylés (2 chaînes aliphatiques en C12, la β DLC et 1 chaîne en C12, la β MLC). (Schéma 37)

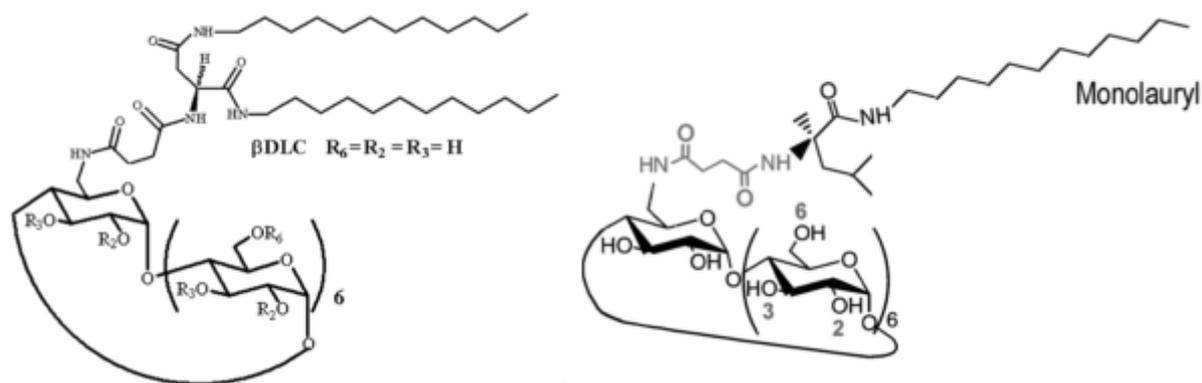


Schéma 37 : Représentation schématique de la β DLC (à gauche) et de la β MLC (à droite)^{170,171}

Une ségrégation de phase induite par la β DLC a été observée modifiant les propriétés physicochimiques de la bicouche de DMPC avec le type d'arrangement observé sur la Figure 88.

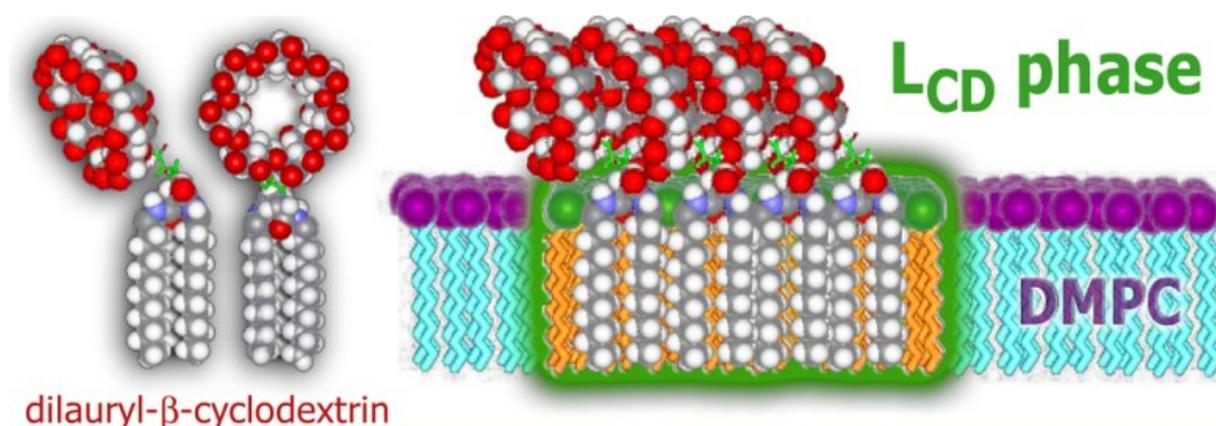


Figure 88 : Représentation de l'insertion de la β DLC dans la bicouche de DMPC¹⁷¹

Ce type de réarrangement n'a été montré qu'avec la β DLC non méthylée alors que les mêmes études réalisées avec la β DLC méthylée n'ont pas conduit à un arrangement des CDs comme représenté sur la Figure 88. Dans notre cas, nos molécules sont toutes méthylées et l'AFM a mis en évidence l'orientation des CDs « tête à tête » lorsqu'elles sont insérées dans une bicouche de DPPC.

Nous avons voulu aller plus loin dans la caractérisation de l'interaction des β -C12 et C14. Pour cela, nous avons réalisé des tests d'insertion en utilisant l'AFM en mode dynamique.

2) Etude de l'interaction des β -C12 et C14 avec une SLB de PC/SM/Chol

Cette étude AFM en mode dynamique consiste en la formation d'une SLB et son observation en AFM. La molécule d'intérêt sera ensuite ajoutée et un suivi dans le temps avec l'AFM sera réalisé. Ceci va permettre d'observer l'évolution de l'interaction du composé avec la bicouche.

Dans notre cas, nous avons préparé des SUVs de PC/SM/Chol (4:3:1 en mol, avec PC = POPC, SAPC et PLPC 1:1:1 en mol) puis nous avons fusionné les SUVs par la même procédure décrite auparavant et nous avons imagé la bicouche formée. En parallèle, nous avons préparé des SUVs de POPC (qui seront nos références), de β -C12/POPC et β -C14/POPC à 40% en mol de CD/POPC. Ce sont ces SUVs qui ont été ajoutées directement sur la bicouche de PC/SM/Chol. (Figure 89)

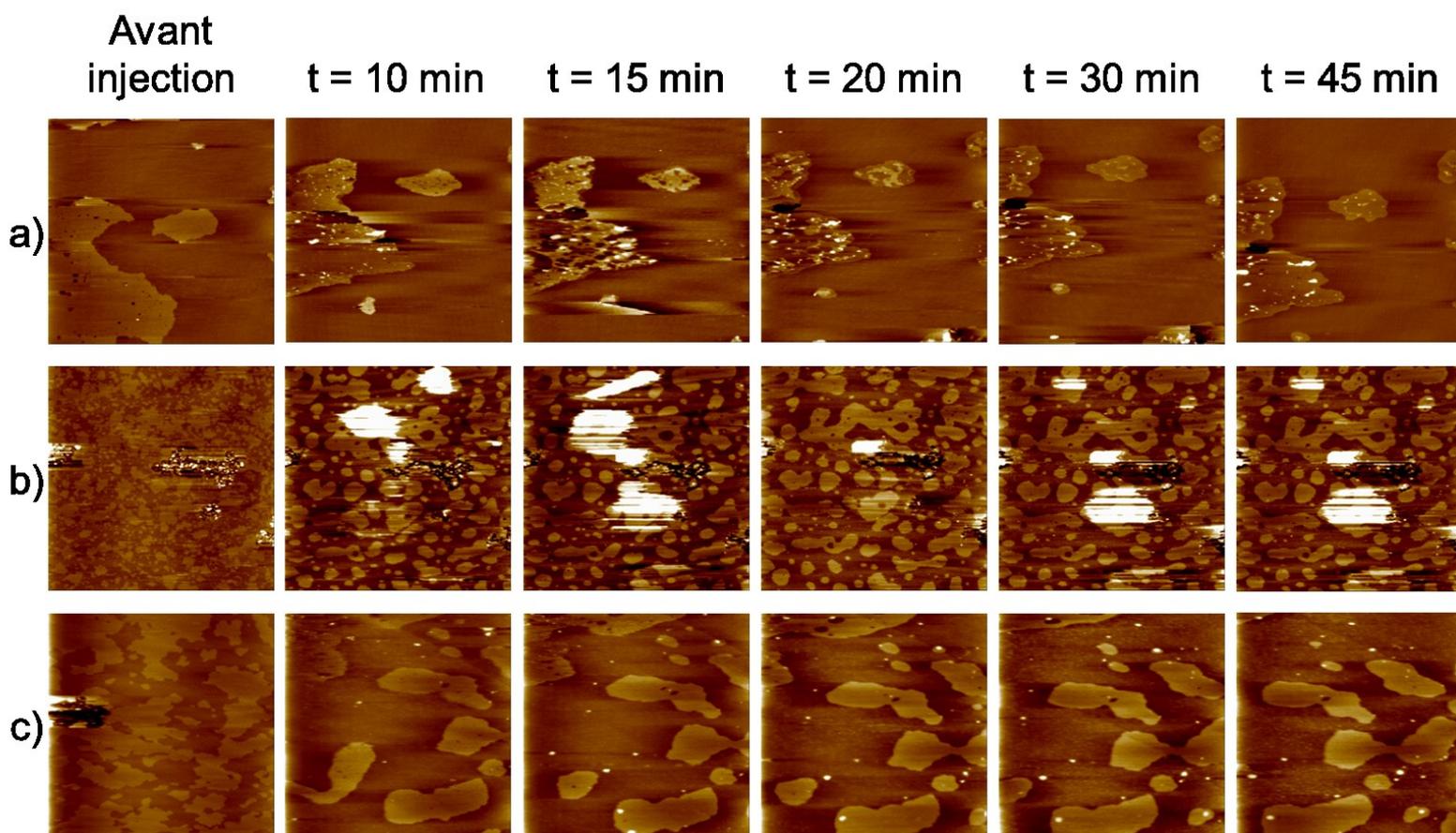


Figure 89 : Images AFM de la SLB de PC/SM/Chol en mode dynamique avec ajout de SUVs de POPC (a, $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $Z=10\text{ nm}$), de β -C12/POPC (b, $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$, $Z=10\text{ nm}$) et de β -C14/POPC (c, $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $Z=10\text{ nm}$)

Tout d'abord, la bicouche de PC/SM/Chol présente bien des domaines. Les domaines clairs, en phase gel, sont constitués de sphingomyéline et de cholestérol alors que le reste, plus sombre, correspond à la phase fluide PC.

Concernant l'ajout de POPC, nous pouvons voir que les SUVs de POPC vont se déposer à la surface de la bicouche par l'apparition de taches blanches à la surface des domaines de SM/Chol et de PC (Figure 89, images a). Nous pouvons observer une fusion lente dans le temps, après l'ajout, avec un faible remaniement des domaines de SM/Chol (Figure 89, images a).

Pour ce qui est des SUVs de β -C12/POPC, un remaniement total et très rapide de la bicouche est visible, plus particulièrement des domaines de SM/Chol. De plus, une diminution des trous dans la bicouche dès 10 min (Figure 89, image b, t=10 min) avec une quasi disparition au bout de 45 min est observée. Enfin, un épaissement des domaines suivant l'axe z qui est visible par l'obtention de domaines plus clair.

Concernant l'ajout des SUVs de β -C14/POPC, le remaniement total de la bicouche s'est passé dans les 10 premières minutes (Figure 89, images c) mais, comme pour les SUVs de β -C12/POPC, nous n'avons pas réussi à obtenir des images exploitables avant 10 min. On peut voir que le trou à gauche présent dans la bicouche (Figure 89, image c, avant injection) a complètement disparu.

En conclusion pour cette étude, nous avons pu mettre en évidence la capacité de nos composés à déstabiliser la membrane par un remaniement total des domaines et ceci se passe très rapidement. De plus, nos composés ont induit la disparition de trous dans la bicouche ce qui prouve une fois de plus leur caractère fusogène déjà montré par les tests précédemment réalisés.

L'AFM nous a permis de mettre en évidence ce qui avait été montré par les études réalisées sur les monocouches de Langmuir et celles réalisées en fusogénicité.

F. Imagerie des agrégats et des nanoparticules de β -C12 et C14 par TEM

1) Images et analyses élémentaires des agrégats de β -C12 et C14

Les β -C12 et C14 ont montré leur capacité à former des agrégats en solution aqueuse et des vésicules mixtes avec la POPC en utilisant la DLS. Par contre, la DLS ne nous donne aucune

information sur la morphologie des nanoparticules formées en solution. De ce fait, l'utilisation du TEM est nécessaire.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des images sur la formation des agrégats des β -C12 et C14 sans traitement préalable. (Figure 90)

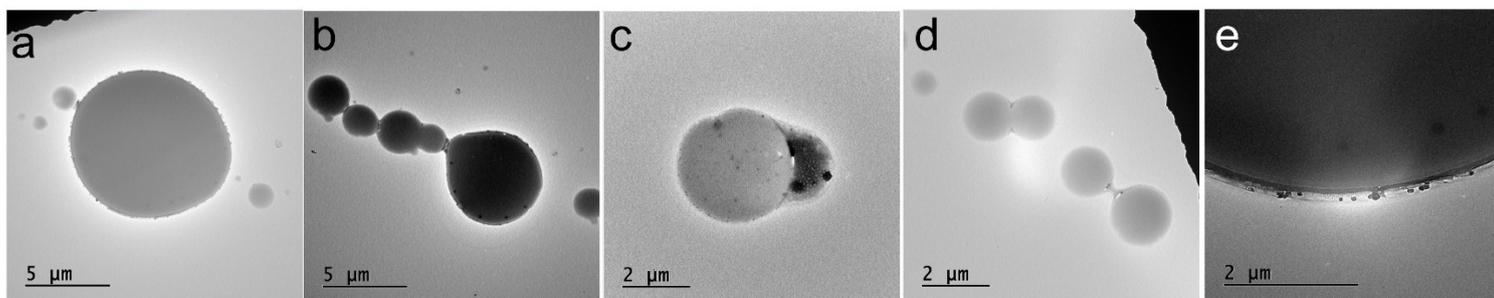


Figure 90 : Images TEM des agrégats de β -C12

Ces images prouvent bien la formation d'agrégats observée par DLS. Par contre, nous observons des tailles bien plus grandes qui peuvent être dues à la fusion entre les différents agrégats lors de la préparation de l'échantillon. Cette fusion entre les agrégats peut être observée sur les images b, c et d de la Figure 90.

Des images des agrégats de la β -C14 ont été aussi obtenues en utilisant le STEM qui donne des images en « dark field ». (Figure 91)

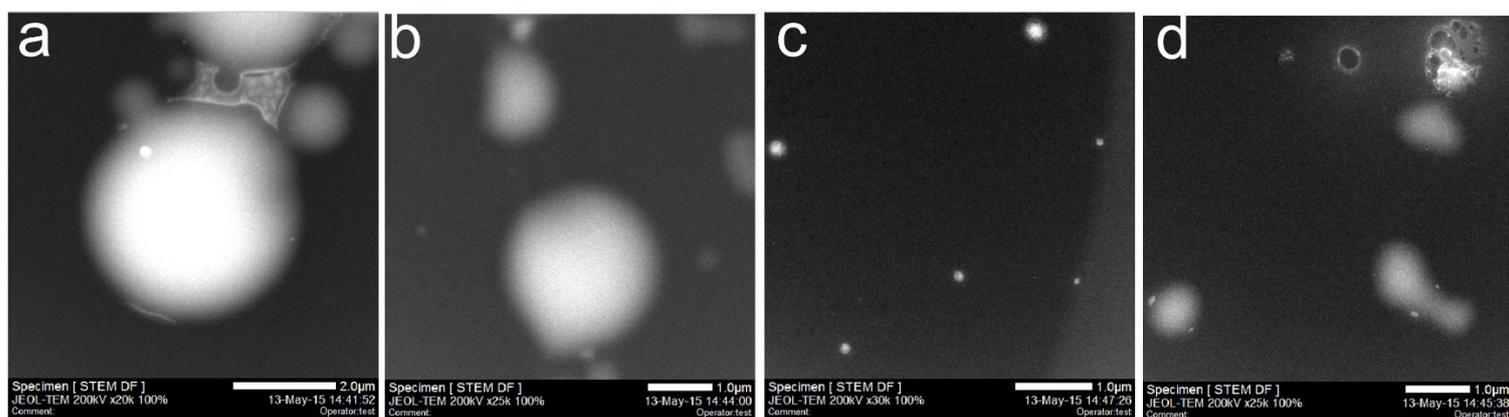


Figure 91 : Images STEM des agrégats de β -C14

La formation d'agrégats avec la β -C14 est aussi observée avec une population assez polydisperse comme pour la β -C12.

Ensuite une analyse élémentaire a été réalisée pour prouver que les agrégats observés sont bien des agrégats constitués de nos composés. (Figure 92)

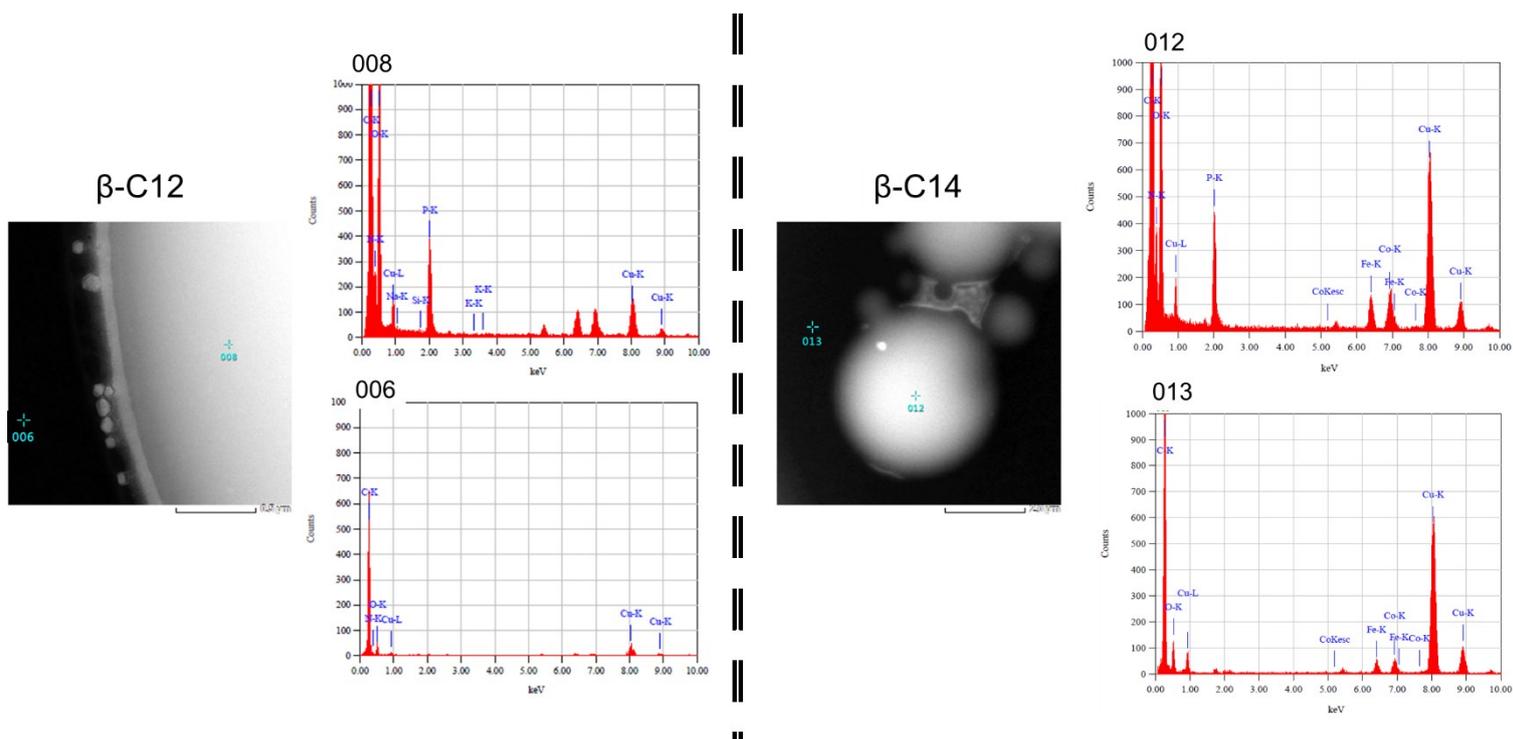


Figure 92 : Analyse élémentaire sur un agrégat de β -C12 (à gauche) et de β -C14

Cette analyse élémentaire a donné un résultat intéressant. Les graphes 006 et le 013 correspondent à une analyse sur la grille, supportant notre échantillon, qui révèle la présence de carbone et de cuivre (qui constitue la grille), d'oxygène et d'azote (présent dans l'air) (Figure 88, graphe 006 et 013). Par contre, les graphes 008 et 012 correspondent à une analyse au cœur de l'agrégat qui révèle une grande présence de carbone et d'oxygène (constituants principaux de nos molécules) mais aussi du phosphore et de l'azote (fonction phosphoramidyl). Ceci prouve clairement que les agrégats formés en solution sont bien des agrégats constitués de nos molécules β -C12 et β -C14.

2) Images et analyses élémentaires des nanoparticules de β -C12 et C14

Dans cette étude, les nanoparticules de β -C12 et β -C14 pures ont été préparées suivant le mode opératoire décrit précédemment (cf partie résultats et discussions II, C). Les deux composés ont pu être imagés et l'analyse élémentaire de la β -C12 a été réalisée. (Figure 93)

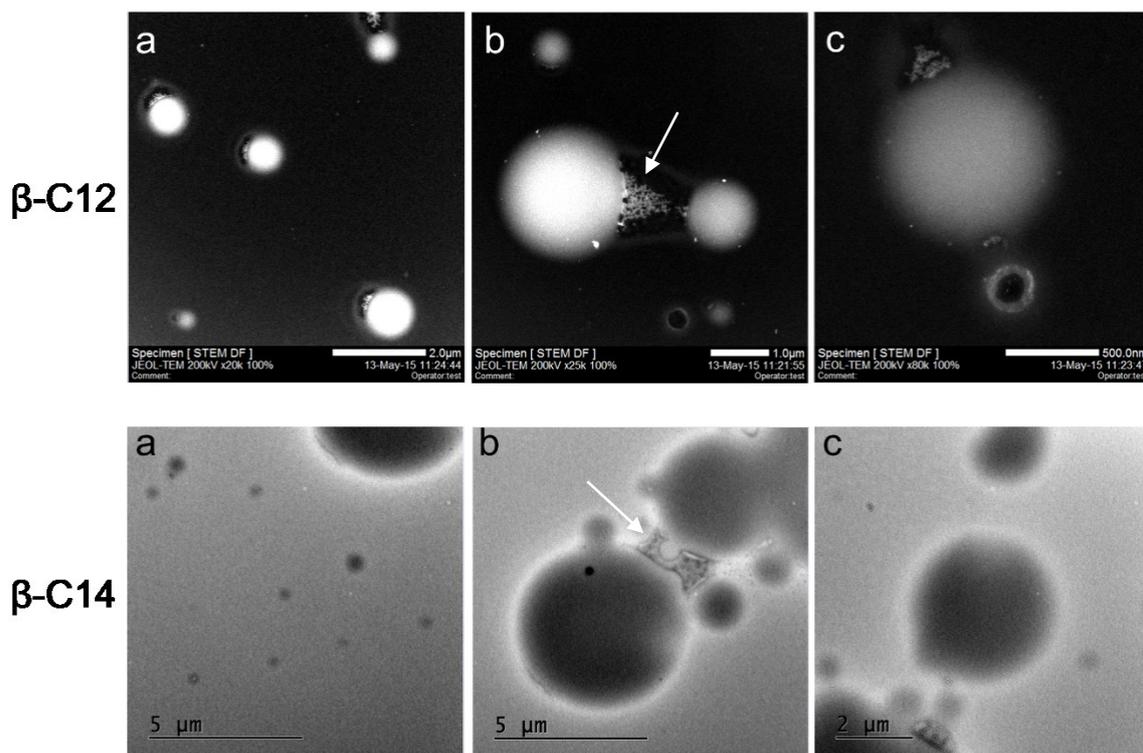


Figure 93 : Images STEM des nanoparticules de β -C12 (en haut) et TEM des nanoparticules de β -C14 (en bas)

Les images obtenues ont permis de montrer la formation de nanoparticules à partir de nos composés. Pour les deux composés, on observe des nanoparticules de grandes tailles qui ne sont pas observées en DLS. La préparation des échantillons favorise sûrement la fusion entre les nanoparticules comme observé pour la formation des agrégats. La forme sphérique observée pour les agrégats est maintenue. Par contre, on peut remarquer, surtout pour la β -C12, une chose qui est accrochée aux nanoparticules (Figure 93, voir flèche) et ceci n'était pas observé lors de la formation de l'agrégat. L'analyse élémentaire va nous permettre de connaître sa composition (Figure 93, β -C12).

Ensuite, l'analyse élémentaire a été réalisée uniquement sur la β -C12 car la β -C14 ne nous a pas fourni d'images STEM exploitables pour déterminer la composition de cet échantillon. (Figure 94)

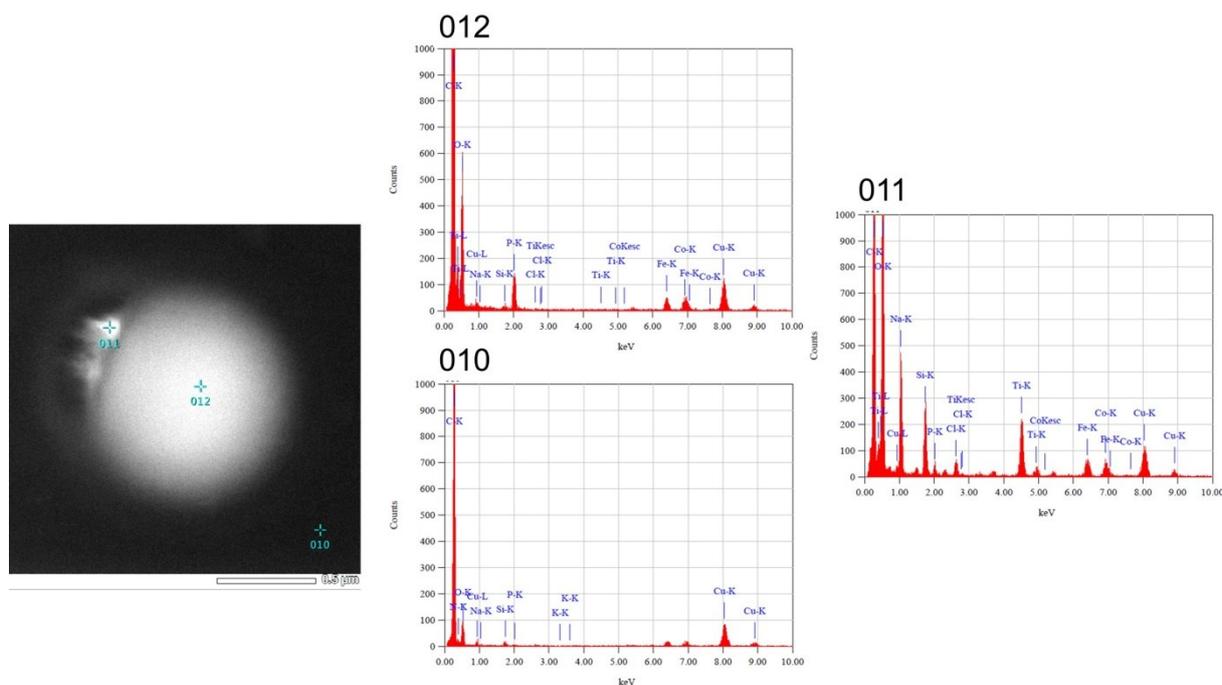


Figure 94 : Analyse élémentaire d'une nanoparticule de β -C12

Cette analyse élémentaire a donné des résultats comparables à ceux obtenus pour les agrégats (Figure 90). Le graphe 010 correspond à l'analyse de la grille qui révèle la présence de carbone et de cuivre constituant la grille, d'oxygène et d'azote présent dans l'air (Figure 94, graphe 010). Par contre, le graphe 012 correspond à une analyse au cœur de l'agrégat qui révèle une grande présence de carbone et d'oxygène qui constitue principalement notre molécule) mais aussi du phosphore et de l'azote provenant de la fonction phosphoramidyl. Le graphe 011 permet de montrer la composition des particules accrochées aux nanoparticules, il s'agit de titane provenant de la sonde à sonication. Bien qu'une filtration soit mise en place après la sonication, celle-ci ne permet pas de retirer toutes les nanoparticules de titanes présentes dans le milieu. Une fois de plus, l'analyse élémentaire a permis de montrer que les nanoparticules formés sont bien constituées de notre molécule, la β -C12.

III. Etudes d'intégrité et de transport sur modèle de BHE *in vitro*

A. Présentation du modèle *in vitro*

Un modèle de BHE *in vitro* a été mis au point au Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE, Université d'Artois, Lens). Celui-ci a été développé par croissance de cellules endothéliales d'un côté d'un filtre, disposé au-dessus d'un puit constitué d'une membrane microporeuse maintenue par une structure rigide recouverte d'une matrice appelée « coating », constituée de gel de collagène de queue de rat, permettant l'adhérence et la croissance des cellules endothéliales cultivées à sa surface. Le milieu de culture contient deux populations de cellules, les astrocytes de rat (cellules gliales) dans le compartiment inférieur et les cellules endothéliales dans le compartiment supérieur, qui va permettre un échange humorale. (Figure 95)

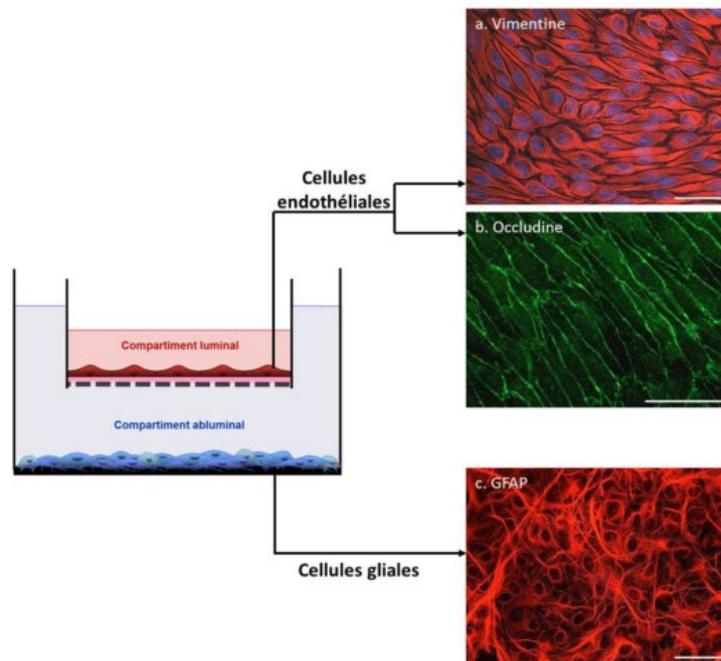


Figure 95 : Modèle de BHE *in vitro* élaboré par le LBHE basé sur la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et de cellules gliales de rat¹³⁸

L'image a. (Figure 95) fait apparaître les cellules endothéliales immunomarquées par la vimentine (en rouge) et par l'occludine (en vert, image b) et aussi les noyaux marqués au colorant de Hoechst (en bleu, image a). L'image c, quant à elle, permet de visualiser les cellules gliales disposées au fond du puits.

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins forment une monocouche de petites cellules étroitement serrées sans chevauchement mimant ainsi les caractéristiques de la BHE et conservant l'antigène lié de facteur VIII et l'enzyme de conversion de l'angiotensine¹⁷².

B. Etudes d'intégrité sur le modèle de BHE *in vitro*

En premier lieu, nous avons réalisé un test d'intégrité, ce dernier permet de juger l'effet de différentes concentrations de nos molécules sur l'intégrité des cellules endothéliales de la BHE. A la suite des 12 jours de coculture, les cellules endothéliales sur leur filtre sont déposées au-dessus d'un puits, ne contenant pas de cellules gliales, pour être rincées avec du tampon RH à 37°C. Après ce lavage, les cellules endothéliales sont placées sur un autre puits contenant 2,5 mL de tampon RH. Les solutions contenant nos produits à différentes concentrations avec le saccharose radioactif, utilisé comme marqueur d'intégrité du fait de son faible passage, sont déposées dans le compartiment supérieur (« compartiment sanguin ») et l'expérience est réalisée sous forme d'une cinétique. (Figure 96)

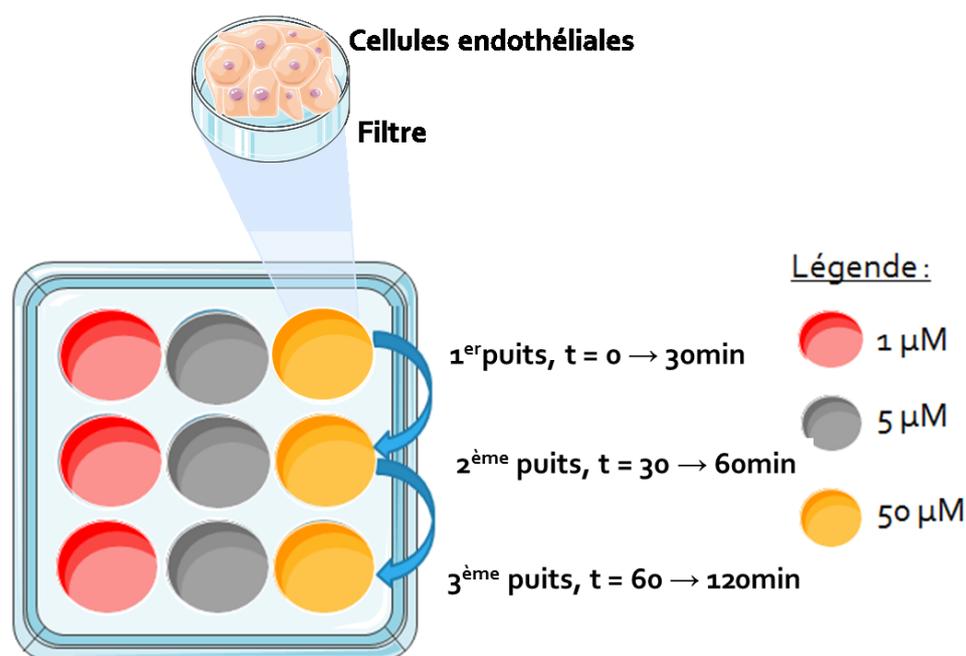


Figure 96 : Protocole mis en place pour l'étude de l'intégrité des cellules endothéliales vis-à-vis de composés d'intérêt.

(■), (■) et (■) puits contenant, respectivement, une concentration en CD de 1 µM, 5 µM et 50 µM

A la fin de l'expérience, la radioactivité est comptée au compteur à scintillation sur 500 µL prélevé dans les compartiments inférieurs (« compartiments cérébraux ») pour déterminer le coefficient de perméabilité du saccharose pour chaque solution. Si sa valeur est supérieure à 1.10^{-3} cm/min, ceci signifie que les jonctions serrées des cellules endothéliales ont été endommagées ou détruites et donc que notre molécule est toxique à cette concentration. (Figure 97)

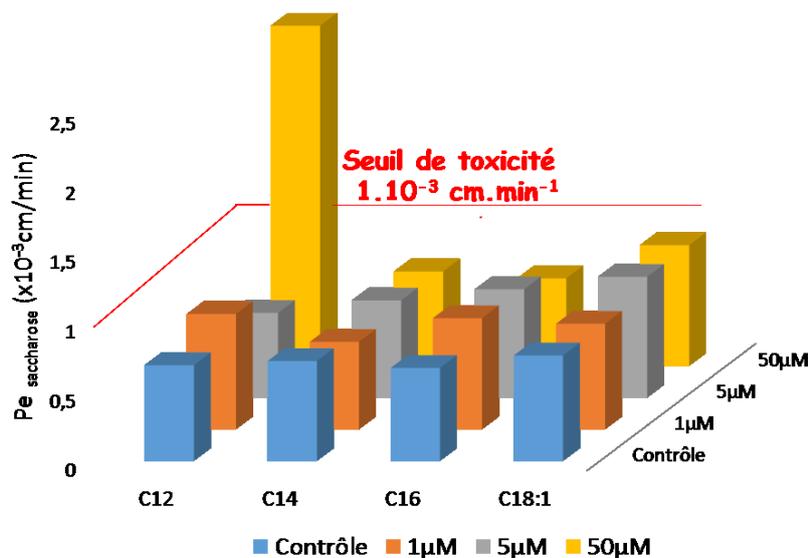


Figure 97 : Résultats des tests d'intégrité des phosphoramidyls β -CDs

D'après ces résultats, nous pouvons déduire qu'aucune de nos molécules n'est toxique pour la BHE à part le composé β -C12 à une concentration de 50 μM (Figure 97).

Après avoir testé la toxicité de nos composés seuls à l'égard des cellules endothéliales, nous avons testé la toxicité des vésicules mixtes β -C12/POPC et β -C14/POPC qui, au vu des résultats de physicochimie, semblent être les meilleurs candidats pour la vectorisation de composés. (Figure 98)

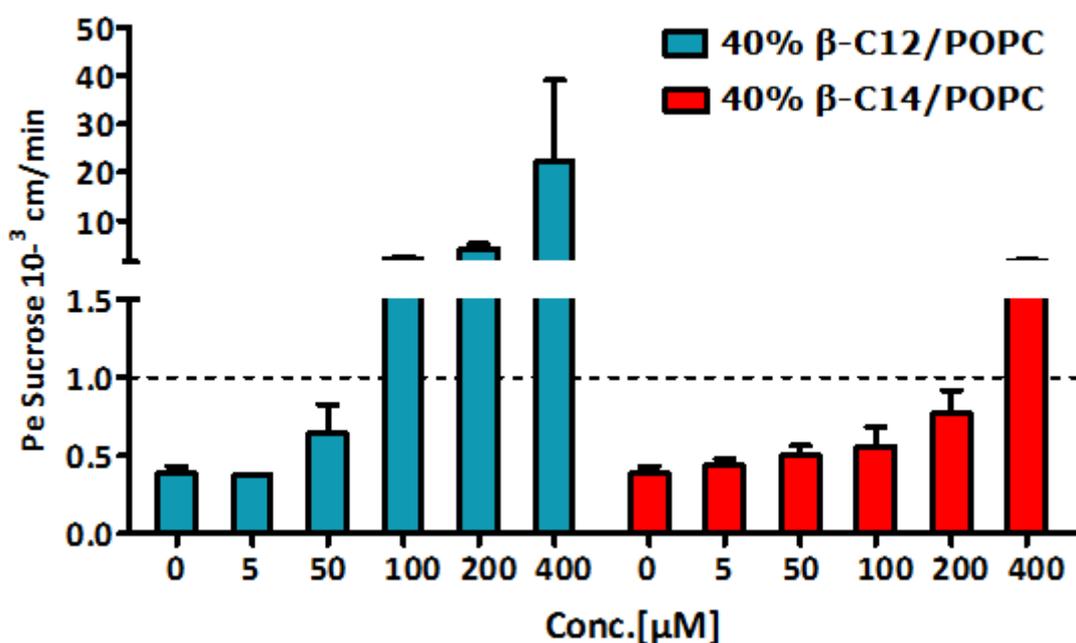


Figure 98 : Résultats des tests d'intégrité des vésicules mixtes β -C12/POPC et β -C14/POPC à 40% molaire

Nous avons pu tester une grande gamme de concentrations de 5 à 400 μM . Au vu des résultats, comme pour les tests d'intégrité précédents (Figure 97), nous remarquons que les vésicules contenant la $\beta\text{-C12}$ sont plus toxiques que celles contenant le composé $\beta\text{-C14}$. En effet, les vésicules mixtes $\beta\text{-C12/POPC}$ sont toxiques à partir de 100 μM alors que les vésicules $\beta\text{-C14/POPC}$ ne le sont qu'à partir de 400 μM (Figure 98). Ceci peut être expliqué par le fait que la $\beta\text{-C12}$ interagit plus fortement avec les cellules endothéliales que la $\beta\text{-C14}$ comme cela a été montré lors de des études physicochimiques sur modèle biomimétique

Nous avons aussi testé le principe actif dont nous comptons améliorer le transport à travers la BHE. Ce principe actif est l'Atazanavir (ATV) qui est un anti-rétroviral efficace du VIH, passant peu la BHE. Il est, de ce fait, inefficace contre le virus du VIH ayant pénétré le Système Nerveux Central (SNC). Améliorer son passage est un vrai challenge qui pourrait avoir des répercussions non négligeables sur l'amélioration des conditions de vie des personnes atteintes du VIH. Nous avons aussi testé la vésicule de POPC qui nous servira comme témoin lors des tests de transport.

Ces composés ont été introduits à différentes concentrations et les résultats ont été représentés Figure 99.

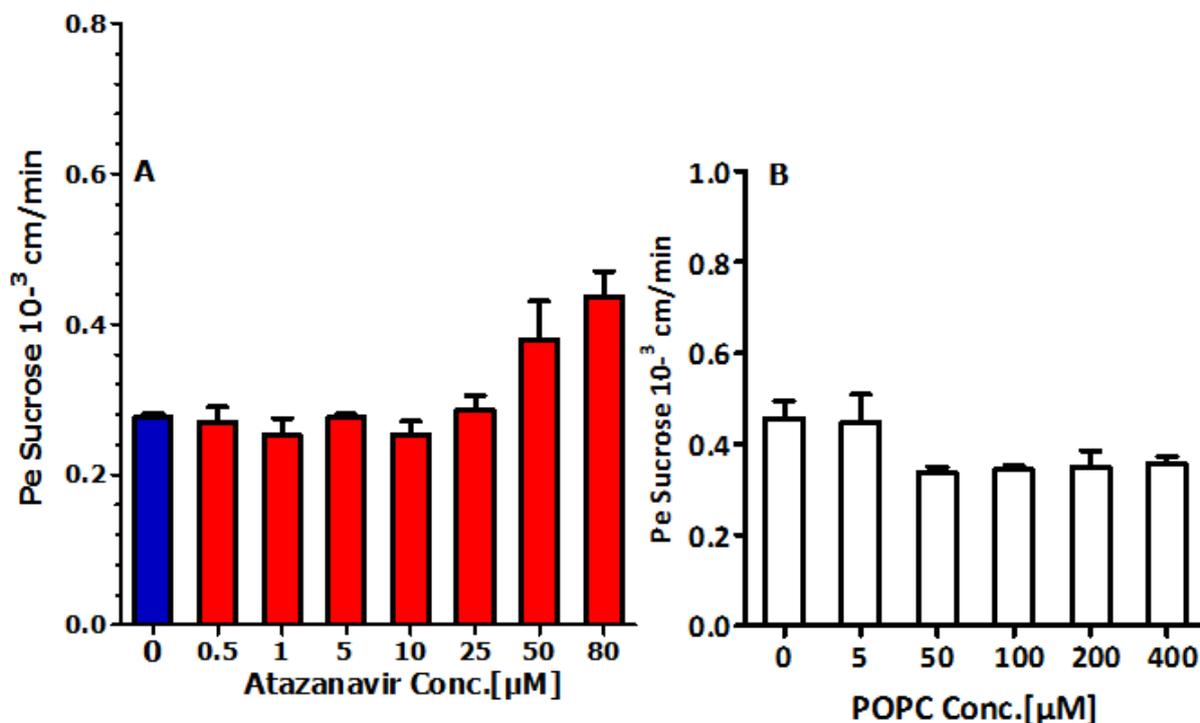


Figure 99 : Résultats des tests d'intégrité de l'ATV [A] et de la vésicule de POPC [B]

Ces résultats nous montrent que l'ATV (Figure 99, [A]) et les vésicules de POPC (Figure 99, [B]) ne sont pas toxiques à l'égard de la BHE pour l'ensemble des concentrations

testées. Nous n'avons pas pu tester une concentration plus élevée que $80 \mu\text{M}$ pour l'ATV car déjà à cette concentration nous avons observé un problème de solubilité. De ce fait, pour les tests de transport nous allons nous limiter à une concentration de travail ne dépassant pas $50 \mu\text{M}$.

C. Estimation de la perméabilité de la BHE

L'estimation de la perméabilité du modèle *in vitro* de BHE a été réalisée sur le passage de l'ATV seul ou encapsulé dans des vésicules mixtes β -C12 et β -C14/POPC mais aussi de vésicules de POPC. Ceci a permis de voir directement l'effet de nos molécules par rapport au passage de l'ATV. Les résultats obtenus sont montrés Figure 100.

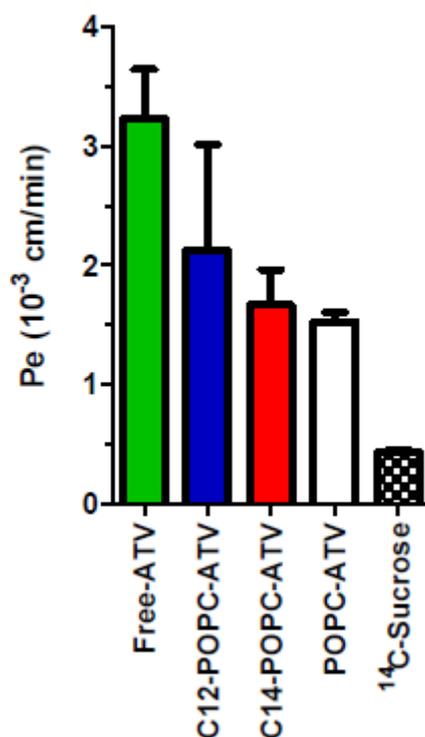


Figure 100 : Perméabilité (Pe) de l'ATV libre (vert), dans β -C12/POPC (bleu), β -C14/POPC (rouge) et POPC (blanc). Viabilité des cellules contrôlée par le ^{14}C saccharose

Tout d'abord l'intégrité des cellules a été contrôlée par le saccharose radioactif et ceci a montré une bonne intégrité des cellules avec une valeur de $Pe \approx 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min}$ qui correspond à la perméabilité classiquement observée pour ce marqueur d'intégrité. A notre surprise, les tests réalisés ont montré un haut taux de passage de l'ATV seul avec une perméabilité de $Pe \approx 3,23 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min}$. Aucun système de transport n'a alors augmenté son passage à travers ce modèle car il passe déjà très bien tout seul (Figure 100). Après avoir

constaté ce problème, nous avons voulu savoir si nos composés permettaient d'augmenter l'internalisation de l'ATV au sein des cellules endothéliales de la BHE. (Figure 101)

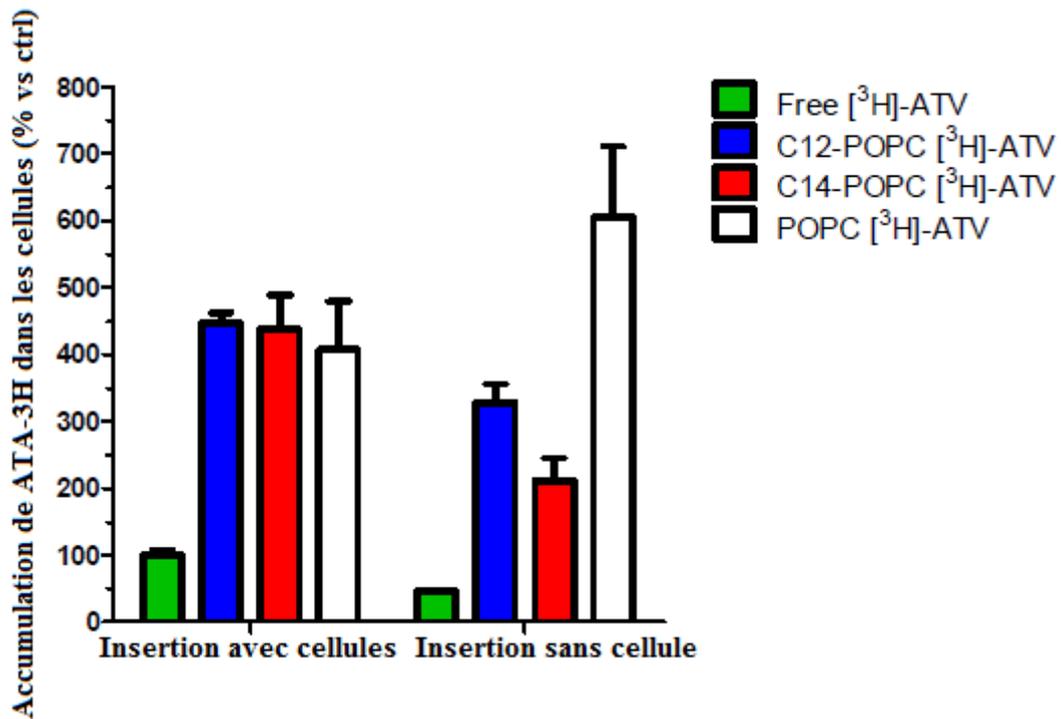


Figure 101 :Internalisation de l'ATV- ³H dans les cellules endothéliales

L'encapsulation de l'ATV dans des nanoparticules a permis une augmentation de son internalisation dans les cellules endothéliales (Figure 101, à gauche). Par contre, on peut voir aussi que l'ATV s'accumule beaucoup au niveau du filtre et du collagène qui supportent les cellules endothéliales, en particulier pour les nanoparticules de POPC. Pour montrer le réel apport des nanoparticules dans l'internalisation de l'ATV, nous avons soustrait le taux d'accumulation de l'ATV sans cellule à celui avec cellule. (Figure 102)

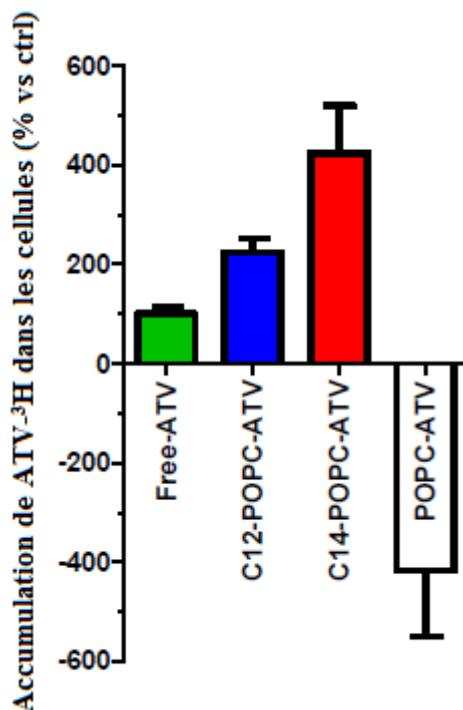


Figure 102 : Normalisation de l'internalisation de l'ATV- ³H dans les cellules endothéliales

Cette normalisation permet de mieux rendre compte de l'internalisation de l'ATV. Nous pouvons voir une internalisation de l'ATV multipliée, respectivement, par 2 et par 4, pour les vésicules mixtes de β -C12/POPC et β -C14/POPC, comparé à l'ATV non encapsulée. Ces résultats permettent de confirmer ce qui a été montré lors des tests physicochimiques, à savoir le caractère fusogène. En effet, cette augmentation de l'internalisation de l'ATV traduit bien un mécanisme de fusogénicité avec un mélange du contenu de la vésicule mixte contenant l'ATV avec le milieu intracellulaire des cellules endothéliales.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont tout d'abord permis l'élaboration d'une nouvelle voie de synthèse convergente des phosphoramidyls CDs. Cette dernière a permis la synthèse de la famille des phosphoramidyls CDs et des phosphoramidyls-méthyles glucosides pour ainsi obtenir la librairie de molécule souhaitée pour élaborer l'étude structure/activité voulue. Nous avons donc pu obtenir des phosphoramidyls β -CDs avec des longueurs de chaînes variées en C12, C14, C16, C18 et C18:1, des phosphoramidyls γ -CDs avec des longueurs de chaînes en C12 et C14 et enfin des phosphoramidyls-méthyles glucosides en C12, C14, C18 et C18:1. L'obtention de ces composés a permis de mener à bien l'étude structure/activité quant à l'influence de la longueur des chaînes aliphatiques (C12, C14, C16, C18 et C18:1) mais aussi quant à l'influence de la tête polaire (β -CD, γ -CD et glucose). Cette voie convergente permet une synthèse aisée d'une large gamme de composés amphiphiles tout en respectant plusieurs principes de la chimie verte, comme les réactions sans solvant (CD et phosphites aliphatiques), l'utilisation de molécules issues de la biomasse (CDs, saccharides, alcools gras), l'économie d'atomes (pour l'obtention des phosphites aliphatiques), l'utilisation de procédé catalytique (Hcube).

Les phosphoramidyls β -CDs qui ont été obtenues plus rapidement et en plus grande quantité ont été sélectionnées pour réaliser l'étude structure/activité. De plus, les phosphoramidyls-méthyles glucosides n'étant pas solubles dans l'éthanol ils n'ont pas pu être testés.

Tout d'abord, nous avons déterminé le caractère tensioactif de nos composés en déterminant la Concentration d'Agrégation Critique (CAC) et en étudiant son caractère à l'interface air-eau. Ceci a montré que l'ensemble des composés ont un caractère tensioactif bien marqué.

L'étude structure/activité a été réalisée montrant que la longueur des chaînes aliphatiques présentes dans nos structures a une influence sur leur capacité à interagir avec des membranes biomimétiques, que ce soit pour la POPC ou la PC/SM/Chol (4:3:1 ou 2:1:1, mol:mol:mol). Effectivement, les tests en monocouches de Langmuir ont permis de montrer que les phosphoramidyls β -CDs C12 et C14, c'est-à-dire à plus courtes chaînes, avaient une plus grande capacité à interagir avec la monocouche que les phosphoramidyls β -CDs C16 et C18:1. Ceci a été montré par la détermination de la Pression d'Insertion Maximale (PIM) et du $\Delta\pi_{30mN/m}$. Cette meilleure interaction avec les membranes biomimétiques peut être due à une plus grande facilité des chaînes courtes à s'insérer dans la monocouche. De plus, des témoins négatifs ont permis de prouver que c'est bien l'effet de la CD liée aux chaînes aliphatiques qui

induit cette forte interaction avec les membranes biomimétiques modèle (POPC) ou mimant la composition lipidique des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (PC/SM/Chol).

Des images de TEM et STEM ont permis, respectivement, d'observer des NPs formées à partir des β -C12 et β -C14 et de réaliser une analyse élémentaire permettant de montrer que les NPs observées sont bien formées par nos composés.

Dans l'optique de réaliser des vésicules mixtes pour le transport de médicaments, nous avons réalisé des mélanges de nos composés avec la POPC afin de caractériser les types d'interaction mis en jeu. Les résultats nous ont montré que les β -CDs forment des mélanges répulsifs avec la POPC favorisant ainsi le caractère fusogène des vésicules mixtes. Après avoir préparé des vésicules mixtes, le test de fusogénicité a révélé une meilleure capacité fusogène pour les composés à courtes chaînes (C12 et C14). En effet, les β -C12 et β -C14 se sont révélés être très fusogènes, en particulier pour les vésicules mixtes à 40% CD/POPC (mol:mol) à l'inverse des β -C16 et β -C18:1. Le mécanisme d'interaction conduisant à la fusion membranaire a été étudié en utilisant deux techniques. D'une part, l'étude de l'ordre lipidique n'a pas révélé de modification de l'ordre lipidique au sein de vésicules de POPC, d'autre part, l'étude des ajouts constants de cholestérol a révélé la présence de vides hydrophobes qui n'étaient pas visibles par l'étude de l'ordre lipidique. Ceci a donc montré que le processus de fusion membranaire est initié par les vides hydrophobes initialement présents dans les vésicules mixtes β -C12 et β -C14/POPC.

Les tests de relargage *in vitro* réalisés ont montré la capacité des vésicules mixtes, β -C12 et β -C14, à relarguer lentement l'atazanavir permettant ainsi un relargage contrôlé de ce dernier dans le milieu.

L'insertion des β -C12 et β -C14 dans des bicouches de DPPC et POPC/DPPC (1:1) a été étudiée en AFM. Le mode statique a révélé l'insertion de ces composés dans les deux types de bicouches et plus particulièrement dans celle de POPC/DPPC (1:1) où la taille des stries observées correspond au diamètre de la CD.

Les tests biologiques sur le modèle de BHE *in vitro* ont permis de déterminer la concentration à laquelle les phosphoramidyls β -CDs sont toxiques à l'égard de ce modèle. La β -C12 est toxique à 50 μ M alors que les autres composés ne sont pas toxiques aux concentrations testées et jusqu'à 50 μ M. Ensuite, l'étude de la toxicité des vésicules mixtes 40 % β -C12 et β -C14/POPC (en mol) a montré une toxicité à partir de, respectivement, 100 μ M et 400 μ M.

Les tests de transport de l'atazanavir ont montré que l'atazanavir seul avait déjà une très grande perméabilité à travers le modèle de BHE utilisé. Nous avons, tout de même, montré un phénomène intéressant lié aux résultats physicochimiques obtenus. En effet, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'internalisation de l'atazanavir qui est essentiellement due à la capacité de nos vésicules mixtes à fusionner avec les membranes biologiques. Cette capacité peut être intéressante si l'on veut cibler l'internalisation de composé d'intérêt dans les cellules endothéliales. Les statines hydrophiles, plus particulièrement la pravastatine, connues pour diminuer la synthèse de cholestérol intracellulaire peuvent se révéler utiles dans le traitement des accidents cardiovasculaires (AVC) aigu, mais ils passent très peu la BHE. La mise au point d'une formulation avec nos composés pourrait donc améliorer l'internalisation de ces statines permettant de produire leur effet qui pourrait traiter les maladies cardiovasculaires¹⁷³.

Du point de vue chimique, il serait bien d'améliorer la voie de synthèse des phosphoramidyls γ -CDs afin d'en obtenir en plus grande quantité et ainsi pouvoir réaliser les tests physicochimiques qui ont été réalisés sur les phosphoramidyls β -CDs. Ceci permettrait de voir l'effet de la tête polaire CD sur l'interaction avec les membranes biomimétiques ainsi que sur la fusogénicité, sur la formation de nanoparticules mais aussi sur l'insertion dans des bicouches supportées. La modification d'interaction qui pourrait être générée par la γ -CD conduirait peut être à d'autres propriétés physicochimiques permettant de réaliser du transport à travers la BHE.

Il serait intéressant de tester l'effet des nanoparticules de nos composés seuls sur le relargage de l'atazanavir mais aussi sur son transport à travers la BHE. Il se peut que la formulation de vésicules mixtes permette une application pour l'internalisation de principes actifs au sein des cellules endothéliales alors que la formulation des nanoparticules avec nos composés seuls pourrait être plus efficace pour le transport à travers la BHE.

Le transport d'autres molécules d'intérêt pharmacologique pourrait être testé, telles que la Scopolamine et la N-méthyle Scopolamine avec nos formulations pour le traitement de la maladie d'Alzheimer¹⁰. L'augmentation du passage ne suffit pas, dans certains cas et il faut ajouter à cela le ciblage des cellules à traiter, comme dans le cas du traitement des cancers cérébraux par la doxorubicine. L'ajout de transferrine à la formulation de nos nanovecteurs permettrait un ciblage des cellules endothéliales permettant un passage à travers celles-ci par la transcytose à récepteurs. Pour avoir un ciblage des cellules cancéreuses, il faudrait pouvoir

greffer le tamoxifène à nos CDs. L'utilisation de la transferrine et du tamoxifène permettrait de cibler les cellules tumorales du cerveau¹⁷⁴.

EXPERIMENTAL PART

I. Materials and methods

A. Chemical products and solvents.

Wacker Chemicals, Sigma- Aldrich, Fluka, Acros and TCI supplied reagents and solvents. DMF were distilled beforehand under argon atmosphere (on barium oxide). Distilled DMF was kept on molecular sieves. Deuterated solvents (CDCl_3 , D_2O , DMSO-d_6) were purchased from Eurisotop (France).

B. Chromatography.

1) Thin Layer Chromatography (TLC)

Analytical TLC were performed using Silica Gel 60 F₂₅₄plates (Merck, Germany). Eluents used were mixtures of dichloromethane-methanol, cyclohexane-ethyl acetate, ethyl acetate-methanol or butanol-ethanol-water ammoniac.

Ratios were specified in each case in experimental part. Products were revealed by UV light ($\lambda = 254 \text{ nm}$) followed by charring with vanillin- H_2SO_4 .

2) Adsorption chromatography

a) Manual method

Chromatographic separations were done in glass column filled with silica gel (GERUDAN[®], Silica gel Si 60 (40-63 μm), MERCK KGaA). Crude product was dissolved in minimum of solvent and deposited on head of column. Elution was done with eluent or elution gradient under air pressure. Eluent composition was specified for each compound in experimental part.

b) Automatic method

Flash chromatographic device (Reveleris iES Flash System) supplied by Grace (USA) was used for this method. Separation was done thanks to available columns:

- Various kinds (silica, C-18)
- Various sizes (12 g to 80 g)

The wide range of column allows us to use many eluents in normal phase and we limited ourselves at the use of ethyl acetate, cyclohexane, dichloromethane, methanol and in reversed phase (methanol, acetonitrile, water).

The compound detection is achieved with an evaporative light scattering detector and a UV detector with two wavelengths (200 nm to 400 nm).

3) Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography was performed with a cation exchanger resin AG® MP-50(100-200mesh, Biorad, U.S.A.). Resin was deposited on glass column and was washed with distilled water and then with chlorhydric acid (1N). The crude product was dissolved in an acid solution (pH = 2) before being deposited on head of column. Then, distilled water passed through the resin to eliminate impurities. Finally, the wanted product was recovered by elution with ammoniac solution (20%).

4) Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

The high-performance liquid chromatography used was an Alliance 2695 chain (Waters, France) provided with a thermostated sample distributor and a photo diode array detector PDA 2996 (Waters, France). Mass spectrometer, with electrospray ionisation source, was a ZQ 4000 (Waters-Micromass, Manchester, UK). The chromatographic column used was a reversed phase column Apollo™ C18 (4.5x250mm, 5µm, Grace®, France). The conditions for LC-MS were an elution performed at 1 ml/min using an isocratic eluent (H₂O + formic acid (0.15%) / MeOH + formic acid (0.15%)) (95/5). LC/ESI-MS data were recorded in the positive ion mode. Nitrogen was used as a drying and nebulizing gas at flow rates of 450 and 100 L/h, respectively. The capillary voltage was 3.5 kV and a cone voltage of 35 V was used. Scanning was performed in the range 50-1000 Da at a scan rate of 1 s/scan. The acquisition and data processing were performed with the software MassLynx 4.1.

C. Compounds characterization

1) Mass Spectrometry

a) Sample preparation

The compound were dissolved in MeOH, acetonitrile or water or a mixture at a concentration of 0.01 mg/mL directly introduced (5 mL/min for the Q-TOF and 20 mL/min for the ZQ) through an integrated syringe pump into the ESI source.

b) Equipment

Stepwise control of the reactions has been readily achieved using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) using a ZQ 4000 quadrupole mass spectrometer (Waters-Micromass, Manchester, U.K.), provided with a pneumatically assisted electrospray (Z-spray) ion source. Source and desolvation temperatures are 80°C and 150°C respectively. Azote has been used as desolvation and nebulization gas with an output of 350 and 50 L/h respectively. The capillary voltage is around 3.5 kV and the cone voltage varies from 20 to 150 V depending on analyzed products. Spectra are cumulated at 2s/scan rate. High-resolution electrospray mass spectra (ESI-HRMS) were obtained on a Q-TOF *Ultima Global* hybrid quadrupole/time-of-flight instrument (Waters-Micromass, Manchester, U.K.), provided with a pneumatically assisted electrospray (Z-spray) ion source and an additional sprayer (Lock Spray) for the reference compound. Source and desolvation temperatures were 80°C and 120°C respectively. Nitrogen has been used as desolvation and nebulization gas with an output of 350 and 50 L/h respectively. The capillary voltage is around 3.5 kV and the cone voltage varies from 50 to 250 V depending on analyzed compounds.

Before each high-resolution electrospray mass spectra (ESI-HRMS), a calibration is done with orthophosphoric acid. Spectra are cumulated at 2 s/scan rate for a mass range from 50 to 4000 Da for a 10,000 resolution.

Data acquisition and processing were performed with MassLynx 4.1 software.

2) Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Structure elucidation of compounds has been readily achieved using standard ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC and ^{31}P in some cases. NMR experiments performed at 600.13 MHz AVANCE III IPSO600 (Brüker), 400.13 MHz and 300.13 MHz AVANCE DPX300 (Brüker), spectrometers respectively. Chemical shift (δ) was expressed in ppm. Measurements were performed at 298 K. Spectra treatment performed thanks to the software: MestRenova 6.0.2 (de MestRelab). Samples were dissolved in deuterated solvent (CDCl_3 , DMSO-d_6 , D_2O , Pyrid_5). We used a solvent calibration for the ^{31}P experiments adding orthophosphoric acid (H_3PO_4) and we used, for the remaining experiments, the solvent for the calibration.

D. Buffer solutions

1) TRIS buffer pH 7.4

Preparation for 1L of TRIS buffer at concentration of TRIS (100 mM) and NaCl (25 mM) (10 X):

+ 12.1 g TRIS

+ 87 g NaCl

Then, the pH is adjusted at 7.4 using NaOH or HCl solution controlled by pHmeter. Before use, a dilution per 10 is require.

2) Phosphate buffer pH 7.4

Preparation for 1 L of phosphate buffer at concentration of PBS (100 mM) and NaCl (1500 mM) (10 X):

+ 87.66 g NaCl

+ 21.76 g HPO_4^{2-}

+ 6.12 g H_2PO_4^-

Then, the pH is adjusted at 7.4 using NaOH or HCl solution controlled by pHmeter. Before use, a dilution per 10 is require.

3) Ringer-Hepes buffer pH 7.4

Preparation for 1 L of Ringer-Hepes (1 X):

+ 8.8 g NaCl

+ 387 mg KCl

+ 244 mg CaCl_2

+ 40.6 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

+ 504 mg NaHCO_3

+ 1.19 g HEPES

+ 504 mg Glucose

Then, the pH is adjusted at 7.4 using NaOH or HCl solution controlled by pHmeter.

E. Nanoparticles preparation and characterization

1) Preparation

The nanoparticle preparation used is the lipidic film rehydration. Our compounds solubilized in ethanol and the POPC solubilized in hexane/ethanol (9:1 v/v) were mixed, with or without ATV. Then, the organic solvent was evaporated by nitrogen flow and the dry film was placed in desiccator for 2h to remove any trace of organic solvent. Then, the dry film is rehydrated by an appropriate buffer like RH, TRIS or PBS to reach a final concentration of 400 μ M. The dry film was resuspended by vigorous homogenization to produce MLVs. Then the solution is sonicated for 3 cycles at 2 min 30s (power: 33% of 500 W, probe diameter: 13 mm, Bioblock Scientific VibraCell™ 75115) followed by a filtration on 0.2 μ m filters (Tuffryn® by Acrodisc®) to eliminate titanium particles from the probe. The excess of ATV which was not encapsulated in the nanoparticles is eliminated by Size Exclusion Chromatography (SEC, Sephadex G50, length: 5 cm, diameter: 1.5 cm). The loaded nanoparticles are collected in the tubes 3 and 4, generally. Here the table that show the CD and POPC volumes used for dry film preparation for each molar ratio with an initial concentration of CD and POPC solution at 5 mM. (Tableau 18)

Tableau 18 : CD and POPC volumes used for each molar ratio

Molar ratio CD/POPC	V _{CD} (μ L)	V _{POPC} (μ L)
10%	16	144
20%	32	128
30%	48	112
40%	64	96
50%	80	80

2) Characterization

a) Dynamic Light Scattering (DLS)

The mean diameter and the size distribution of our nanoparticles were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, United Kingdom) with a monochromatic laser at a wavelength of 633 nm. The experimental temperature was 21°C for each measurement.

b) Transmission Electron Microscopy (TEM)

The nanoparticles were observed by Transmission Electron Microscopy (TEM) or STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) after negative staining of the preparations with uranyl acetate, performed as follows. Droplets of the 500 μM suspensions of C12 or C14 NPs were deposited onto carbon-coated microscopy grids. The complete drying was obtained after 30 min and the samples were then stored for one night protected from light. TEM and STEM images were acquired by Jeol JEM 1200EX microscope operating at 120 kV.

F. Surface tension measurement

1) CAC determination (Critical Aggregation Concentration)

In a Teflon well, PBS buffer is added (62 mL) and the tested compound is added under the subphase at different concentration ranging from 10 nM to 1 μM while the surface pressure is measured by the Wilhelmy plate. The evolution of the surface pressure is followed during 1 h. The $\Delta\pi$ is calculated and the $\Delta\pi$ versus the $\log(C)$ is plotted. CAC concentration is determined by the intersection between the downward line with the plateau.

2) Determination of the effective concentration for the Maximum Insertion Pressure (MIP) study

In a Teflon well, PBS buffer is added (62 mL) and the tested compound is added under the subphase at different concentration from 10 nM to 1 μM while the surface pressure is measured by the Wilhelmy plate. The evolution of the surface pressure is followed during 1 h. The $\Delta\pi$ is calculated and the $\Delta\pi$ versus the concentration is plotted. The effective concentration is the concentration for which no surface pressure is observed. So, it's the last concentration of the down plateau. In our case, for each compound, the effective concentration is determined at 100 nM total in the subphase for all the tested compounds.

3) The MIP determination

In a Teflon well, PBS buffer or RH buffer is added (62 mL) and phospholipids solubilized in hexane/ethanol mixture (9/1 (v/v)) is filed on the air-water interface to reach the desired surface pressure (π_0). Then, after evaporation of the organic solvent and stabilization of the surface pressure, the tested compound is injected in the subphase. So, our compounds are injected at 100 nM and the vesicles are injected at 5 μM and the surface pressure is measured by the Wilhelmy plate. The evolution of the surface pressure is followed during 1 h after the

injection. The π versus the time (s) is plotted and the $\Delta\pi$ are calculated from these curves for each π_0 ($\Delta\pi = \pi_e - \pi_0$) and the $\Delta\pi$ versus the concentration is plotted to determine the PIM and the $\Delta\pi_{30}$. The PIM value is determined by the intersection between the regression curve and the horizontal axis. The $\Delta\pi_{30}$ value is the report of the value 30 mN/m on the vertical axis compared the trend curve. These two values are given in mN/m.

G. Isotherms of compression coupled with the BAM

1) Brewster Angle Microscopy (BAM)

Monolayers were investigated using a commercial BAM (NFT iElli-2000, Göttingen, Germany) mounted on a Nima Langmuir trough. Surface pressure was measured using a Wilhelmy-type measuring system. The microscope was equipped with a frequency doubled Nd:Yag laser (532 nm, ca. 50 mW primary output), a polariser, an analyser and a CDD camera. The spatial resolution of the BAM was about 2 μm and the image size was 430 x 320 μm . Before each set of experiments, total area of the trough and the Wilhelmy balance were calibrated.

2) Amphiphilic CDs alone

The amphiphilic CDs solubilized in Hexane/Ethanol (9/1 v/v) at 0.1 mM, are filed at the air-water interface without modification of the surface pressure (0 mN/m). Then, after evaporation of the organic solvent and stabilization of the surface pressure, the barriers were moved at a rate of 20 cm^2/min and the surface pressure versus the molecular area is plotted at the same time.

3) Amphiphilic CDs with POPC at different molar ratio

The same experiments, that above, were performed with the amphiphilic CDs mixed with POPC at different molar ratio from 10 to 50 % in Hexane/Ethanol (9:1 v/v).

H. Fusogenicity study

1) CD/POPC vesicle preparation

The mixed vesicle were prepared that explain before (see E.1).

2) Probe fluorescent (R18) vesicle preparation

40 μL POPC solubilized in hexane/ethanol (9/1 v/v) mixture (5 mM) was put in a pillbox. The R18 probe is introduced at 6.3 mass% compared the mass of lipid, so 9.58 μL (1 mg/mL in ethanol) was added to the POPC in the pillbox. Then, the same procedure is applied as for the formation of the NPs (see E.1).

3) Fluorescence measurements

The fluorescence measurements was performed with a Cary Eclipse fluorescence spectrometer using a quartz cell. The final concentration, in the cell, is fixed at 50 μM with a 1:4 molar ratio between the vesicles of CD/POPC and R18/POPC. So, a volume of 100 μL of each vesicle is added. Kinetics measurements were performed during 31 min. First, 800 μL of TRIS buffer with 100 μL of R18/POPC was mixed and the measurement was performed during 1 min to obtain the value of “zero fusion”. Then, the CD/POPC is added and the measurement is performed. The maximum of fluorescence is determined as described in the “Résultats et discussion part”, II, C,1.

I. Lipidic order study

This technique requires utilization of both molecules, Laurdan and Prodan. So, both stock solution was prepared for the both compounds at 5 mM and 10 mM in ethanol, respectively. A dilution is required for their utilization at 1 mM.

1) Vesicles preparation with the Laurdan and Prodan

Preparation of vesicles is the same that the CD/POPC except that the Laurdan is added when the CD and POPC are added in the pillbox. 1 μL of Laurdan solution at 1 mM is added for 110 μM of lipid, so, as a 40% CD/POPC molar ratio, we have 240 μM of POPC for a total concentration of 400 μM . So, 2.18 μL from the Laurdan solution at 1 mM is added. Unlike Laurdan, the Prodan is added after the sonication by adding 3 μL of a solution at 1 mM, so in our case, 6.54 μL is added. Vesicles of POPC were prepared too by adding 3.64 μL of Laurdan solution (1 mM) and 10.92 Prodan solution (1 mM) in the same conditions that for the NPs (see E.1).

2) Fluorescence measurements

Before the fluorescence measurement, the vesicles solutions containing the Laurdan and the Prodan are incubated at either temperatures, 21°C or 37°C, during 30 min. This study requires the use of the “Advanced reads fluo” software available with the Cary Elipse fluorescence spectrometry. Indeed, these measurements require both emission wavelengths listed in this table for the both fluorescents probes. (Tableau 19)

Tableau 19 : Excitation and emission wavelengths of the Laurdan and Prodan

	Wavelength	Excitation (nm)	Emission (nm)
Laurdan	1	360	435
	2	360	490
Prodan	1	360	440
	2	360	480

J. Characterization of the insertion of amphiphilic CDs in a bilayer by AFM

1) Vesicle preparation

For the static measurements, the amphiphilic CDs (β -C12 or β -C14) were dissolved in ethanol and mixed with chloroformic solutions of DPPC or POPC/DPPC (1:1 mol/mol) at two CD/lipids molar ratios: 5 or 10 %. The CD/lipids mixtures were then evaporated under nitrogen and dried in a dessicator under vacuum for 2 h. Multilamellar vesicles (MLV) were obtained by resuspending the lipidic dried film at room temperature in calcium containing buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, pH 7.4) at a final concentration of 0.3 mM. To obtain small unilamellar vesicles (SUV), the suspensions were sonicated to clarity (3 cycles of 2min 30s) using a 500 W probe sonicator (Fisher Bioblock Scientific, France; 35% of the maximal power; 13 mm probe diameter) while being kept in an ice bath. The liposomal suspension was then filtered on 0.2 μ m Acrodisc® (Pall Life Sciences, USA) to eliminate titanium particles. The supported bilayers were prepared using the vesicle fusion method. Freshly cleaved mica squares (16 mm²) were glued onto steel sample discs (Agar Scientific, England) using Epotek 377 (Polytec, France). Then, 150 μ L of the SUV suspension were deposited onto the mica squares and the SUVs were allowed to adsorb and fuse on the solid surface overnight at 4°C as previously described. Subsequently, samples were rinsed with 3

mL of Tris buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4; Tris buffer), incubated for 1 h at 60°C and slowly cooled to room temperature.

For the dynamic measurements, PC:SM:Chol SUVs at a concentration of XX mM and CD nanoparticles are prepared as described previously (see J.1 and E. 1, respectively). Then, 150 μ L of the SUV suspension were then deposited onto the mica samples and the SUVs were allowed to adsorb and fuse on the solid surface for 1 h at 60°C. Subsequently, samples were rinsed with 3 mL of Tris buffer and slowly cooled to room temperature.

2) AFM Measurements

Supported bilayers were investigated using a commercial AFM (NanoScope III MultiMode AFM, Veeco Metrology LLC, Santa Barbara, CA) equipped with a 125 μ m x 125 μ m x 5 μ m scanner (J-scanner). A quartz fluid cell was used without the O-ring. Topographic images were recorded in contact mode using oxide-sharpened microfabricated Si₃N₄ cantilevers (Microlevers, Veeco Metrology LLC, Santa Barbara, CA) with a spring constant of 0.01 N/m (manufacturer specified), with a minimal applied force (<500 pN) and at a scan rate of 5–6 Hz. The curvature radius of silicon nitride tips was ~20 nm. Images were obtained at room temperature (21–24°C) in Tris buffer. All images shown in this paper are flattened raw data.

K. Calibration curve of Atazanavir fluorescence intensity in Ringer-Hepes

This calibration curve was performed with a fluorescence spectrometer. A stock solution of ATV in DMSO (10 mM) is prepared. This compound is not soluble directly in the RH buffer, so, first, 5 μ L of the ATV stock solution was putted in a small pillbox and then the RH was added (2 mL) to reach the concentration of 25 μ M. An optimization of the measurement is performed to have the better S/B ratio in the RH. It is found that the better emission and excitation wavelengths are $\lambda_{ex} = 290$ nm and $\lambda_{em} = 338$ nm. (Figure 103)

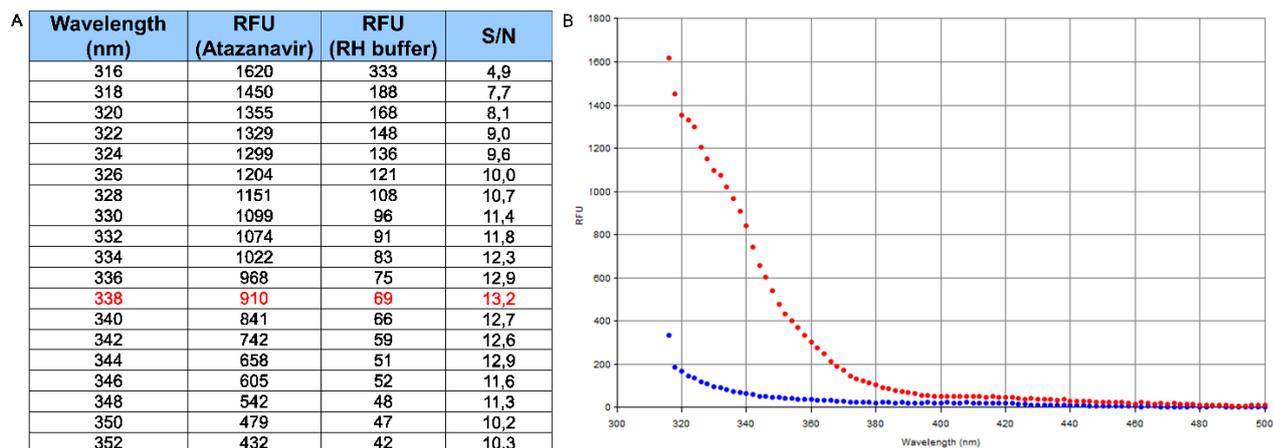


Figure 103 : Optimisation of the Signal/Noise ratio for the detection of the ATV in RH with $\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$. (A) Table with the values of S/B ratio. (B) Curves of ATV detection (red) and RH buffer detection (blue)

Then, from the mother solution (25 μM) a cascade dilution by 2 is performed and the fluorescence measures are performed. Here is the detection limit and the calibration curve obtained. (Figure 104)

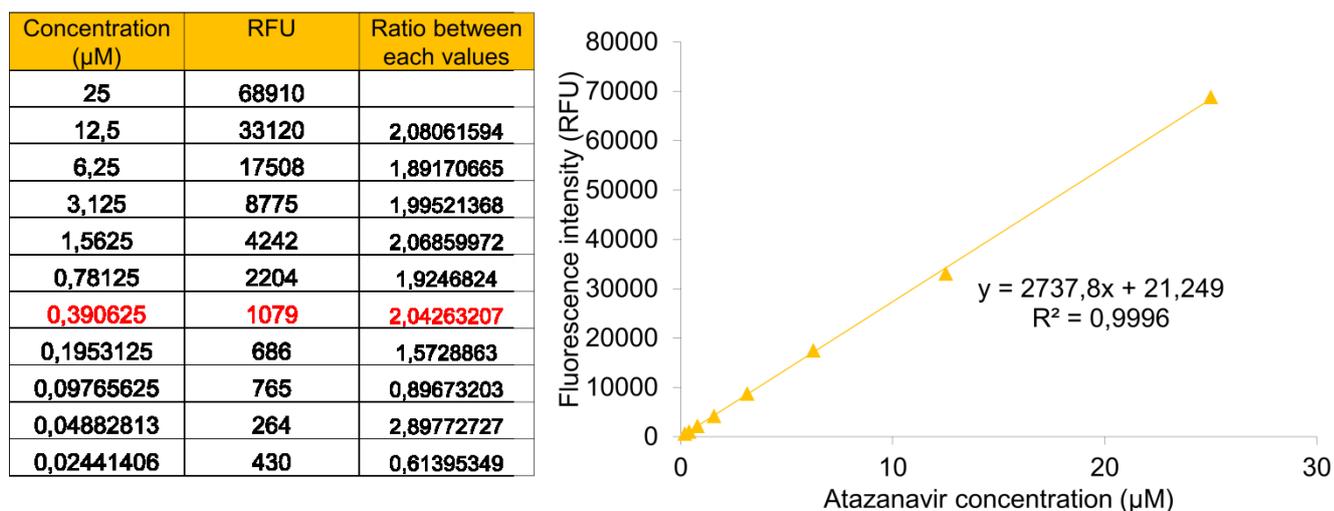


Figure 104 : Determination of the limit detection (A) and plotted of the calibration curve (B)

The fluorescence is directly proportional to the concentration, so when the dilution by 2 is performed then the concentration was divided by 2. When this ratio was not obtained between two values then the detection limit was reached. In this case, we determined the detection limit at 0.4 μM .

L. *In vitro* drug release

100µl of C12/POPC, C14/POPC mixed vesicle and POPC vesicle charged with ATV in Ringer HEPES buffer, prepared following the procedure described above, were dialyzed using Single-Use Rapid Equilibrium Dialysis (Thermo Scientific™). NPs were placed in vertical cylinder of dialysis membrane with a molecular-weight cutoff of 8KDa. 300µL of RH buffer were placed in buffer chamber. The plate with dialysis membranes was placed at 37°C under vigorous shaking. ATV was quantified in both drug and buffer chambers by fluorescence spectroscopy.

M. Blood brain barrier *in vitro* model experiments

1) General procedure

In vitro bovine model (BBCECs) were co-cultivated during 12 days with rat glial cell in Transwell™ Costar polycarbonate inserts, 3µm pore size, coated with rat tail collagen.

The experiment procedure to perform the integrity and transport studies is as follows:

- ✚ Preheat Ringer HEPES in a 37°C water bath.
- ✚ Put 2.5 ml of Ringer HEPES in each well of 6-well plates. The number of wells you need is: Numbers of filters to test x Number of time points
- ✚ Prepare the solution of Ringer HEPES containing the tested compound at the desired concentration. You need 1.5 ml of solution per filter. If the solubilization of the compound requires the use of solvent (DMSO, Ethanol, Methanol) like for the ATV toxicity study, take care that its concentration is always below 0.25 % (v/v) in the tested solution.
- ✚ At time zero, filters are transferred in a 6-well plate containing Ringer HEPES. Then solution containing the tested compound is put in the luminal side of the filter (1.5 mL).
- ✚ At time $t = 30$ min, filter is transferred in another well containing fresh Ringer HEPES. And then at time $t = 60$ min.

All incubations are performed on a rocking platform at 37°C.

2) Determination of the toxicity of the compound on the BBB *in vitro* model

Toxicity study of tested compounds was performed using radiolabelled sucrose (¹⁴C sucrose) which is a paracellular marker to control the toxicity of products. This small hydrophilic

molecule presents, in physiological conditions, a low cerebral penetration and its endothelial permeability coefficient reveals the endothelial cell monolayer integrity.

The co-incubation of ^{14}C sucrose ($50\mu\text{M}$) with the tested compound is performed in triplicates. Co-incubation of ^{14}C sucrose and the tested compound allows to assess drug toxicity by evaluating the permeability coefficient for ^{14}C sucrose (final concentration 1.82KBq/ml).

3) Estimation of the Blood-brain barrier permeability

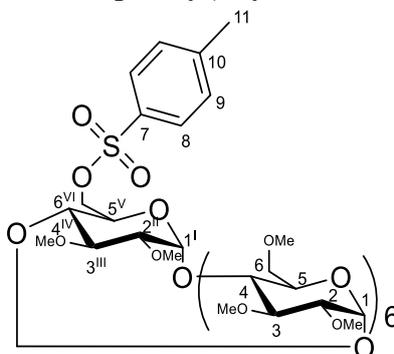
Drug transport of free $^3\text{H-ATV}$, $^3\text{H-ATV}$ in C12/POPC, $^3\text{H-ATV}$ in C14/POPC and $^3\text{H-ATV}$ in POPC were evaluated in Ringer HEPES buffer (RH). Cells were washed one time during 20 min. RH was removed and replaced with test drug in the luminal compartment. After 30, 60 and 120 min, aliquots were taken in abluminal compartments of the cell culture, transferred to polyethylene scintillation vials with addition of scintillation cocktail (Ultima Gold MW). The amounts of $^3\text{H-ATV}$ were determined using Liquid Scintillation Analyser (Tri-carb 2100TR).

4) Uptake of $^3\text{H-Atazanavir}$

After 120 minutes of drug transport experiment, inserts \pm BBCECs were washed 5 times with cold RH. Cells were lysed with $500\mu\text{L}$ of the triton X100 solution. Cell lysates and Filters were transferred to polyethylene scintillation vials with addition of scintillation cocktail (Ultima Gold MW). The amounts of $^3\text{H-ATV}$ were determined using Liquid Scintillation Analyser (Tri-carb 2100TR).

II. Compounds description

6^{VI}-(*O*-*p*-toluenesulfonyl)-cyclomaltoheptaose (1)



β -CD (10 g, 8.8 mmol, 1 eq) was suspended in distilled water (450 mL). Then, an aqueous solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.6 g, 26.4 mmol, 500 mL, 3 eq) was added. A pH solution at 11-12 is obtained by addition of a sodium hydroxide solution (110 mL; 2 M); the β -CD became soluble. The reaction mixture was stirred for 10 min. A *p*-toluenesulfonyl chloride solution (13.2 g, 70 mmol, 8 eq, dissolved in 88 mL of acetonitrile) was added drop by drop for 15 min. The reaction mixture has been stirred at room temperature for 4h. After that, the solution was acidified with chlorhydric acid solution (44 mL, 1 M). The blue copper precipitate was filtered on celite and the filtrate was placed in the fridge at 4°C during 2-3 days. The resulting precipitate was filtered and washed with acetone and dried for 24h in oven at 60°C to obtain 36 % of the expected compound.

Chemical Formula: $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{37}\text{S}$, Molecular Weight: $1288.38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

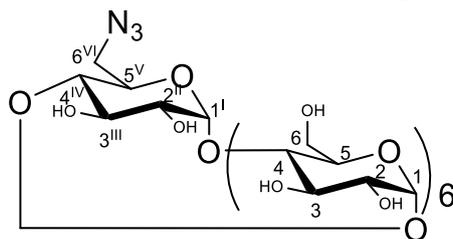
ZQ (ESI): m/z 1311.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

^1H NMR (300MHz, DMSO) δ (ppm):

7.76 (d, 2H, H_8 , $J_{8-9} = 8.21 \text{ Hz}$), 7.44 (d, 2H, H_9 , $J_{8-9} = 8.21 \text{ Hz}$), 5.69 (m, 14H, $\text{O}_{(2)}\text{H}$, $\text{O}_{(3)}\text{H}$), 4.84 (m, 7H, H_1 , H^I), 4.52-4.20 (m, 8H, H^{VI} , $\text{O}_{(6)}\text{H}$), 3.64-3.47 (m, 40H, H_2 , H^{II} , H_3 , H^{III} , H_4 , H^{IV} , H_5 , H^V , H_6), 2.43 (s, 3H, H_{11}).

^{13}C NMR (75MHz, DMSO) δ (ppm):

144.9 (1C, C_{arom}), 132.72 (1C, C_{arom}), 130.0 (2C, CH_{arom}), 127.6 (2C, CH_{arom}), 102.0 (7C, C₁, C^I), 81.6 (7C, C₄, C^{IV}), 73.1- 72.1 (21C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₅, C^V), 60.0 (7C, C₆, C^{VI}), 21.3 (1C, C₁₁).

6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltoheptaose (2)


6^{VI}-(*O-p*-toluenesulphonyl)-cyclomaltoheptaose (3.43 g, 2.66 mmol, 1 eq) was suspended in distilled water (120 mL). The sodium azide (1.90 g, 29.26 mmol, 11 eq) was added. The reaction mixture has been stirred at 80°C one night and at room temperature for 1h. The expected product was recovered by precipitation in acetone (400 mL). The obtained solid was filtered, washed with acetone and ether and then dried in the air oven to get the product with 83% yield.

Chemical Formula: C₄₂H₆₉N₃O₃₄, Molecular Weight: 1159.38 g.mol⁻¹

HRMS (ESI): m/z 1182.1 ([M+Na]⁺)

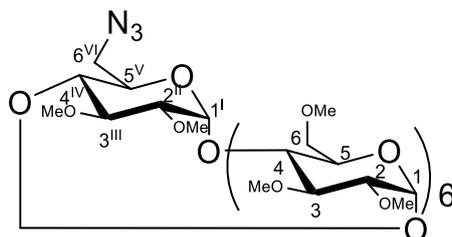
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm):

5.92-5.48 (m, 14H, O₍₂₎H, O₍₃₎H) ; 4.96-4.70 (m, 7H, H₁, H^I) ; 4.62-4.36 (m, 6H, O₍₆₎H), 3.85-3.15 (m, 42H, H₂, H^{II}, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ (ppm):

102.6-102.3 (7C, C₁, C^I) ; 82.1-81.8 (7C, C₄, C^{IV}) ; 73.6-72.4 (21C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₅, C^V) ; 60.5-60.2 (6C, C₆) ; 51.6 (1C, C^{VI}).

6^{VI}-mono-azido-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl) cyclomaltoheptaose (3)



6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltoheptaose (6.08 g, 5.25 mmol, 1 eq) was dissolved in distilled *N,N*-dimethylformamide (200 mL) under argon. The solution was cooled down at 0°C in ice bath and sodium hydride (60%, m/m) (12.58 g, 31.5 mmol, 60 eq) was added. After solubilization, methyl iodide (60 mL, 97.1 mmol, 185 eq) was added. The reaction mixture has been stirred at room temperature and under inert atmosphere for 1 day. The reaction mixture is then filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The obtained solid was put in a minimum of water and extracted with dichloromethane (4x50mL).

The organic phase was washed with water (30 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. A yellow oil was obtained which is a mixture of the expected compound and the per(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose, formed from the β-CD regenerated during the synthesis of 6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltoheptaose. The residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0, 90/10) with 59%.

Chemical Formula: C₆₂H₁₀₉N₃O₃₄, Molecular Weight: 1439 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.48 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 1462.9 ([M+Na]⁺)

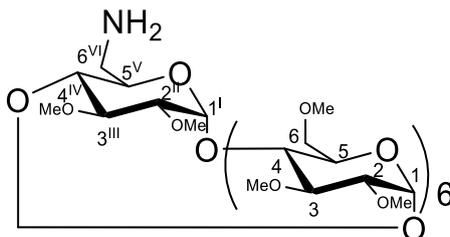
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), □□(ppm):

5.13 (m, 7H, H₁, H^I), 3.96-3.38 (m, 35H, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.19 (m, 7H, H₂, H^{II}), 3.63 (s, 18H, O₍₆₎CH₃), 3.50 (s, 21H, O₍₃₎CH₃), 3.38 (s, 21H, O₍₂₎CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), □□(ppm):

99.03 (7C, C₁, C^I), 81.90 (14C, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 80.43 (7C, C₂, C^{II}), 71.54 (6C, C₆), 71.06 (7C, C₅, C^V), 61.67(6C, O₍₆₎CH₃), 59.11 (14C, O₍₂₎CH₃, O₍₃₎CH₃), 52.21 (1C, C^{VI}).

6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (4)



6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (6.97 g, 4.85 mmol, 1 eq) and triphenylphosphine (5.08 g, 19.38 mmol, 4 eq) were dissolved in distilled *N,N*-dimethylformamide (200 mL). After 2h of stirring at room temperature, the mixture was cooled down at 0°C in ice bath and an ammonia solution (33%, v/v) (132 mL) was slowly added. The reaction mixture has been stirred at room temperature for 1 night. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 9/1) with 26%. The compound was then lyophilized.

Chemical Formula: C₆₂H₁₁₁NO₃₄, Molecular Weight: 1413 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 1436.8 ([M+Na]⁺)

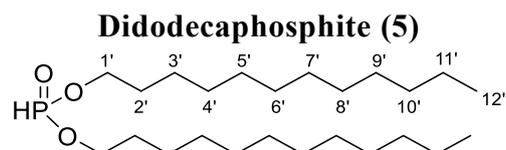
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.13 (m, 7H, H₁, H^I), 3.94-3.16 (m, 42H, H₂, H^{II}, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.62 (s, 18H, O₍₆₎CH₃); 3.49 (s, 21H, O₍₃₎CH₃); 3.37 (s, 21H, O₍₂₎CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

Experimental Part

99.12 (7C, C₁, C^I) ; 82.08-81.7 (14C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}) ; 80.4 (7C, C₄, C^{IV}) ; 71.56 (6C, C₆) ; 70.90 (7C, C₅, C^V) ; 61.53 (6C, O₍₆₎CH₃) ; 58.97 (7C, O₍₃₎CH₃) ; 58.61 (7C, O₍₂₎CH₃) ; 41.75 (1C, C^{VI}).



Diphenyl phosphite (200 mg, 0.85 mmol, 1 eq) and dodecanol (317 mg, 1.7 mmol, 2eq) were added in the glass oven. After 2h of stirring at 120°C under 1mbar pressure, the compound was obtained with 95% without further purification.

Chemical Formula: C₂₄H₅₁O₃P, Molecular Weight: 418,36 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.74 (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 441.3 [M+Na]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

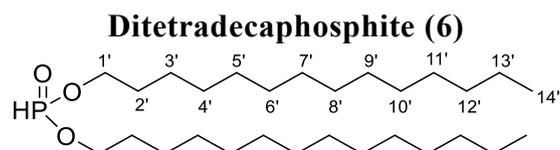
6.80 (d, 1H, HP, J_{H-P}=697.97 Hz), 4.07 (m, 4H, H_{1'}), 1.70 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 36H, H_{3'}-H_{11'}), 0.87 (t, 6H, H_{12'}, J_{H_{12'}-H_{11'}}=13.4Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

66.04 (2C₁, C_{1'}), 32.05-22.82 (18C, C_{3'}-C_{11'}), 30.60 (2C, C_{2'}), 14.23 (2C, C_{12'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.51(d, PH, J_{P-H} = 697.97 Hz)



Diphenyl phosphite (472 mg, 2 mmol, 1 eq) and tetradecanol (858 mg, 4 mmol, 2 eq) were added in the glass oven. After 2h of stirring at 120°C under pressure 1mbar, the compound was obtained with 89% without purification.

Chemical Formula: C₂₈H₅₉O₃P, Molecular Weight: 474,42 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.67 (CY/AcOet 9:1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 497,3 [M+Na]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.80 (d, 1H, HP, J_{H-P} = 693.16 Hz), 4.06 (m, 4H, H_{1'}), 1.68 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 44H, H_{3'-13'}), 0.87 (t, 6H, H_{14'}, J_{H_{14'}-H_{13'}} = 13.64 Hz)

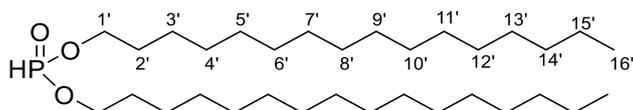
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

65.74 (2C, C_{1'}), 29.93 (2C, C_{2'}), 31.83-22.70 (22C, C_{3'-13'}), 14.12 (2C, C_{14'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

8.25 (d, PH, J_{P-H} = 693.16 Hz)

Dihexadecaphosphite (7)



Diphenyl phosphite (481 mg, 2.05 mmol, 1 eq) and hexadecanol (982 mg, 4.05 mmol, 2 eq) were added in the glass oven. After 2h of stirring at 120°C under pressure 1mbar, the compound was obtained with 99% without purification.

Chemical Formula: C₃₂H₆₇O₃P, Molecular Weight: 530,48 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.5 (CY/AcOet 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 553,4727 [M+Na]⁺ (C₃₂H₆₇O₃PNa requires 553,4726)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

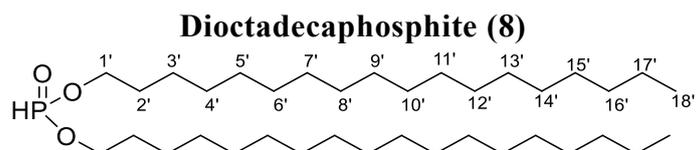
6.8 (d, 1H, HP, J_{H-P} = 692.17 Hz), 4.06 (m, 4H, H_{1'}), 1.68 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 52H, H_{3'-15'}), 0.87 (t, 6H, H_{16'}, J_{H_{16'}-H_{15'}} = 6.57 Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

65.93 (2C, C_{1'}), 32.07-22.94 (26C, C_{3'-15'}), 14.27 (2C, C_{16'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

8.34 (d, PH, J_{P-H} = 692.17 Hz)



Diphenyl phosphite (0.7 g, 2.99 mmol, 1 eq) and octadecanol (1.62 g, 5.98 mmol, 2 eq) were added in the glass oven. After 2h of stirring at 120°C under pressure 1mbar, the compound was obtained with 86% without purification.

Chemical Formula: C₃₆H₇₅O₃P, Molecular Weight: 586,55 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.74 (CY/AcOet 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 609.5352 [M+Na]⁺ (requires 609.5343)

¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.80 (d, 1H, HP, J_{H-P} = 692.52 Hz), 4.06 (m, 4H, H_{1'}), 1.68 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 64H, H_{3'}-H_{17'}), 0.87 (t, 6H, H_{18'}, J_{H_{18'}-H_{17'}} = 6.48 Hz)

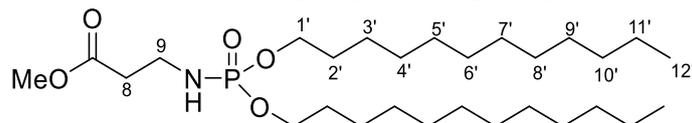
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

65.96 (2C₁, C_{1'}), 32.95-22.85 (18C, C_{3'}-C_{17'}), 14.28 (2C, C_{18'}).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

8.09 (d, PH, J_{P-H} = 692.52 Hz)

O,O-didodecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (9)



Didodecaphosphite (258 mg, 0.62 mmol, 1 eq) and β -Alanine methyl ester hydrochloride (173 mg, 1.24 mmol, 2 eq) were dissolved in methylene chloride (4 mL) and methanol (4 mL). Then, N,N-diisopropylethylamine (322 μ L, 1.86 mmol, 3 eq) and bromotrichloromethane (92 μ L, 0.93 mmol, 1.5 eq) were added. The reaction mixture has been stirred at room temperature 1h30. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (9/1 to 1/1) with 95%.

Chemical Formula: $C_{28}H_{58}NO_5P$, Molecular Weight: 519,41 $g \cdot mol^{-1}$

TLC: $R_f = 0.42$ (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 520.4131 $[M+H]^+$, ($C_{28}H_{59}NO_5P$ requires 520.4131)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

3.96 (m, 4H, $H_{1'}$), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.17 (m, 2H, H_9), 2.52 (t, 2H, H_8 , $J_{H8-H9} = 5.96$ Hz), 1.65 (m, 4H, $H_{2'}$), 1.25 (m, 36H, $H_{3'-H_{11'}}$), 0.87 (t, 6H, $H_{12'}$, $J_{H_{12'}-H_{11'}} = 6.41$ Hz).

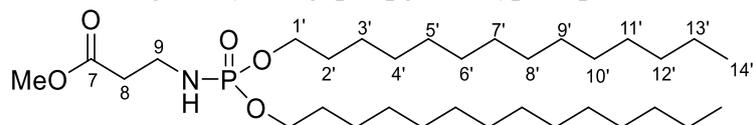
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172.80 (1C, C=O), 66.75 (2C, $C_{1'}$), 51.92 (1C, OMe), 37.11 (1C, C_9), 36.00 (1C, C_8), 32.06-22.83 (18C, $C_{3'-C_{11'}}$), 14.26 (2C, $C_{12'}$).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$), reference H_3PO_4 , δ (ppm):

9.13 (s, 1P)

O,O-ditetradecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (10)



Ditetradecaphosphite (1.26 g, 2.67 mmol, 1 eq) and β -Alanine methyl ester hydrochloride (556 mg, 3.98 mmol, 1.5 eq) were dissolved in methylene chloride (3 mL) and methanol (3 mL). After solubilization, the *N,N*-diisopropylethylamine (1.39 mL, 8.01 mmol, 3 eq) and bromotrichloromethan (400 μ L, 3.98 mmol, 1.5 eq) were added. The reaction mixture has been stirred at room temperature 2h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (9/1 to 1/1) with 88%.

Chemical Formula $C_{32}H_{66}NO_5P$, Molecular Weight: 575,47 $g \cdot mol^{-1}$

TLC: $R_f = 0.5$ (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 576,4746 $[M+H]^+$, ($C_{32}H_{67}NO_5P$ requires 576,4757)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

3.97 (tt, 4H, H_1'), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.17 (m, 2H, H_9), 3.07 (m, 1H, NH), 2.52 (t, 2H, H_8 , $J_{H_8-H_9} = 6.30$ Hz), 1.65 (m, 4H, H_2'), 1.25 (m, 44H, $H_{3'-13'}$), 0.87 (t, 6H, $H_{14'}$, $J_{H_{14'}-H_{13'}} = 6.43$ Hz)

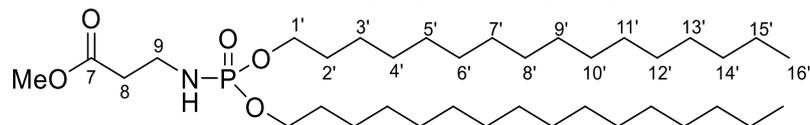
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172.75 (1C, C_7), 66.58 (2C, $C_{1'}$), 51.85 (1C, OMe), 37.17 (1C, C_9), 35.97 (1C, C_8), 32.01, 32.06, 32.04, 30.56, 30.47, 29.82, 29.79, 29.73, 29.68, 29.49, 29.35, 25.72, 22.82 (24C, $C_{2'-13'}$), 14.24 (2C, $C_{14'}$)

^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$), reference H_3PO_4 , δ (ppm):

9.23 (s, 1P)

O,O-ditetradecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (11)



Dihexadecaphosphite (1.06 g, 2.0 mmol, 1 eq) and β -Alanine methyl ester hydrochloride (419 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) were dissolved in methylene chloride (3 mL) and methanol (3 mL). After solubilization, the N,N-diisopropylethylamine (1.04 mL, 6.0 mmol, 3 eq) and bromotrichloromethan (300 μ L, 3.0 mmol, 1.5 eq) were added. The reaction mixture has been stirred 2h at room temperature. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (9/1 to 1/1) with 85%.

Chemical Formula $C_{36}H_{74}NO_5P$, Molecular Weight: 631,53 $g \cdot mol^{-1}$

TLC: $R_f = 0.4$ (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 632,5352 $[M+H]^+$, ($C_{36}H_{75}NO_5P$ 632,5383 requires)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

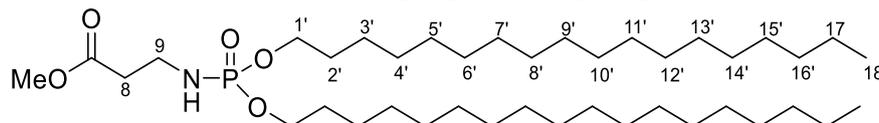
3,97 (m, 4H, $H_{1'}$), 3,68 (s, 3H, OMe), 3,17 (m, 3H, H_9 , NH), 2,52 (t, 2H, H_8 , $J_{H8-H9} = 5.95$ Hz), 1,65 (m, 4H, $H_{2'}$), 1,27 (m, 52H, $H_{3'-15'}$), 0,87 (t, 6H, $H_{16'}$, $J_{H16'-H15'} = 6.58$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172,74 (1C, C_7), 66,66 (2C, $C_{1'}$), 51,85 (1C, OMe), 37,16 (1C, C_9), 35,97 (1C, C_8), 32,06, 30,56, 30,46, 29,83, 29,80, 29,73, 29,68, 29,49, 29,35, 25,72, 22,82 (28C, $C_{2'-15'}$), 14,23 (2C, $C_{16'}$)

^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$), reference H_3PO_4 , δ (ppm):

9,11 (s, 1P)

O,O-dioctodecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (12)

Ditetradecaphosphite (1.54 g, 2.29 mmol, 1 eq) and β -Alanine methyl ester hydrochloride (479 mg, 3.43 mmol, 1.5 eq) were dissolved in methylene chloride (5 mL) and methanol (5 mL). After solubilization, the N,N-diisopropylethylamine (1.2 mL, 6.87 mmol, 3 eq) and bromotrichloromethane (300 μ L, 3.43 mmol, 1.5 eq) were added. The reaction mixture has been stirred 2h at room temperature. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (9/1 to 1/1) with 92%.

Chemical Formula: $C_{40}H_{78}NO_5P$, Molecular Weight: $683,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.30$ (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): $m/z [M+H]^+$, ($C_{40}H_{78}NO_5PNa$ requires)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

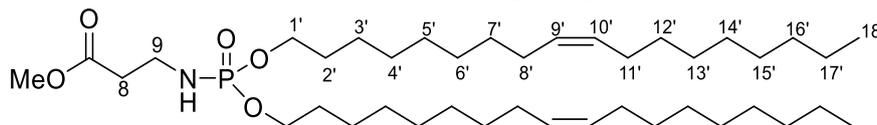
3.96 (m, 4H, $H_{1'}$), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.17 (m, 2H, H_9), 2.52 (t, 2H, H_8 , $J_{H8-H9} = 6.02 \text{ Hz}$), 1.65 (m, 4H, $H_{2'}$), 1.25 (m, 64H, $H_{3'-17'}$), 0.87 (t, 6H, $H_{18'}$, $J_{H18'-H17'} = 6.69 \text{ Hz}$)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

172.67 (1C, C=O), 66,55 (2C, $C_{1'}$), 51,78 (1C, OMe), 37.01 (1C, C_9), 35,88 (1C, C_8), 31.94-22.71 (32C, $C_{2'-17'}$), 14,14 (2C, $C_{18'}$)

^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$), reference H_3PO_4 , δ (ppm):

9.14 (s, 1P)

O,O-dioleoyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (13)

Dioleoyl phosphite (209.2 mg, 0.36 mmol, 1 eq) and β -Alanine methyl ester hydrochloride (100.5 mg, 0.72 mmol, 2 eq) were dissolved in methylene chloride (1mL) and methanol (1 mL). The mixture was cooled down at 0°C in ice bath, then N,N-diisopropylethylamine (200 μ L, 1.08 mmol, 3 eq) and bromotrichloromethan (53 μ L, 0.54 mmol, 1.5 eq) were added. The reaction mixture has been stirred 3h at room temperature. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (9/1 to 1/1) with 56%.

Chemical Formula: C₄₀H₇₈NO₅P, Molecular Weight: 683,56 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.39 (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 684.5677 [M+H]⁺, (C₄₀H₇₉NO₅P requires 684.5696)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.34 (m, 4H, H_{9'}, H_{10'}), 3.96 (m, 4H, H_{1'}), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.18 (m, 3H, H₉, NH), 2.52 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 11.81 Hz), 2.01 (m, 8H, H_{8'}, H_{11'}), 1.65 (m, 4H, H_{2'}), 1.26 (m, 44H, H_{3'-7'}, H_{12'-17'}), 0.87 (t, 6H, H_{18'}, J_{H18'-H17'} = 13.51 Hz)

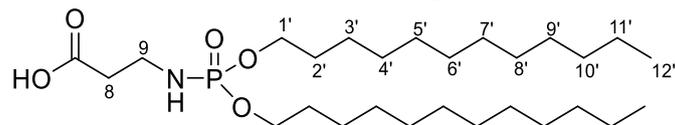
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

172.80 (1C, C=O), 130.00 (4C, C_{9'}, C_{10'}), 66.64 (2C, C_{1'}), 51.91 (1C, OMe), 37.14 (1C, C₉), 35.96kk (1C, C₈), 32.75-22.82 (28C, C_{2'-8'}, C_{11'-17'}), 14.26 (2C, C_{18'})

³¹P NMR (122 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

9.56 (1P)

O,O-didodecyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (14)



O,O-didodecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (301 mg, 0.58 mmol) was dissolved in solution of potassium hydroxide in EtOH (0.35 M). After 2h under stirring at 50°C, the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid (25 mL, 1 M). The desired product was extracted with dichloromethane (3x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent were removed by evaporation under reduced pressure to obtain 100 % of the expected compound.

Chemical Formula: C₂₇H₅₆NO₅P, Molecular Weight: 505,39 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.33 (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 528.3800[M+Na]⁺, (C₂₇H₅₆NO₅PNa requires 528.3794)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

3.98 (m, 4H, H_{1'}), 3.07 (m, 2H, H₉), 2.48 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 5.30 Hz), 1.66 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 36H, H_{3'-H11'}), 0.87 (t, 6H, H_{12'}, J_{H12'-H11'} = 13.21 Hz).

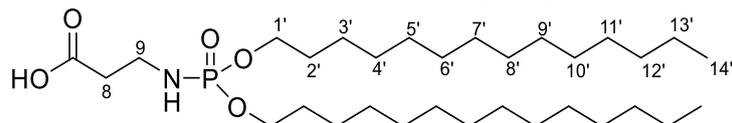
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

175.21 (1C, C=O), 66.39 (2C, C_{1'}), 35.99 (1C, C₉), 35.15 (1C, C₈), 31.75-22.52 (9C, C_{3'-C11'}), 13.95 (2C, C_{12'}).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

10.88 (1P)

O,O-ditetradecyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (15)



O,O-ditetradecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (391 mg, 0,68 mmol, 1 eq) was dissolved in solution of potassium hydroxide in EtOH (20 mL, 0.35M). After 2h under stirring at 50°C, the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid (50 mL, 1 M). The desired product was extracted with dichloromethane (3x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent were removed by evaporation under reduced pressure to obtain 100 % of the expected compound.

Chemical Formula: C₃₁H₆₄NO₅P, Molecular Weight: 561,45 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.66 (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 562,4627 [M+H]⁺, (C₃₁H₆₅NO₅P requires 562,4600)

¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.94 (m, 1H, NH), 3.98 (m, 4H, H_{1'}), 3.07 (m, 2H, H₉), 2.48 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 5.16 Hz), 1.67 (m, 4H, H_{2'}), 1,25 (m, 44H, H_{3'-13'}), 0,88 (t, 6H, H_{14'}, J_{H14'-H13'} = 6.45 Hz)

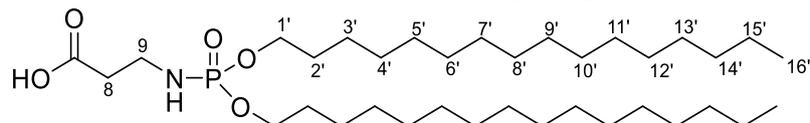
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

175.47 (1C, C=O), 66,75 (2C, C_{1'}), 36.29 (1C, C₉), 35.49 (1C, C₈), 32,08-22,85 (12C, C_{2'-13'}), 14,28 (2C, C_{14'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

10.94 (s, 1P)

O,O-dihexadecyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (16)



O,O-dihexadecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (330 mg, 0,523 mmol, 1 eq) was dissolved in solution of potassium hydroxide in EtOH (0.35 M). After 2h under stirring at 50°C, the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid (50 mL, 1 M). The desired product was extracted with dichloromethane (3x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent were removed by evaporation under reduced pressure to obtain 96 % of the expected compound.

Chemical Formula: C₃₅H₇₂NO₅P, Molecular Weight: 617,51 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.4 (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 618,5206 [M+H]⁺, (C₃₅H₇₃NO₅P requires 618,5226)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.95 (m, 1H, NH), 3.98 (m, 4H, H_{1'}), 3.07 (m, 2H, H₉), 2.48 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 5.35 Hz), 1.67 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 52H, H_{3'-15'}), 0.88 (t, 6H, H_{16'}, J_{H16'-H15'} = 6.54 Hz)

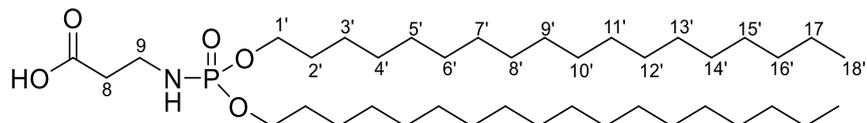
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

175.46 (1C, C=O), 66.70 (2C, C_{1'}), 36.29 (1C, C₉), 35.45 (1C, C₈), 32.08-22.85 (14C, C_{2'-15'}), 14.28 (2C, C_{16'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

10.24 (s, 1P)

O,O-dioctodecyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (17)



O,O-dioctodecyl-N-(méthylpropylester)phosphoramidate (941 mg, 1.38 mmol, 1eq) was dissolved in solution of potassium hydroxide in EtOH (0.4 M). After 2h under stirring at 50°C, the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid solution (25 mL, 1 M). The desired product was extracted with dichloromethane (3x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent were removed by evaporation under reduced pressure to obtain 96% of the expected compound.

Chemical Formula: C₃₉H₈₀NO₅P, Molecular Weight: 673,58 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.41 (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): 696.5685 m/z [M+H]⁺, (C₃₉H₈₀NO₅PNa requires 696.5672)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.98 (m, 1H, NH), 3.98 (m, 4H, H_{1'}), 3.07 (m, 2H, H₉), 2.48 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 5.25 Hz), 1.67 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 64H, H_{3'-17'}), 0.88 (t, 6H, H_{16'}, J_{H18'-H17'} = 6.63 Hz)

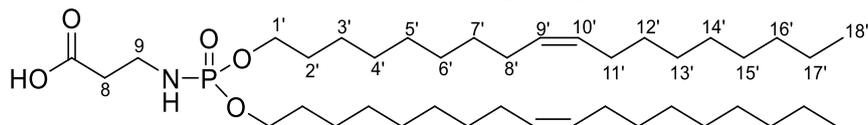
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

175.47 (1C, C=O), 66.76 (2C, C_{1'}), 36.29 (1C, C₉), 35.45 (1C, C₈), 32.08-22.85 (32C, C_{2'-17'}), 14.28 (2C, C_{18'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

10.74 (s, 1P)

O,O-dioleoyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (18)



O,O-dioleoyl-N-(2-carboxyéthyl)phosphoramidate (134 mg, 0.20 mmol) was dissolved in solution of potassium hydroxide in EtOH (10 mL, 0.35 M). After 2h under stirring at 50°C, the reaction mixture was acidified with hydrochloric acid (25 mL, 1 M). The desired product was extracted with dichloromethane (3x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent were removed by evaporation under reduced pressure to obtain 95 % of the expected compound.

Chemical Formula: C₃₉H₇₆NO₅P, Molecular Weight: 669,55 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.32 (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 692.5382 [M+Na]⁺ (C₃₉H₇₆NO₅PNa requires 692.5359)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.34 (m, 4H, H_{9'}, H_{10'}), 3.98 (m, 4H, H_{1'}), 3.07 (m, 2H, H₉), 2.47 (t, 2H, H₈, J_{H8-H9} = 5.10 Hz), 2.00 (m, 8H, H_{8'}, H_{11'}), 1.66 (m, 4H, H_{2'}), 1.26 (m, 44H, H_{3'-7'}, H_{12'-17'}), 0.87 (t, 6H, C_{18'}, J_{H18'-H17'} = 6.44 Hz)

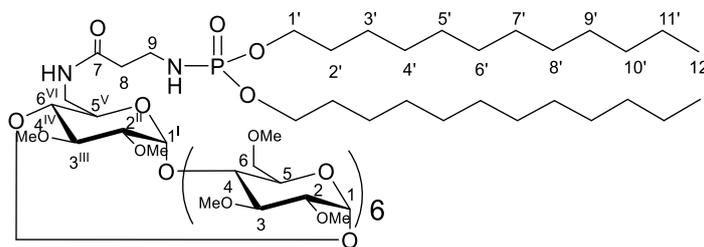
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

175.50 (1C, C=O), 130.09 (4C, C_{9'}, C_{10'}), 66.68 (2C, C_{1'}), 36.30 (1C, C₉), 35.51 (1C, C₈), 32.76-22.83 (28C, C_{2'-8'}, C_{11'-17'}), 14.26 (2C, C_{18'})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

10.90 (s, 1P)

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(dodecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (19)



O,O-didodecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (268 mg, 0.53 mmol, 1.5 eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (20 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (472 mg, 3.5 mmol, 10 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (545 μ L, 3.5 mmol, 10 eq) were added. After stirring for 2h, the 6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose solution (495 mg, 0.35 mmol, 1 eq dissolved in 20 mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5) with 71%.

Chemical Formula: C₈₉H₁₆₅N₂O₃₈P, Molecular Weight: 1901.08 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.51 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 1924.0657 [M+Na]⁺, (C₈₉H₁₆₅N₂O₃₈PNa requires 1924.0676)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.18 (m, 1H, NH), 5.13 (m, 7H, H₁, H^I), 3.94 (m, 4H, H_{1'}), 3.90-3.29 (m, 35H, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.62 (s, 18H, O₍₆₎CH₃), 3.50 (s, 21H, O₍₃₎CH₃), 3.37 (s, 21H, O₍₂₎CH₃), 3.19 (m, 9H, H₂, H^{II}, H₉), 2.37 (t, 2H, H₈), 1.62 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 36H, H_{3'-H_{11'}}), 0.87 (t, 6H, H_{12'}, J_{H_{12'}-H_{11'}} = 6.49 Hz)

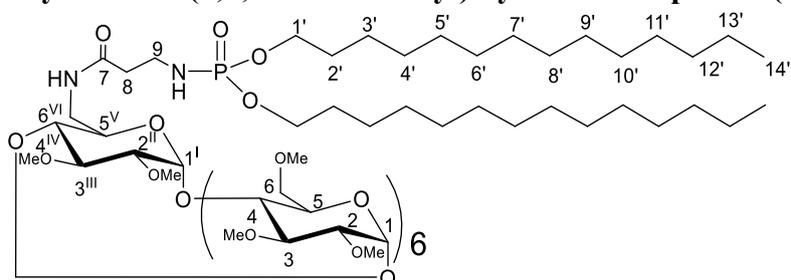
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

99.20 (7C, C₁, C^I), 82.20-80.79 (21C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 71.38, 71.19 (13C, C₆, C₅, C^V), 66.67 (2C, C_{1'}), 61.61 (6C, O₍₆₎CH₃), 59.16-58.76 (7C, O₍₃₎CH₃, O₍₂₎CH₃), 39.97 (1C, C^{VI}), 37.95 (2C, C₈, C₉), 32.05-22.82 (20C, C_{2'-C_{11'}}), 14.24 (2C, C_{12'})

^{31}P NMR (120 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

110.46 (s, 1P)

6^{VI} -amido- β -alanyl-(6^{VI} -di(tetradecyloxy)phosphoramidyl)- 6^{VI} -deoxy- $2^{\text{II}}, 3^{\text{III}}$ -di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (20)



O,O-ditetradecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (174 mg, 0.48 mmol, 2.3 eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (6.7 mL) and methylene chloride (25 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (430 mg, 3.182 mmol, 15 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (500 μL , 0.318 mmol, 15 eq) were added. After stirring for 3h, the 6^{VI} -amino- 6^{VI} -deoxy- $2^{\text{II}}, 3^{\text{III}}$ -di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose solution (300 mg, 0.212 mmol, 1 eq dissolved in 2.5 mL of methylene chloride with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0, 95/5 and 8/2) with 68%.

Chemical Formula: $\text{C}_{93}\text{H}_{173}\text{N}_2\text{O}_{38}\text{P}$, Molecular Weight: $1957.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.44$ (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 1980.1259 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ($\text{C}_{93}\text{H}_{173}\text{N}_2\text{O}_{38}\text{PNa}$ requires 1980.1302)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (ppm):

6.20 (s, 1H, NH), 5.16-5.07 (m, 7H, H_1 , H^{I}), 3.95 (t, 4H, H_1), 3.97-3.45 (m, 35H, H_3 , H^{III} , H_4 , H^{IV} , H_5 , H^{V} , H_6 , H^{VI}), 3.63 (s, 18H, $\text{O}_{(6)}\text{CH}_3$), 3.50 (s, 21H, $\text{O}_{(3)}\text{CH}_3$), 3.38 (s, 21H, $\text{O}_{(2)}\text{CH}_3$), 3.24 (m, 9H, H_2 , H^{II} , H_9), 2.35 (t, 2H, H_8), 1.62 (m, 4H, H_2), 1.24 (m, 44H, $\text{H}_{3'-13'}$), 0.86 (t, 6H, $\text{H}_{14'}$, $J_{\text{H}_{14'}-\text{H}_{13'}} = 6.35 \text{ Hz}$)

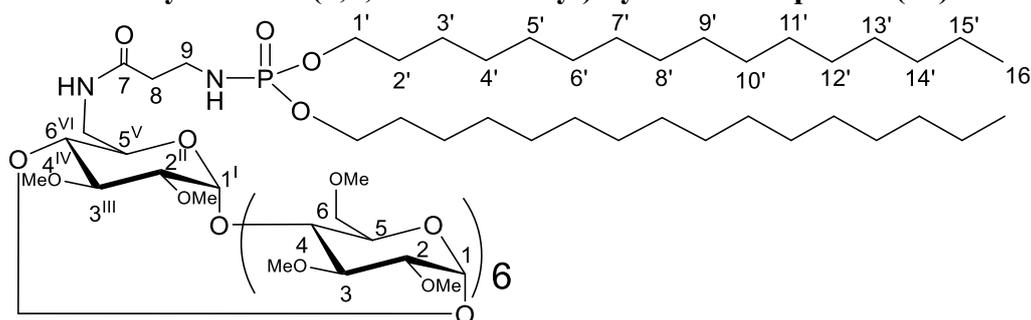
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

99.16 (7C, C₁, C^I), 81.94-80.44 (21C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 71.35 (14C, C₅, C^V, C₆, C^{VI}), 66.65 (2C, C^{1'}), 61.57 (6C, O₍₆₎CH₃), 59.12 (7C, O₍₂₎CH₃), 58.43 (7C, O₍₃₎CH₃), 37.90 (2C, C₈, C₉), 32.57-22.80 (24C, C_{2'-13'}), 14.22 (2C, C_{14'})

³¹P NMR (120 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

110,51 (s, 1P)

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(hexadecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-O-methyl-hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)-cyclomaltoheptaose (21)



O,O-dihexadecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (288 mg, 0.467 mmol, 1,5 eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (10 mL) and methylene chloride (40 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (420 mg, 3.11 mmol, 10 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (720 μL, 4.61 mmol, 15 eq) were added. After stirring for 3h, the 6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-O-methyl-hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)cyclomaltoheptaose solution (440 mg, 0.31 mmol, 1 eq dissolved in 4 mL of methylene chloride with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in methylene chloride and cooled at -20°C. 1-hydroxybenzotriazole was precipitated and removed by filtration. Then, the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0, 95/5 and 8/2) with 78%.

Chemical Formula: C₉₇H₁₈₁N₂O₃₈P, Molecular Weight: 2013.20 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.44 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 2036,1959 [M+Na]⁺, (C₉₇H₁₈₁N₂O₃₈PNa requires 2036,1928)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.15 (m, 1H, NH), 5.11 (m, 7H, H₁, H^I), 3.90 (m, 4H, H_{1'}), 3.80-3.45 (m, 35H, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.63 (s, 18H, O₍₆₎CH₃), 3.50 (s, 21H, O₍₃₎CH₃), 3.38 (s, 21H, O₍₂₎CH₃), 3.14 (m, 9H, H₂, H^{II}, H₉), 2.31 (t, 2H, H₈), 1.54 (m, 4H, H_{2'}), 1.17 (m, 52H, H_{3'-H15'}), 0.81 (t, 6H, H_{16'}, J_{H16'-H15'} = 6.39 Hz)

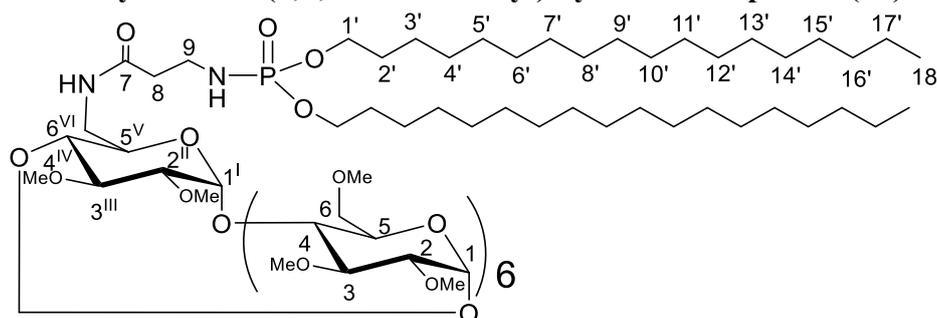
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

99.03 (7C, C₁, C^I), 81.81-80.30 (21C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 70.92 (14C, C₅, C^V, C₆, C^{VI}), 66.52 (2C, C_{1'}), 61.44 (6C, O₍₆₎CH₃), 59.00-58.47 (14C, O₍₃₎CH₃, O₍₂₎CH₃), 37.81 (2C, C₈, C₉), 31.89-22.66 (28C, C_{2'-C15'}), 14.09 (2C, C_{16'})

³¹P NMR (120 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

110.53 (s, 1P)

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(octadecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose (22)



O,O-dioctadecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (mg, mmol, eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (mL) and methylene chloride (mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (mg, mmol, eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (μL, mmol, eq) were added. After stirring for 3h, the 6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose solution (mg, mmol, 1eq dissolved in mL of methylene chloride with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in methylene chloride and cooled at -20°C. 1-hydroxybenzotriazole was precipitated and removed by filtration. Then, the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0, 95/5 and 8/2) with %.

Chemical Formula: C₁₀₁H₁₈₉N₂O₃₈P, Molecular Weight: 2069.27g.mol⁻¹

TLC: Rf = 0.50(DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z [M+Na]⁺, (C₉₇H₁₈₁N₂O₃₈PNa requires)

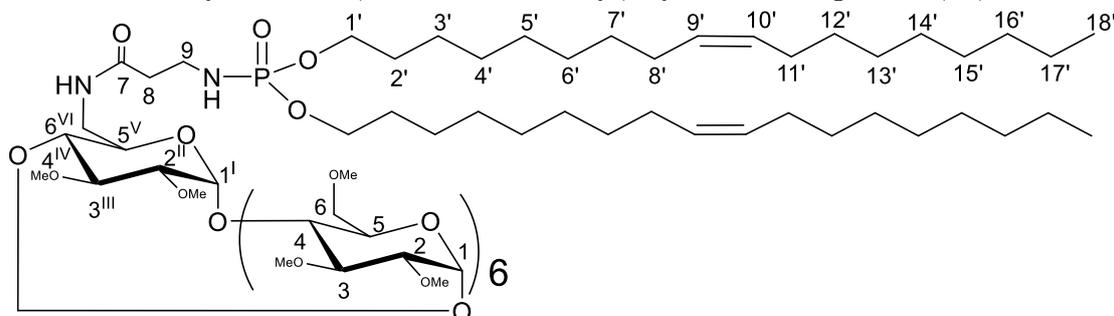
¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.28 (m, 1H, NH), 5.12 (m, 7H, H₁, H^I), 3.92 (m, 4H, H_{1'}), 3.89-3.38 (m, 35H, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.63 (s, 18H, O₍₆₎CH₃), 3.50 (s, 21H, O₍₃₎CH₃), 3.38 (s, 21H, O₍₂₎CH₃), 3.19 (m, 9H, H₂, H^{II}, H₉), 2.38 (t, 2H, H₈), 1.61 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 52H, H_{3'-H17'}), 0.87 (t, 6H, H_{18'}, J_{H18-H17} = 6.48 Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

99.03 (7C, C₁, C^I), 81.90 (14C, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 80.39 (7C, C₂, C^{II}), 71.32 (7C, C₆, C^{VI}), 71.03 (7C, C₅, C^V), 66.76 (2C, C_{1'}), 61.64(6C, O₍₆₎CH₃), 59.18 (14C, O₍₂₎CH₃, O₍₃₎CH₃), 37.94 (2C, C₈, C₉), 32.07-22.84 (32C, C_{2'-C17'}), 14.09 (2C, C_{18'})

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(oleyldecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-O-methyl-hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)-cyclomaltoheptaose (23)



O,O-dioleyldecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (283 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (15 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (378 mg, 2.8 mmol, 10 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (436 μL, 2.8 mmol, 10 eq) were added. After stirring for 1h, the 6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-O-methyl-hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)cyclomaltoheptaose solution (395 mg, 0.28 mmol, 1 eq dissolved in 10 mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in methylene chloride and cooled at -

20°C. 1-hydroxybenzotriazole was precipitated and removed by filtration. Then, the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 96/4) with 85%.

Chemical Formula: $C_{101}H_{185}N_2O_{38}P$, Molecular Weight: $2065.23\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.42$ (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 2088.2251 $[M+Na]^+$, ($C_{101}H_{185}N_2O_{38}PNa$ requires 2088.2241)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

6.17 (m, 1H, NH), 5.33 (m, 4H, $H_{9'}$, $H_{10'}$), 5.12 (m, 7H, H_1 , H^I), 3.96 (m, 4H, $H_{1'}$), 3.89-3.41 (m, 35H, H_3 , H^{III} , H_4 , H^{IV} , H_5 , H^V , H_6 , H^{VI}), 3.62 (s, 18H, $O_{(6)}\text{CH}_3$), 3.50 (s, 21H, $O_{(3)}\text{CH}_3$), 3.37 (s, 21H, $O_{(2)}\text{CH}_3$), 3.17 (m, 9H, H_2 , H^{II} , H_9), 2.36 (t, 2H, H_8), 1.99 (m, 8H, $H_{8'}$, $H_{11'}$), 1.64 (m, 4H, $H_{2'}$), 1.26 (m, 44H, $H_{3'-7'}$, $H_{12'-17'}$), 0.87 (t, 6H, $H_{18'}$, $J_{H_{18'}-H_{17'}} = 6.37$ Hz)

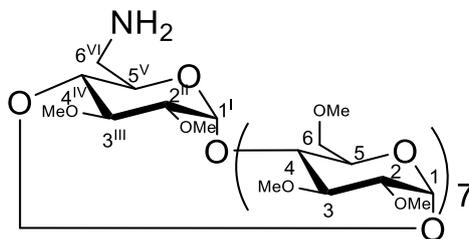
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

130.13 (4C, $C_{9'}$, $C_{10'}$), 99.20 (7C, C_1 , C^I), 82.21-80.47 (21C, C_2 , C^{II} , C_3 , C^{III} , C_4 , C^{IV}), 71.38-71.08 (13C, C_5 , C^V , C_6), 66.65 (2C, $C_{1'}$), 61.61 (6C, $O_{(6)}\text{CH}_3$), 59.16-58.49 (14C, $O_{(3)}\text{CH}_3$, $O_{(2)}\text{CH}_3$), 39.96 (1C, C^{VI}), 37.94 (2C, C_8 , C_9), 32.75-22.82 (28C, $C_{2'-C_8'}$, $C_{11'-C_{17'}}$), 14.25 (2C, $C_{18'}$)

^{31}P NMR (120 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

110.55 (s, 1P)

6^{VI}-mono-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl) cyclomaltooctaose (24)



γ -CD (5.0 g, 3.85 mmol, 1 eq) was solubilized in pyridine (300 mL) under argon. After the solubilization (40 min), the 2,4,6-triisopropyl sulfonyl chloride (3.5 g, 11.56 mmol, 3 eq) was added. The reaction mixture has been stirred at room temperature under argon for 24h. Then, the solvent was removed by evaporation under reduced pressure until there is a minimum of solvent and acetone (500 mL) was added. The precipitation obtained was filtered and was washed with acetone. The white powder of 6^{VI}-(*O*-2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl)-cyclomaltooctaose was put in desiccator at 60°C under reduced pressure one night.

Then, the 6^{VI}-(*O*-2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl)-cyclomaltooctaose (6.07 g, 3.89 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (130 mL) at 80°C. After solubilization, the sodium azide (0.51 g, 7.77 mmol, 2 eq) was added and the reaction mixture has been stirred at 80°C for 24h. Then, the solvent was removed by evaporation under reduced pressure, a little bit of water has been added to solubilize the product and acetone (200 mL) was added. The precipitation obtained was filtered and was washed with acetone. The white powder of 6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltooctaose was put in desiccator at 60°C under reduced pressure one night.

Then, the 6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltooctaose (1.72 g, 1.30 mmol, 1 eq) was dissolved in dry DMF (70 mL). The solution was cooled down at 0°C in ice bath and sodium hydride (60%, m/m) (3.12 g, 78.1 mmol, 60 eq) was added. After solubilization, methyl iodide (15 mL, 240.9 mmol, 185 eq) was added. The reaction mixture has been stirred at room temperature and under inert atmosphere for 1 day. The addition of few drops of ethanol stopped the reaction. The reaction mixture is then filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The obtained oil was put in a minimum of water and extracted with dichloromethane (3x50 mL). The organic phase was washed with water (2x50 mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. A yellow oil was obtained which is a mixture of the expected compound and the per(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltooctaose, formed from the γ -CD regenerated during the synthesis of 6^{VI}-azido-6^{VI}-deoxy-cyclomaltooctaose. This mixture would be purified in the next step.

Then, the 6^{VI}-mono-azido-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-O-methyl-hexakis(2,3,6-tri-O-methyl) cyclomaltooctaose (3.041 g, 1.85 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (155 mL). After solubilization, the triphenyl phosphine (2.43 g, 9.25 mmol, 5 eq) was added and the reaction mixture has been stirred at room temperature for 2h. The solution was cooled down at 0°C in ice bath and ammoniac solution (85 mL, 38%) was added drop by drop. The reaction mixture has been stirred at room temperature for 1 night. Then, the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0, 95/5 and 8/2) with 5% global yield.

Chemical Formula: C₇₁H₁₂₇NO₃₉, Molecular Weight: 1617.80 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.52 (9/1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 1641.0 [M+Na]⁺

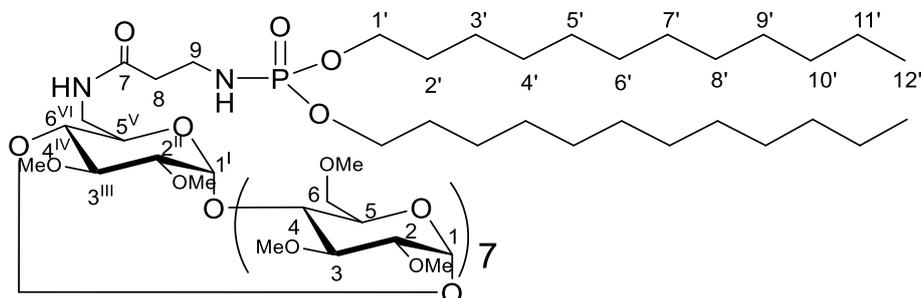
¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.21 (m, 8H, H^I, H^I), 3.91-3.30 (m, 49H, H₂, H^{II}, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.64 (s, 21H, O₍₆₎CH₃), 3.51 (s, 24H, O₍₃₎CH₃), 3.37 (s, 24H, O₍₂₎CH₃), 3.21 (m, 8H, H₂, H^{II}).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm):

98.05 (8C, C^I, C^I), 82.00 (24C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 71.30 (7C, C₆), 70.92 (8C, C₅, C^V), 61.43 (8C, O₍₆₎CH₃), 59.18 (7C, O₍₃₎CH₃), 58.88 (7C, O₍₂₎CH₃).

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(dodecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-cyclomaltooctaose (25)



O,O-didodecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (51 mg, 0.10 mmol, 1.5 eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (3 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (90 mg, 0.67 mmol, 10 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (100 μL, 0.67 mmol, 10 eq) were added. After stirring for 2h, the 6^{VI}-amino-6^{VI}-deoxy-2^{II},3^{III}-di-*O*-methyl-hexakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose solution (108 mg, 0.067 mmol, 1 eq dissolved in 3 mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5) with 52%.

Chemical Formula: C₉₈H₁₈₁N₂O₄₃P, Molecular Weight: 2105.18 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.46 (9/1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 2129.9 [M+Na]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.18 (m, 1H, NH), 5.13 (m, 8H, H₁, H^I), 3.94 (m, 4H, H_{1'}), 3.90-3.29 (m, 35H, H₃, H^{III}, H₄, H^{IV}, H₅, H^V, H₆, H^{VI}), 3.62 (s, 18H, O₍₆₎CH₃), 3.50 (s, 21H, O₍₃₎CH₃), 3.37 (s, 21H, O₍₂₎CH₃), 3.19 (m, 10H, H₂, H^{II}, H₉), 2.37 (t, 2H, H₈), 1.62 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 36H, H_{3'}-H_{11'}), 0.87 (t, 6H, H_{12'}, J_{H12'H11'} = 6.41 Hz)

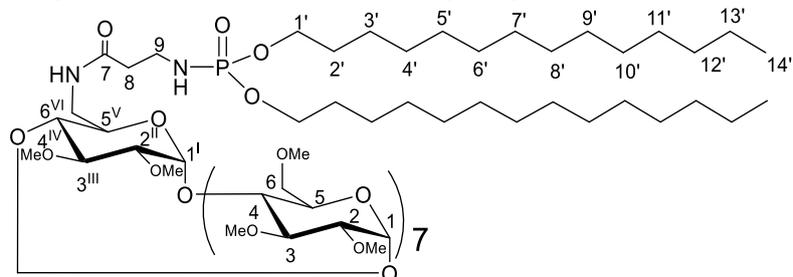
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

99.20 (8C, C₁, C^I), 82.20-80.79 (24C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 71.38, 71.19 (15C, C₆, C₅, C^V), 66.67 (2C, C_{1'}), 61.61 (7C, O₍₆₎CH₃), 59.16-58.76 (16C, O₍₃₎CH₃, O₍₂₎CH₃), 39.97 (1C, C^{VI}), 37.95 (2C, C₈, C₉), 32.05-22.82 (20C, C_{2'}-C_{11'}), 14.24 (2C, C_{12'})

^{31}P NMR (120 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

110.46 (s, 1P)

6^{VI} -amido- β -alanyl-(6^{VI} -di(tetradecyloxy)phosphoramidyl)- 6^{VI} -deoxy- $2^{\text{II}},3^{\text{III}}$ -di- O -methyl-hexakis(2,3,6-tri- O -methyl)-cyclomaltooctose (26)



O,O -ditetradecyl- N -(2-carboxyethyl)phosphoramidate (52mg, 0.093mmol, 1.5eq) was dissolved in anhydrous N,N dimethylformamide (3mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (83mg, 0.62mmol, 10eq) and N,N -diisopropylcarbodiimide (96 μL , 0.62mmol, 10eq) were added. After stirring for 2h, the 6^{VI} -amino- 6^{VI} -deoxy- $2^{\text{II}},3^{\text{III}}$ -di- O -methyl-hexakis(2,3,6-tri- O -methyl)cyclomaltooheptaose solution (100mg, 0.062mmol, 1eq dissolved in 3mL of methylene chloride with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5) with 54%.

Chemical Formula: $\text{C}_{102}\text{H}_{189}\text{N}_2\text{O}_{43}\text{P}$, Molecular Weight: 2161.24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = (/ (v/v))$

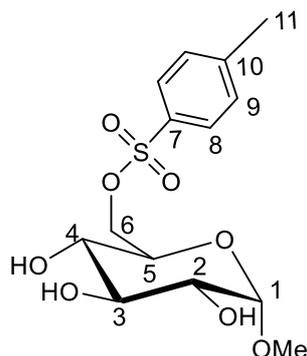
ZQ (ESI): m/z 2185.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

6.16 (m, 1H, NH), 5.26 (m, 8H, H_1 , H^{I}), 3.94 (m, 4H, H_1), 3.87-3.37 (m, 35H, H_3 , H^{III} , H_4 , H^{IV} , H_5 , H^{V} , H_6 , H^{VI}), 3.63 (s, 18H, $\text{O}_{(6)}\text{CH}_3$), 3.51 (s, 21H, $\text{O}_{(3)}\text{CH}_3$), 3.37 (s, 21H, $\text{O}_{(2)}\text{CH}_3$), 3.19 (m, 9H, H_2 , H^{II} , H_9), 2.37 (m, 2H, H_8), 1.64 (m, 4H, H_2), 1.25 (m, 48H, H_3 - H_{13}), 0.87 (t, 6H, H_{12} , $J_{\text{H}14'-\text{H}13'} = 6.41$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

98.07 (8C, C₁, C^I), 82.14 (24C, C₂, C^{II}, C₃, C^{III}, C₄, C^{IV}), 71.33, 70.93(15C, C₆, C₅, C^V), 66.69 (2C, C_{1'}), 61.36 (7C, O₍₆₎CH₃), 59.17 (16C, O₍₃₎CH₃, O₍₂₎CH₃), 40.00 (1C, C^{VI}), 37.91 (2C, C₈, C₉), 32.06-22.84 (24C, C_{2'}-C_{13'}), 14.28 (2C, C_{12'})

6-tosyl-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranoside (27)

Methyl α -D-glucopyranoside (4g, 20.6mmol, 1eq) was dissolved in dry pyridine (60mL) under argon, then, the mixture was cooled down at 0°C with in ice bath. p-toluenesulfonyl chloride (4.71g, 24.72mmol, 1.2eq) was dissolved in dry pyridine (30mL), then was added drop by drop under argon at the methyl α -D-glucopyranoside solution . After 4h under stirring and argon at 0°C, methanol was added (3mL) to stop the reaction and chloroform (150mL) was added. Then, the solution was washed by water (2x30mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0 to 95/5) with 54%.

Chemical Formula: C₁₄H₂₀O₈S, Molecular Weight: 348,09 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.54 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 371.0784 [M+Na]⁺, (C₁₄H₂₀O₈SNa requires 371.0777)

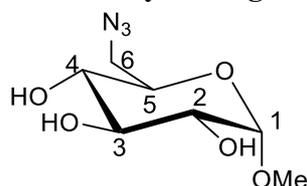
¹H NMR (300MHz, DMSO), δ (ppm):

7.77 (d, 2H, H₈, J_{H8-H9}=8.32 Hz), 7.48 (d, 2H, H₉, J_{H9-H8}=8.32 Hz), 5.18 (d, 1H, OH, J_{OH-H4}=5.80 Hz), 4.90 (d, 1H, OH, J_{OH-H3} = 5.16 Hz), 4.83 (d, 1H, OH, J_{OH-H2} = 6.56 Hz), 4.48 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2}= 3.69 Hz), 4.24 (m, 1H, H₆), 4.03 (m, 1H, H_{6'}), 3.51 (m, 1H, H₅), 3.33 (m, 1H, H₃), 3.21 (s, 3H, OMe), 3.14 (m, 1H, H₂), 2.99 (m, 1H, H₄), 2.42 (s, 3H, CH₃ aro)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ (ppm):

145.06 (1C, C₇), 132.41 (1C, C₁₀), 130.26 (2C, C₉), 127.72 (2C, C₈), 99.82 (1C, C₁), 73.14 (1C, C₃), 71.68 (1C, C₂), 70.41 (1C, C₆), 69.84 (1C, C₄), 69.50 (1C, C₅), 54.64 (1C, OMe), 21.22 (1C, CH₃ aro).

6-azido-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranoside (28)



6-tosyl-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranoside (3.2g, 9.19mmol, 1eq) was dissolved in dry DMF (80mL) under argon and the temperature was increased at 80°C. Then, a spatula tip of tetra-N-butylammonium iodide and sodium azide (1.20g, 18.39mmol, 2eq) was added slowly. After one night under stirring at 80°C under argon, the solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (100/0 to 95/5) with 76%.

Chemical Formula: C₇H₁₃N₃O₅, Molecular Weight: 219.09g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.43 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

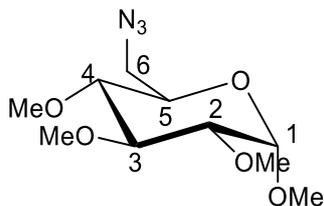
HRMS (ESI): m/z 242.0751 [M+Na]⁺, (C₇H₁₃N₃O₅Na requires 242.0753)

¹H NMR (600 MHz, DMSO), δ (ppm):

4.37 (d, 1H, OH, J_{OH-H4} = 6.62 Hz), 4.09 (d, 1H, OH, J_{OH-H3} = 4.57 Hz), 4.04 (d, 1H, OH, J_{OH-H2} = 7.25 Hz), 3.77 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2} = 3.88 Hz), 2.71 (m, 1H, H₅), 2.64 (m, 1H, H₆), 2.57 (m, 1H, H_{6'}), 2.55 (m, 1H, H₃), 2.50 (s, 3H, OMe), 2.42 (m, 1H, H₂), 2.24 (m, 1H, H₄).

¹³C NMR (75MHz, DMSO), δ (ppm):

100.00 (1C, C₁), 73.09 (1C, C₃), 71.86 (1C, C₂), 71.21 (2C, C₄; C₅), 54.71 (1C, OMe), 51.45 (1C, C₆).

6-azide-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl- α -D-glucopyranoside (29)

6-azide-6-deoxy-1-*O*-methyl- α -D-glucopyranoside () was dissolved in dry DMF () under argon. The solution was cooled down at 0°C in ice bath and sodium hydride (60%, m/m) (10eq) was added. After solubilization, methyl iodide (10eq) was added. The reaction mixture has been stirred at room temperature and under inert atmosphere for 1 day. The addition of few drops of ethanol stopped the reaction. The reaction mixture is then filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The obtained oil was put in a minimum of water and extracted with dichloromethane (4x50mL).

The organic phase was washed with water (2x50mL), dried on sodium sulfate, filtered and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. Then, the residue was purified by column chromatography on silica gel CY/AcOEt (100/0 to 80/20) with 76%.

Chemical Formula: C₁₀H₁₉N₃O₅ , Molecular Weight: 261.13 g.mol⁻¹

TLC: R_f= 0.66 (CY/AcOEt 1:1 (v/v))

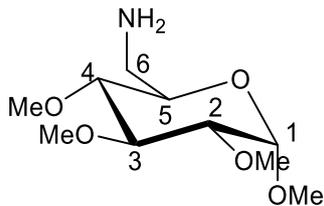
HRMS (ESI): m/z 284.1223 [M+Na]⁺, (C₁₀H₁₉N₃O₅Na requires 284.1222)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.80 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2}=3.79 Hz) , 3.61 (m, 1H, H₅), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.49 (s, 3H, OMe), 3.46 (m, 2H, H₃; H₆) , 3.41 (s, 3H, OMe), 3.37 (dd, 1H, H_{6'}, J_{H6-H6'}= 5.64 Hz, J_{H6-H5}=13.04 Hz), 3.17 (dd, 1H, H₂, J_{H2-H1}=3.70 Hz, J_{H2-H3}=9.56 Hz), 3.04 (dd, 1H, H₄, J_{H4-H3}=8.70 Hz, J_{H4-H5}= 8.93 Hz).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

97.53 (1C, C₁), 83.44 (1C, C₃), 81.87 (1C, C₂), 80.40 (1C, C₄), 70.07 (1C, C₅), 60.98; 60.74; 59.14; 55.44 (4C, 4OMe), 51.52 (1C, C₆).

6-amino-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl- α -D-glucopyranoside (30)

6-azide-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl- α -D-glucopyranoside (1.16 g, 4.44 mmol) was solubilized in MeOH (89mL) to obtain a concentration at 0.05M. The reduction is performed using the H cube equipped by a cartridge of Pd/C 10% at 25°C during 5h. Then, the solvent is removed and the residue is purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 to 90/10) with 84%.

Chemical Formula: C₁₀H₂₁NO₅, Molecular Weight: 235,14 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.25 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (v/v))

ESI-MS⁺: m/z 258.1320 ([M+Na]⁺, (C₁₀H₂₁NO₅Na requires 258.1317)

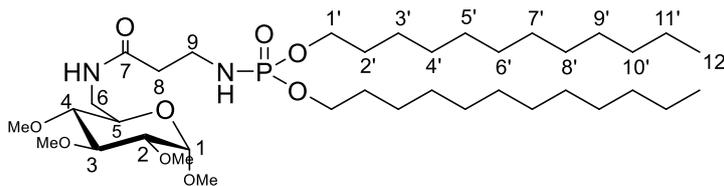
¹H NMR (400MHz, CDCl₃), δ (ppm):

4.77 (d, 1H, H1, J_{H1-H2} = 3.57 Hz) , 3.59 (s, 3H, OMe), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.50 (m, 1H, H3) 3.49 (s, 3H, OMe), 3.43 (m, 1H, H5), 3.38 (s, 3H, OMe), 3.01 (dd, 1H, H6', J_{H6-H6'} = 2.35 Hz, J_{H6-H5} = 13.35 Hz), 3.15 (dd, 1H, H2, J_{H2-H1} = 3.70 Hz, J_{H2-H3} = 9.56 Hz), 2.95 (m, 1H, H4), 2.76 (m, 1H, H6).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

97.53 (1C, C₁), 83.54 (1C, C₃), 82.06 (1C, C₂), 81.28 (1C, C₄), 71.77 (1C, C₅), 60.95; 60.64; 59.08; 55.15 (4C, 4OMe), 43.01 (1C, C₆).

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(dodecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside (31)



O,O-didodecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (212mg, 0.42mmol, 1.5eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (5mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (378mg, 2.8mmol, 10eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (436μL, 2.8mmol, 10eq) were added. After stirring for 2h, the 6-amino-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside solution (65.6mg, 0.28mmol, 1eq dissolved in 5mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5, with 1% of triethylamine in the eluent) with 86%.

Chemical Formula: C₃₇H₇₅N₂O₉P, Molecular Weight: 722.52 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.27 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 745.5086 [M+Na]⁺, (C₃₇H₇₅N₂O₉PNa requires 745.5108)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.98 (m, 1H, NH), 4.73 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2}=3.43 Hz), 3.91 (m, 4H, H_{1'}), 3.57 (s, OMe), 3.54; 3.52 (m, 2H, H₆), 3.54 (m, 1H, H₅), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.48 (s, 3H, OMe), 3.46 (m, 1H, H₃), 3.35 (s, 3H, OMe), 3.19 (m, H₉, 2H) 3.12 (dd, 1H, H₂, J_{H2-H1} = 3.47 Hz, J_{H2-H3} = 9.58 Hz), 2.85 (m, 1H, H₄), 2.37 (t, 2H, H₈), 1.62 (m, 4H, H_{2'}), 1.22 (m, 36H, H_{3'-H11'}), 0.84 (t, 6H, H_{12'}, J_{H12'-H11'} = 6.07 Hz).

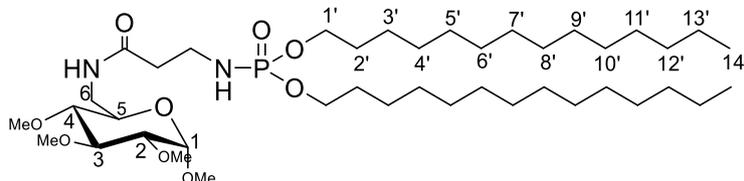
¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm):

97.60 (1C, C₁), 83.43 (1C, C₃), 81.93 (1C, C₂), 81.09 (1C, C₄), 69.13 (1C, C₅), 66.71 (2C, C_{1'}), 60.99; 60.80; 59.21; 55.39 (4C, OMe), 39.89 (1C, C₆), 37.86 (2C, C₈, C₉), 32.04-22.81 (20C, C_{2'-C11'}), 14.23 (2C, C_{12'})

^{31}P NMR (122 MHz, CDCl_3), reference H_3PO_4 , δ (ppm):

9.17 (s, 1P)

6^{VI} -amido- β -alanyl-(6^{VI} -di(tetradecyloxy)phosphoramidyl)- 6^{VI} -deoxy-1,2,3,4-tetra-*O*-methyl- α -D-glucopyranoside (32)



O,O-didodecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (180 mg, 0.21 mmol, 1.5eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (3 mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (284 mg, 2.1 mmol, 10 eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (327 μL , 2.1 mmol, 10 eq) were added. After stirring for 2h, the 6-amino-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-*O*-methyl- α -D-glucopyranoside solution (50.0 mg, 0.28 mmol, 1 eq dissolved in 3 mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5) with 76%.

Chemical Formula: $\text{C}_{41}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$, Molecular Weight: 778.58 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TLC: $R_f = 0.5$ (DCM/MeOH 9:1 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 801.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

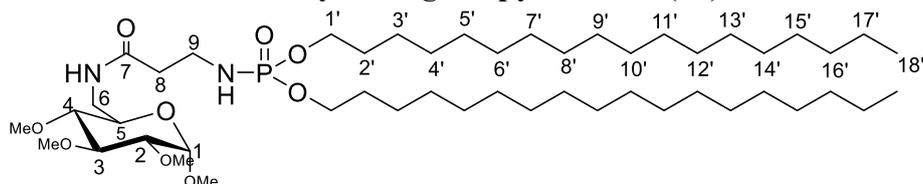
^1H NMR (300MHz, CDCl_3), δ (ppm):

5.92 (m, 1H, NH), 4.75 (d, 1H, H_1 , $J_{\text{H}_1-\text{H}_2}=3.62$ Hz), 3.94 (m, 4H, $\text{H}_{1'}$), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.56; 3.49 (m, 2H, H_6), 3.54 (m, 1H, H_5), 3.53 (s, 3H, OMe), 3.50 (s, 3H, OMe), 3.47 (m, 1H, H_3), 3.37 (s, 3H, OMe), 3.23 (m, H_9 , 2H), 3.13 (dd, 1H, H_2 , $J_{\text{H}_2-\text{H}_1}=3.58$ Hz; $J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=9.62$ Hz), 2.87 (m, 1H, H_4), 2.39 (t, 2H, H_8 , $J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=5.62$ Hz), 1.63 (m, 4H, $\text{H}_{2'}$), 1.24 (m, 48H, $\text{H}_{3'}$ - $\text{H}_{13'}$), 0.87 (t, 6H, $\text{H}_{14'}$, $J_{\text{H}_{14'}-\text{H}_{13'}}=6.28$ Hz).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), δ (ppm):

171.33 (1C, C=O), 97.59 (1C, C₁), 83.42 (1C, C₃), 81.92 (1C, C₂), 81.08 (1C, C₄), 69.12 (1C, C₅), 66.70 (2C, C_{1'}), 60.98; 60.79; 59.20; 55.38 (4C, OMe), 39.89 (1C, C₆), 37.84 (2C, C₈, C₉), 32.04; 30.56; 30.48; 29.81; 29.48; 29.36; 25.71; 22.81 (24C, C_{2'}-C_{13'}), 14.23 (2C, C_{14'})

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(tetradecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside (33)



O,O-dioctadecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (141mg, 0.21mmol, 1.5eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (5mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (189mg, 1.4mmol, 10eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (218μL, 1.4mmol, 10eq) were added. After stirring for 2h, the 6-amino-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside solution (33mg, 0.14mmol, 1eq dissolved in 5mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5, with 1% of triethylamine in the eluent) with 79%.

Chemical Formula: C₄₉H₉₉N₂O₉P, Molecular Weight: 890.71 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.27 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

HRMS (ESI): m/z 913.6982 [M+Na]⁺, (C₄₉H₉₉N₂O₉PNa requires 913.6986)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.87 (m, 1H, NH), 4.76 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2}= 3.66 Hz), 3.99 (m, 4H, H_{1'}), 3.61 (s, OMe), 3.55-3.50 (m, 2H, H₆), 3.54 (m, 1H, H₅), 3.54 (s, 3H, OMe), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.46 (m, 1H, H₃), 3.38 (s, 3H, OMe), 3.21 (m, H₉, 2H), 3.15 (dd, 1H, H₂, J_{H2-H1}= 3.66Hz, J_{H2-H3} = 9.59 Hz), 2.88

Experimental Part

(m, 1H, H₄), 2.40 (m, 2H, H₈), 1.65 (m, 4H, H_{2'}), 1.25 (m, 60H, H_{3'}-H_{17'}), 0.87 (t, 6H, H_{18'}, J_{H18'-H17'} = 6.69 Hz).

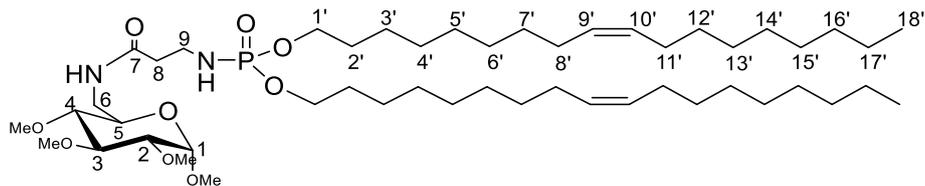
¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm):

171.12 (1C, C=O), 97.45 (1C, C₁), 83.29 (1C, C₃), 81.77 (1C, C₂), 80.90 (1C, C₄), 68.98 (1C, C₅), 66.54 (2C, C_{1'}), 60.92; 60.74; 59.13; 55.29 (4C, OMe), 39.72 (1C, C₆), 37.70 (2C, C₈, C₉), 31.94-22.71 (30C, C_{2'}-C_{17'}), 14.15 (2C, C_{18'}).

³¹P NMR (122 MHz, CDCl₃), reference H₃PO₄, δ (ppm):

9.10 (s, 1P)

6^{VI}-amido-β-alanyl-(6^{VI}-di(oleyldecyloxy)phosphoramidyl)-6^{VI}-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside (34)



O,O-dioleyldecyl-N-(2-carboxyethyl)phosphoramidate (117mg, 0.17mmol, 1.5eq) was dissolved in anhydrous *N,N* dimethylformamide (5mL) under argon. Then, 1-hydroxybenzotriazole (162mg, 1.2mmol, 10eq) and *N,N*-diisopropylcarbodiimide (187μL, 1.2mmol, 10eq) were added. After stirring for 2h, the 6-amino-6-deoxy-1,2,3,4-tetra-O-methyl-α-D-glucopyranoside solution (27mg, 0.12mmol, 1eq dissolved in 5mL of chloroform with few drops of triethylamine) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel DCM/MeOH (98/2 and 95/5, with 1% of triethylamine in the eluent) with 67%.

Chemical Formula: C₄₉H₉₅N₂O₉P, Molecular Weight: 886.68 g.mol⁻¹

TLC: R_f = 0.46 (DCM/MeOH 95:5 (v/v))

ZQ (ESI): m/z 909.7 [M+Na]⁺

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.87 (m, 1H, NH), 5.34 (m, 4H, H_{9'}, H_{10'}), 4.76 (d, 1H, H₁, J_{H1-H2} = 3.57 Hz), 3.96 (m, 4H, H_{1'}), 3.61 (s, 3H, OMe), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.50 (m, 1H, H₃) 3.49 (s, 3H, OMe), 3.43 (m, 1H, H₅), 3.38 (s, 3H, OMe), 3.23 (m, 2H, H₉), 3.15 (dd, 1H, H₂, J_{H2-H1} = 3.70 Hz, J_{H2-H3} = 9.56 Hz), 3.01 (m, 1H, H_{6'}), , 2.95 (m, 1H, H₄), 2.47 (m, 2H, H₈), 2.00 (m, 8H, H_{8'}, H_{11'}), 1.67 (m, 4H, H_{2'}), 1.27 (m, 44H, H_{3'-7'}, H_{12'-17'}), 0.88 (t, 6H, C_{18'})

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm):

130.09 (4C, C_{9'}, C_{10'}), 97.62 (1C, C₁), 83.44 (1C, C₃), 81.95 (1C, C₂), 81.10 (1C, C₄), 69.14 (1C, C₅), 66.72 (2C, C_{1'}), 61.01; 60.83; 59.23; 55.41 (4C, 4OMe), 39.91 (1C, C₆), 37.86 (2C, C₈, C₉), 32.75-22.82 (28C, C_{2'-8'}, C_{11'-17'}), 14.25 (2C, C_{18'})

REFERENCES

- (1) Sakaeda, T.; Okamura, N.; Nagata, S.; Yagami, T.; Horinouchi, M.; Okumura, K.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Biological and Pharmaceutical Bulletin***2001**, *24*, 935.
- (2) Witt, J.-A.; Elger, C. E.; Helmstaedter, C. *Epilepsy & Behavior***2013**, *29*, 141.
- (3) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *Journal of Pharmaceutical Sciences***1996**, *85*, 1017.
- (4) Carrier, R. L.; Miller, L. A.; Ahmed, I. *Journal of Controlled Release***2007**, *123*, 78.
- (5) Cecchelli, R.; Berezowski, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M.-P.; Fenart, L. *Nat Rev Drug Discov***2007**, *6*, 650.
- (6) Pomerantz, R. J. *Clinical Infectious Diseases***2002**, *34*, 93.
- (7) Laurence Bousquet, C. R., Alexandra Hembury, Marie-Claire Nevers, Christophe Creminon, Robert Farinotti, Aloïse Mabondzo *AIDS Research and Human Retroviruses***2008**, *24*(9), 1147.
- (8) Favrelle, A.; Bonnet, V.; Sarazin, C.; Djedaïni-Pilard, F. *Tetrahedron: Asymmetry***2008**, *19*, 2240.
- (9) Favrelle, A.; Bonnet, V.; Sarazin, C.; Djedaïni-Pilard, F. *Journal of Inclusion Phenomena***2007**, *57*, 15.
- (10) Gervaise, C. Chimie Organique, Université de Picardie Jules Vernes, 2012.
- (11) Gervaise, C.; Bonnet, V.; Wattraint, O.; Aubry, F.; Sarazin, C.; Jaffrès, P.-A.; Djedaïni-Pilard, F. *Biochimie***2012**, *94*, 66.
- (12) Villiers, A. *Académie des sciences (France)***1891**, *112*, 536.
- (13) Crini, G. *Chemical Reviews***2014**, *114*, 10940.
- (14) Wind, R. D.; Liebl, W.; Buitelaar, R. M.; Penninga, D.; Spreinat, A.; Dijkhuizen, L.; Bahl, H. *Applied and Environmental Microbiology***1995**, *61*, 1257.
- (15) Ellouze, F.; Ben Amar, N.; Deratani, A. *Comptes Rendus Chimie***2011**, *14*, 967.
- (16) Messner, M.; Kurkov, S. V.; Jansook, P.; Loftsson, T. *International Journal of Pharmaceutics***2010**, *387*, 199.
- (17) James, W. J.; French, D.; Rundle, R. E. *Acta Crystallographica***1959**, *12*, 385.
- (18) Loftsson, T.; Duchêne, D. *International Journal of Pharmaceutics***2007**, *329*, 1.
- (19) Tran, D. N.; Legrand, F.-X.; Menuel, S.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Monflier, E. *Chemical Communications***2012**, *48*, 753.
- (20) Lu, R.; Hao, J.; Wang, H.; Tong, L. *Journal of Colloid and Interface Science***1997**, *192*, 37.
- (21) Schönherr, H.; Beulen, M. W. J.; Bügler, J.; Huskens, J.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Vancso, G. J. *Journal of the American Chemical Society***2000**, *122*, 4963.
- (22) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *Journal of Pharmacy and Pharmacology***2011**, *63*, 1119.
- (23) Li, S.; Purdy, W. C. *Chemical Reviews***1992**, *92*, 1457.
- (24) Del Valle, E. M. M. *Process Biochemistry***2004**, *39*, 1033.
- (25) Parrot-Lopez, H., Perret, F., Bertino-Ghera, B. *Elsevier Masson***2010**, *68*, 12.
- (26) Dictionnaire de français Larousse ed.
- (27) Dictionnaire de français Larousse ed.
- (28) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. *Chemical Reviews***1998**, *98*, 1977.
- (29) Kawabata, Y.; Matsumoto, M.; Tanaka, M.; Takahashi, H.; Irinatsu, Y.; Tamura, S.; Tagaki, W.; Nakahara, H.; Fukuda, K. *Chemistry Letters***1986**, *15*, 1933.
- (30) Zhang, P.; Chang-Chun, L.; Coleman, A. W.; Parrot-Lopez, H.; Galons, H. *Tetrahedron Letters***1991**, *32*, 2769.
- (31) Fügedi, P. *Carbohydrate Research***1989**, *192*, 366.
- (32) Wenz, G. *Carbohydrate Research***1991**, *214*, 257.
- (33) Bellanger, N.; Perly, B. *Journal of Molecular Structure***1992**, *273*, 215.
- (34) Matsui, Y.; Yokoi, T.; Mochida, K. *Chemistry Letters***1976**, *5*, 1037.

- (35) Parrot-Lopez, H.; Djedaïni, F.; Perly, B.; Coleman, A. W.; Galons, H.; Miocque, M. *Tetrahedron Letters***1990**, *31*, 1999.
- (36) Parrot-Lopez, H.; Galons, H.; Coleman, A. W.; Djedaïni, F.; Keller, N.; Perly, B. *Tetrahedron: Asymmetry***1990**, *1*, 367.
- (37) Law, H.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Jicsinszky, L.; Crouzy, S.; Defaye, J. *The Journal of Physical Chemistry B***2011**, *115*, 7524.
- (38) Roux, M.; Perly, B.; Djedaïni-Pilard, F. *Eur Biophys J***2007**, *36*, 861.
- (39) Hirayama, F.; Kurihara, M.; Horiuchi, Y.; Utsuki, T.; Uekama, K.; Yamasaki, M. *Pharm Res***1993**, *10*, 208.
- (40) Kusmin, A.; Lechner, R. E.; Kammel, M.; Saenger, W. *The Journal of Physical Chemistry B***2008**, *112*, 12888.
- (41) Franklin, B. B., William; Mr. Farish *Phil. Trans. Res. Soc. London***1774**, *64*, 445.
- (42) Giles, C. H.; Forrester, S. D.; Roberts, G. G. In *Langmuir-Blodgett Films*; Roberts, G., Ed.; Springer US: 1990, p 1.
- (43) Agnes, P. *Nature***1891**, *43*, 437.
- (44) Dynarowicz-Łątka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira Jr, O. N. *Advances in Colloid and Interface Science***2001**, *91*, 221.
- (45) Langmuir, I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***1917**, *3*, 251.
- (46) Dynarowicz-Łątka, P.; Kita, K. *Advances in Colloid and Interface Science***1999**, *79*, 1.
- (47) Hąc-Wydro, K.; Dynarowicz-Łątka, P. *Biophysical Chemistry***2006**, *123*, 154.
- (48) Calvez, P.; Bussières, S.; Éric, D.; Salesse, C. *Biochimie***2009**, *91*, 718.
- (49) O. Albrecht, H. G., E. Sackmann *Journal de Physique***1978**, *39*, 301.
- (50) Lundbæk, J. A.; Birn, P.; Hansen, A. J.; Søggaard, R.; Nielsen, C.; Girshman, J.; Bruno, M. J.; Tape, S. E.; Egebjerg, J.; Greathouse, D. V.; Mattice, G. L.; Koeppe, R. E.; Andersen, O. S. *The Journal of General Physiology***2004**, *123*, 599.
- (51) Levi, V.; Rossi, J. P. F. C.; Echarte, M. M.; Castello, P. R.; González Flecha, F. L. *J. Membrane Biol.***2000**, *173*, 215.
- (52) Suwalsky, M.; Schneider, C.; Villena, F.; Norris, B.; Cárdenas, H.; Cuevas, F.; Sotomayor, C. P. *Blood Cells, Molecules, and Diseases***2002**, *29*, 14.
- (53) Calvez, P.; Demers, E. r.; Boisselier, E. I.; Salesse, C. *Langmuir***2011**, *27*, 1373.
- (54) Boisselier, É.; Calvez, P.; Demers, É.; Cantin, L.; Salesse, C. *Langmuir***2012**, *28*, 9680.
- (55) Morandat, S.; Bortolato, M.; Anker, G.; Doutheau, A.; Lagarde, M.; Chauvet, J.-P.; Roux, B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***2003**, *1616*, 137.
- (56) Miñones Jr, J.; Rodríguez Patino, J. M.; Miñones, J.; Dynarowicz-Latka, P.; Carrera, C. *Journal of Colloid and Interface Science***2002**, *249*, 388.
- (57) Hénon, S.; Meunier, J. *Review of Scientific Instruments***1991**, *62*, 936.
- (58) Hoenig, D.; Moebius, D. *The Journal of Physical Chemistry***1991**, *95*, 4590.
- (59) Brezesinski, J. J. G.-C. G. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology***2012**, 1007.
- (60) Corvis, Y., Université Henri Poincarré, 2005.
- (61) Deng, J.; Viers, B. D.; Esker, A. R.; Anseth, J. W.; Fuller, G. G. *Langmuir***2005**, *21*, 2375.
- (62) Vollhardt, D.; Fainerman, V. B.; Siegel, S. *The Journal of Physical Chemistry B***2000**, *104*, 4115.
- (63) Giner-Casares, J. J.; de Miguel, G.; Pérez-Morales, M.; Martín-Romero, M. T.; Camacho, L.; Muñoz, E. *The Journal of Physical Chemistry C***2009**, *113*, 5711.
- (64) Klaus, A.; Fajolles, C.; Bauer, M.; Collot, M.; Mallet, J.-M.; Dailant, J. *Langmuir***2011**, *27*, 7580.
- (65) Li, J. B.; Miller, R.; Vollhardt, D.; Möhwald, H. *Thin Solid Films***1998**, *327–329*, 84.
- (66) Flasiński, M.; Broniatowski, M.; Romeu, N. V.; Dynarowicz-Łątka, P.; Moreno, A. G.; Vilas, A. M.; González Martín, M. L. *The Journal of Physical Chemistry B***2008**, *112*, 4620.

- (67) Kjaer, K.; Als-Nielsen, J.; Helm, C. A.; Laxhuber, L. A.; Möhwald, H. *Physical Review Letters***1987**, *58*, 2224.
- (68) Lösche, M.; Sackmann, E.; Möhwald, H. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie***1983**, *87*, 848.
- (69) Peters, R.; Beck, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences***1983**, *80*, 7183.
- (70) Ohler, B.; Revenko, I.; Husted, C. *Journal of Structural Biology***2001**, *133*, 1.
- (71) Ariga, K.; Kunitake, T.; Furuta, H. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1996**, 667.
- (72) Pazinato, J.; Hoffmeister, D. M.; Naidek, K. P.; Westphal, E.; Gallardo, H.; Winnischofer, H. *Electrochimica Acta***2015**, *153*, 574.
- (73) Naidek, K. P.; Hoffmeister, D. M.; Pazinato, J.; Westphal, E.; Gallardo, H.; Nakamura, M.; Araki, K.; Toma, H. E.; Winnischofer, H. *European Journal of Inorganic Chemistry***2014**, *2014*, 1150.
- (74) Stefaniu, C.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. *Advances in Colloid and Interface Science***2014**, *208*, 197.
- (75) Als-Nielsen, J.; Jacquemain, D.; Kjaer, K.; Leveiller, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *Physics Reports***1994**, *246*, 251.
- (76) Lepère, M.; Chevillard, C.; Brezesinski, G.; Goldmann, M.; Guenoun, P. *Angewandte Chemie International Edition***2009**, *48*, 5005.
- (77) Luckey, M.; Hernandez, J.-F.; Arlaud, G.; Forsyth, V. T.; Ruigrok, R. W. H.; Mitraki, A. *FEBS Letters***2000**, *468*, 23.
- (78) Zhou, X.-L.; Chen, S.-H. *Physics Reports***1995**, *257*, 223.
- (79) Bauer, M.; Fajolles, C.; Charitat, T.; Wacklin, H.; Daillant, J. *The Journal of Physical Chemistry B***2011**, *115*, 15263.
- (80) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *Journal of Molecular Biology***1965**, *13*, 238.
- (81) Cullis, P. R.; De Kruijff, B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes***1979**, *559*, 399.
- (82) Papahadjopoulos, D.; Watkins, J. C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***1967**, *135*, 639.
- (83) Luna, E. J.; McConnell, H. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***1977**, *466*, 381.
- (84) Carrión, F. J.; De La Maza, A.; Parra, J. L. *Journal of Colloid and Interface Science***1994**, *164*, 78.
- (85) Nacka, F.; Cansell, M.; Entressangles, B. *Lipids***2001**, *36*, 35.
- (86) I. Martin, J. R. *Bioscience Reports***2000**, *20*, 483.
- (87) Zimmerberg, J. C., Leonid V. *Advanced Drug Delivery Reviews***1999**, *38*, 197.
- (88) Chernomordik, L. V.; Kozlov, M. M. *Cell***2005**, *123*, 375.
- (89) Hoekstra, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***1982**, *692*, 171.
- (90) Aurélien Lorin, C. F., Annick Thomas, Robert Brasseur *Biotechnol. Agron. Soc. Environ***2004**, *8*, 163.
- (91) Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F. C. *Biochemistry***1985**, *24*, 3099.
- (92) Hoekstra, D.; De Boer, T.; Klappe, K.; Wilschut, J. *Biochemistry***1984**, *23*, 5675.
- (93) Mingeot-Leclercq, M.-P.; Lins, L.; Bensliman, M.; Thomas, A.; Van Bambeke, F.; Peuvot, J.; Schanck, A.; Brasseur, R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***2003**, *1609*, 28.
- (94) Van Bambeke, F.; Tulkens, P. M.; Brasseur, R.; Mingeot-Leclercq, M.-P. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology***1995**, *289*, 321.
- (95) Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry***1979**, *18*, 3075.
- (96) Parasassi, T.; De Stasio, G.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. *Biophysical Journal***1991**, *60*, 179.
- (97) Fadel, O.; El Kirat, K.; Morandat, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***2011**, *1808*, 2973.

- (98) Azouzi, S.; Morandat, S.; El Kirat, K. *Langmuir***2011**, *27*, 9465.
- (99) Kumar, S.; Bhargava, P.; Sreekanth, V.; Bajaj, A. *Journal of Colloid and Interface Science***2015**, *448*, 398.
- (100) Castellana, E. T.; Cremer, P. S. *Surface Science Reports***2006**, *61*, 429.
- (101) Yang, T.; Baryshnikova, O. K.; Mao, H.; Holden, M. A.; Cremer, P. S. *Journal of the American Chemical Society***2003**, *125*, 4779.
- (102) Xu, L.; Frederik, P.; Pirollo, K. F.; Tang, W.-H.; Rait, A.; Xiang, L.-M.; Huang, W.; Cruz, I.; Yin, Y.; Chang, E. H. *Human Gene Therapy***2002**, *13*, 469.
- (103) Stoddart, A.; Dykstra, M. L.; Brown, B. K.; Song, W.; Pierce, S. K.; Brodsky, F. M. *Immunity***2002**, *17*, 451.
- (104) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. *Biophysical Journal***1985**, *47*, 105.
- (105) El Kirat, K.; Morandat, S.; Dufrêne, Y. F. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***2010**, *1798*, 750.
- (106) Vié, V.; Van Mau, N.; Lesniewska, E.; Goudonnet, J. P.; Heitz, F.; Le Grimellec, C. *Langmuir***1998**, *14*, 4574.
- (107) Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. *Langmuir***2006**, *22*, 3497.
- (108) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir***2000**, *16*, 1806.
- (109) Kalb, E.; Frey, S.; Tamm, L. K. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***1992**, *1103*, 307.
- (110) Frisken, B. J.; Asman, C.; Patty, P. J. *Langmuir***2000**, *16*, 928.
- (111) Barenholz, Y.; Gibbes, D.; Litman, B. J.; Goll, J.; Thompson, T. E.; Carlson, F. D. *Biochemistry***1977**, *16*, 2806.
- (112) Roessner, C. A.; Struck, D. K.; Ihler, G. M. *Journal of Biological Chemistry***1983**, *258*, 643.
- (113) Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. *Langmuir***2003**, *19*, 1681.
- (114) Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. *Biophysical Journal***2002**, *83*, 3371.
- (115) Crane, J. M.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. *Langmuir***2005**, *21*, 1377.
- (116) Bagatolli, L. A.; Ipsen, J. H.; Simonsen, A. C.; Mouritsen, O. G. *Progress in Lipid Research***2010**, *49*, 378.
- (117) Garcia-Manyes, S.; Sanz, F. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes***2010**, *1798*, 741.
- (118) Morandat, S.; Azouzi, S.; Beauvais, E.; Mastouri, A.; El Kirat, K. *Anal Bioanal Chem***2013**, *405*, 1445.
- (119) Bonnet, V.; Gervaise, C.; Djedaïni-Pilard, F.; Furlan, A.; Sarazin, C. *Drug Discovery Today*.
- (120) Curt, F. J.-P., Devissaguet; Francis, Puisieux; Curt, Thies 1992; Vol. 5 118 528.
- (121) Choïnard, L.; Gèze, A.; Yaméogo, B. G. J.; Putaux, J. L.; Wouessidjewe, D. *International Journal of Pharmaceutics***2007**, *344*, 26.
- (122) Skiba, M.; Duchêne, D.; Puisieux, F.; Wouessidjewe, D. *International Journal of Pharmaceutics***1996**, *129*, 113.
- (123) Lemos-Senna, E.; Wouessidjewe, D.; Lesieur, S.; Duchêne, D. *International Journal of Pharmaceutics***1998**, *170*, 119.
- (124) Duchêne, D.; Ponchel, G.; Wouessidjewe, D. *Advanced Drug Delivery Reviews***1999**, *36*, 29.
- (125) Instruments, M. 2011, p 1.
- (126) Maxit, B. In *CORDOUAN Technologies* 2008.
- (127) Instrument, M. **2011**, 1.
- (128) Yaméogo, J. B. G.; Gèze, A.; Choïnard, L.; Putaux, J.-L.; Gansané, A.; Sirima, S. B.; Semdé, R.; Wouessidjewe, D. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***2012**, *80*, 508.

- (129) Yaméogo, J. B. G.; Gèze, A.; Choisnard, L.; Putaux, J.-L.; Mazet, R.; Passirani, C.; Keramidis, M.; Coll, J.-L.; Lautram, N.; Bejaud, J.; Semdé, R.; Wouessidjewe, D. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***2014**, *88*, 683.
- (130) Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; Ponchel, G. *Journal of Controlled Release***1999**, *62*, 263.
- (131) Ponthieu, S. *Intensité, volume et nombre en DLS et nouvelle théorie du potentiel zêta*, Malvern instrument, 2009.
- (132) Díaz-Moscoso, A.; Guilloteau, N.; Bienvenu, C.; Méndez-Ardoy, A.; Jiménez Blanco, J. L.; Benito, J. M.; Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Defaye, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Biomaterials***2011**, *32*, 7263.
- (133) Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Dubes, A.; Parrot-Lopez, H.; Fessi, H. *International Journal of Pharmaceutics***2008**, *351*, 289.
- (134) Gèze, A.; Choisnard, L.; Putaux, J. L.; Wouessidjewe, D. *Materials Science and Engineering: C***2009**, *29*, 458.
- (135) Ansell, P. *Why STEM Not TEM?*, Hitachi Scientific Instruments.
- (136) Ringard-Lefebvre, C.; Bochet, A.; Memisoğlu, E.; Charon, D.; Duchêne, D.; Baszkin, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***2002**, *25*, 109.
- (137) Bienvenu, C.; Martinez, A.; Jimenez Blanco, J. L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Ortiz Mellet, C.; Defaye, J.; Garcia Fernandez, J. M. *Organic & Biomolecular Chemistry***2012**, *10*, 5570.
- (138) Vandenhoute, E., Université d'Artois, 2011.
- (139) Armulik, A.; Genové, G.; Betsholtz, C. *Developmental Cell***2011**, *21*, 193.
- (140) Fenstermacher, J.; Gross, P.; Sposito, N.; Acuff, V.; Pettersen, S.; Gruber, K. *Annals of the New York Academy of Sciences***1988**, *529*, 21.
- (141) Pardridge, W. M. *Isolated brain capillaries : an in vitro model of blood-brain barrier research* New York, 1998.
- (142) Reichel, A.; Begley, D. *Pharm Res***1998**, *15*, 1270.
- (143) Malakoutikhah, M.; Teixidó, M.; Giralt, E. *Journal of Medicinal Chemistry***2008**, *51*, 4881.
- (144) Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. *European Journal of Medicinal Chemistry***2003**, *38*, 223.
- (145) Mayer, S.; Maickel, R. P.; Brodie, B. B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***1959**, *127*, 205.
- (146) Oldendorf, W. H. *Brain Research***1970**, *24*, 372.
- (147) Aasmundstad, T. A.; Mørland, J.; Paulsen, R. E. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***1995**, *275*, 435.
- (148) Iqbal, U. A., A.; Stanimirovic, D. B *Integrated platform for brain imaging and drug delivery across the blood-brain barrier*, 2011; Vol. 686.
- (149) Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R. *Journal of the Chemical Society (Resumed)***1945**, 660.
- (150) Mével, M.; Montier, T.; Lamarche, F.; Delépine, P.; Le Gall, T.; Yaouanc, J. J.; Jaffrès, P. A.; Cartier, D.; Lehn, P.; Clément, J. C. *Bioconjugate chemistry***2007**, *18*, 1604.
- (151) Mevel, M.; Neveu, C.; Goncalves, C.; Yaouanc, J.-J.; Pichon, C.; Jaffres, P.-A.; Midoux, P. *Chemical Communications***2008**, 3124.
- (152) Troev, K.; Kirilov, E. M. G.; Roundhill, D. M. *Bulletin of the Chemical Society of Japan***1990**, *63*, 1284.
- (153) Djedaini-Pilard, F.; Azaroual-Bellanger, N.; Gosnat, M.; Vernet, D.; Perly, B. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1995**, 723.
- (154) Palin, R.; Grove, S. J. A.; Prosser, A. B.; Zhang, M.-Q. *Tetrahedron Letters***2001**, *42*, 8897.
- (155) Marsh, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes***1996**, *1286*, 183.

- (156) Ambike, A.; Rosilio, V. r.; Stella, B.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Couvreur, P. *Langmuir***2011**, 27, 4891.
- (157) Vila-Romeu, N.; Nieto-Suárez, M.; Broniatowski, M. *Thin Solid Films***2008**, 516, 8852.
- (158) Benistant, C.; Dehouck, M. P.; Fruchart, J. C.; Cecchelli, R.; Lagarde, M. *Journal of lipid research***1995**, 36, 2311.
- (159) Lichtenberg, D.; Goñi, F. M.; Heerklotz, H. *Trends in Biochemical Sciences***2005**, 30, 430.
- (160) Mereghetti, P.; Corsetto, P. A.; Cremona, A.; Rizzo, A. M.; Doglia, S. M.; Ami, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects***2014**, 1840, 3115.
- (161) Pike, L. J. *The Biochemical journal***2004**, 378, 281.
- (162) Simons, K.; Vaz, W. L. C. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure***2004**, 33, 269.
- (163) Sowa, G. *Frontiers in Physiology***2012**, 2.
- (164) S. A. Sanchez, M. A. T., G. Gunther and E. Gratton *Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope*; Modern Research and Educational Topics in Microscopy. A. Méndez-Vilas and J. Diaz, 2007.
- (165) Rinia, H. A.; Kik, R. A.; Demel, R. A.; Snel, M. M. E.; Killian, J. A.; van der Eerden, J. P. J. M.; de Kruijff, B. *Biochemistry***2000**, 39, 5852.
- (166) Ben de Kruijff, J. A. K., Dragomir N. Ganchev, Hilde A. Rinia and Emma Sparr *Biological Chemistry***2006**, 387, 235.
- (167) Kaasgaard, T.; Leidy, C.; Crowe, J. H.; Mouritsen, O. G.; Jørgensen, K. *Biophysical Journal***2003**, 85, 350.
- (168) Leidy, C.; Kaasgaard, T.; Crowe, J. H.; Mouritsen, O. G.; Jørgensen, K. *Biophysical Journal***2002**, 83, 2625.
- (169) Akesson, A.; Lind, T.; Ehrlich, N.; Stamou, D.; Wacklin, H.; Cardenas, M. *Soft Matter***2012**, 8, 5658.
- (170) Roux, M.; Moutard, S.; Perly, B.; Djedaini-Pilard, F. *Biophysical Journal***2007**, 93, 1620.
- (171) Roux, M.; Sternin, E.; Bonnet, V.; Fajolles, C.; Djedaíni-Pilard, F. *Langmuir***2013**, 29, 3677.
- (172) Cecchelli, R.; Dehouck, B.; Descamps, L.; Fenart, L.; Buée-Scherrer, V.; Duhem, C.; Lundquist, S.; Rentfel, M.; Torpier, G.; Dehouck, M. P. *Advanced Drug Delivery Reviews***1999**, 36, 165.
- (173) Carone, D.; Librizzi, L.; Cattalini, A.; Sala, G.; Conti, E.; Cuccione, E.; Versace, A.; Cai, R.; Monza, L.; de Curtis, M.; Ferrarese, C.; Beretta, S. *Brain Research***2015**, 1615, 31.
- (174) Li, Y.; He, H.; Jia, X.; Lu, W.-L.; Lou, J.; Wei, Y. *Biomaterials***2012**, 33, 3899.

Résumé :

La mise au point de formulation permettant la vectorisation de principes actifs est primordiale afin d'augmenter l'efficacité de délivrance de médicaments à travers les barrières biologiques. Pour cela, des cyclodextrines amphiphiles ayant la capacité de former des nanoparticules et d'encapsuler des principes actifs ont été synthétisées suivant une voie de synthèse convergente permettant l'accès à de grandes quantités de produits finaux avec une pureté excellente. Leur toxicité à l'égard des membranes biologiques et leur capacité de transport ont été évalués en utilisant un modèle in vitro de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). La BHE constitue un modèle de choix car c'est une barrière biologique très sélective ne laissant passer que très peu de principes actifs dont l'Atazanavir choisi pour cette étude. La librairie de Phosphoramidyls Cyclodextrines synthétisée a permis de réaliser une étude quant à l'influence de la structure de la molécule sur les propriétés tensioactives, d'encapsulation ou encore d'interaction avec des membranes biomimétiques. Cette étude a permis de sélectionner deux composés ayant montrés de bonnes capacités à interagir avec les membranes biomimétiques et ils ont montré leur capacité à faire de la délivrance de médicaments en internalisant l'Atazanavir dans les cellules endothéliales de la BHE.

Mots clefs : Cyclodextrines amphiphiles, nanovecteurs, BHE, monocouches de Langmuir, fusogénicité.

Abstract:

The development of formulation allowing the drug delivery is essential to increase the efficiency of drugs through the biological barriers. For that purpose, amphiphilic cyclodextrins having the capacity to form nanoparticles and entrap active principles was synthesized according to a way of convergent synthesis allowing the access to big quantities of final products with an excellent purity. Their toxicity towards the biological membranes and their transport capacity were estimated using an in vitro model of the Blood Brain Barrier (BBB). The BBB constitutes a model of choice because it is a very selective biological barrier allowing to pass only very few active principles of which Atazanavir chosen for this study. The library of synthesized Phosphoramidyls Cyclodextrins allowed realizing a study as for the influence of the structure on the surfactant properties, the entrapment or still the interaction with biomimetic membranes. This study allowed selecting two compounds having shown of good abilities to interact with the biomimetic membranes and they showed their capacity to make some delivery of medicine by internalizing Atazanavir in endothelial cells of the BBB.

Keywords : amphiphilic cyclodextrins, nanocarriers, BBB, Langmuir monolayer, fusogenicity.