



HAL
open science

Conception de composés amphiphiles, études physico-chimiques et applications en transfection

Amal Bouraoui

► **To cite this version:**

Amal Bouraoui. Conception de composés amphiphiles, études physico-chimiques et applications en transfection. Chimie thérapeutique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0069 . tel-04614175

HAL Id: tel-04614175

<https://theses.hal.science/tel-04614175>

Submitted on 17 Jun 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : Chimie moléculaire et macromoléculaire

Par

Amal BOURAOUI

Conception de composés amphiphiles, études physico-chimiques et applications en transfection

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 27 novembre 2019

Unité de recherche : UMR CNRS 6521

Rapporteurs avant soutenance :

Jean Paul DOULIEZ Directeur de recherche INRA

Michele FIORE Maître de conférences Université de Lyon

Composition du Jury :

Président : Jean-Paul DOULIEZ Directeur de recherche, INRA

Examineurs : Véronique VIE Maître de conférences, Université de Rennes 1
 Michèle FIORE Maître de conférences, Université de Lyon

Dir. de thèse : Paul-Alain JAFFRES Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Co-dir. de thèse : Mathieu BERCHEL Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Invité(s)

Tristan MONTIER Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Laure DESCHAMPS Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

“Most of the important things in the world have been accomplished by people who have kept on trying when there seemed to be no hope at all “

Dale Carnegie

Acknowledgements

This work was done at the University of Brest France at the « Chimie, Electrochimie Moléculaire et Chimie Analytique (CEMCA, UMR CNRS 6521) » laboratories.

Firstly, I would like to start by expressing my sincere gratitude to my supervisor Pr Paul-Alain Jaffrès, Professor at the university of Brest. I would like to thank him for his patience, immense knowledge and precious advice throughout this work. Without his guidance and his feedback this PhD would not have been achievable.

I also would like to thank Dr Mathieu Berchel, Assistant Professor at the University of Brest and my co-supervisor. Thank you for always pushing me to do better. I'm extremely grateful for your motivation and your patience. You made these three years a very enjoyable and colorful journey and for that I will always be thankful.

My sincere thanks go to Dr Jean-Paul Douliez, Director of the National Institute of Agricultural Research (INRA), and Dr Michele Fiore, Assistant Professor at the University of Lyon, for accepting to judge my work.

I'm extremely thankful to Dr Véronique Vié, Assistant Professor at the University of Rennes I for welcoming me in her laboratory three times during my PhD to conduct the compression isotherm experiments. I'm deeply grateful for her patience and for her availability each time I needed advice. A special thank you to Gilles Paboeuf from the university of Rennes I for his advice and for always making sure that the experiments are going smoothly.

I would like to express my sincere gratitude to Pr Tristan Montier from the University of Brest as well as all the members of his team, in particular Rosy Ghanem, Yann le Guen and François Légeard for all the biology experiments they have done throughout this work. It has been a true honor to be collaborating with you.

Many thanks to Dr Laure Burel-Deschamps, Assistant Professor at the University of Brest for giving me the opportunity to do some of the fluorescence anisotropy experiments in her laboratory. I'm sincerely thankful for her motivation to do the experiments and for her good humor, it has been a true pleasure to work with you.

A special thank you to Dr Hèlène Couthon, Assitant Professor at the University of Brest, for her sense of humor and positive energy.

My deep appreciation goes to Dr Stéphane Cerantola and Dr Gaele Simon for the NMR analysis.

I'm also very grateful to Pr Vincent Frrière form the University of Rennes I and Pr Françoise Conan from the University of Brest, members of my Individual Monitoring committee.

A special thanks to Marie Leroy, Julie Jafrée, Marlène Morrera, Gweanélle Bernard, Paul le Garff and Romain Fouinneteau, the L3 students for their motivation and hard work during their time in the lab.

To Olivier, Sylvie, Anne and Wilfried thank you for all the funny moments spent talking in the office it was a real pleasure getting to know you.

A special thank you to the PhD students I got to know during these last three years. Mame, Salma, Stephanie, Asma, Idil and of course Montassar and Alicia with whom I shared the office during my time in the lab.

To all the roommates I got since I've been to France: Thierno, Mariama, Kourouma, Fanny, Lucie, Magali, Pasilione, Shaimae, Nourhene, living with you was an absolute pleasure. I've learned a lot from each and every one of you.

To Benoit thank you for being one of the nicest people I have met, your kind words and your sense of humor got me through some difficult times.

To Samuel you were the one who kept pushing me to work hard and for that I will always be grateful.

A special thank you to all my friends and family back in Tunisia, Belgium and the US I'm extremely grateful for your support.

To Bochra I can't find the words to express how grateful I'm for getting to know you, thank you for all the times we spent talking about anything and everything. Thank you for giving me the best gift ever, and most of all thank you for being you.

To my brother Hsin thank you for being always there to cheer me up when things are difficult, to my sister Ferial the happiest person on planet earth. To my father Hatem thank you for giving me the best life ever and finally to my mother Fatma none of this could have been done without you, you are my rock, you are my inspiration, everything I'm today is due to you. To all my family you are the reason of my existence and this work is dedicated to you.

<i>Liste des abréviations et acronymes</i>	<i>15</i>
<i>Introduction Générale</i>	<i>17</i>
<i>Chapitre 1 : Étude Bibliographique</i>	<i>19</i>
<i>I. La thérapie génique.....</i>	<i>21</i>
1. Les méthodes physiques	24
2. Les agents de vectorisation	25
3. Mode d'action des amphiphiles cationiques.....	31
4. Évolution des lipides cationiques	35
5. Évolution des lipides cationiques synthétisées au laboratoire	40
<i>II. Les réactions thiol-ène</i>	<i>45</i>
1. Réaction thiol-Michael	46
2. Réaction thiol-ène (radicalaire)	47
3. Application de la réaction thiol-ène	49
<i>III. Objectifs de la thèse.....</i>	<i>52</i>
<i>Chapitre 2 : Lipides cationiques contenant une fonction thioéther par chaîne lipidique : Synthèse, caractérisation et étude des propriétés physico-chimiques et de transfection... 57</i>	
<i>I. Introduction</i>	<i>59</i>
<i>II. Étude bibliographique</i>	<i>61</i>
<i>III. Synthèse de lipophosphoramides contenant une seule fonction thioéther par chaîne lipidique.....</i>	<i>65</i>
1. Synthèse du phosphite.....	66
2. Couplage Atherton-Todd.....	68
3. Quaternarisation.....	68
4. Réaction thiol-ène.....	69
5. Synthèse des composés de référence	71

IV. Présentation des différentes techniques physico-chimiques et de transfection utilisées	72
1. Préparation et caractérisation des solutions liposomales.	72
2. Méthode permettant le contrôle de la taille des liposomes.....	74
3. Caractérisation des solutions liposomales par DLS	75
4. Détermination du potentiel zêta	76
5. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC).....	77
6. Anisotropie de fluorescence.....	79
7. Isothermes de Compression et ellipsométrie.....	81
8. RMN du Phosphore des composés amphiphiles en milieu organisé pour la détermination de la nature des assemblages supramoléculaires.....	83
9. Test de complexation de l'ADN sur gel d'agarose	85
10. Évaluation des propriétés de transfection des lipides cationiques.....	85
11. Évaluation de la viabilité cellulaire	86
IV. Étude des propriétés physico-chimiques des lipides cationiques synthétisés	87
1. Détermination de la concentration d'agrégation critique	87
2. Anisotropie de fluorescence.....	88
3. Isothermes de compression	90
4. Détermination de l'épaisseur de la monocouche par ellipsométrie	93
5. Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par la RMN ³¹ P en milieu organisé.....	95
6. Préparation et caractérisation des solutions liposomales	97
7. Détermination de la taille et du potentiel Zêta des lipoplexes	99
8. Tests de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	101
9. Évaluation des propriétés de transfection <i>in-vitro</i>	102
10. Évaluation de la Viabilité cellulaire.....	104
V. Conclusion et perspectives	107

VI. Partie expérimentale	109
<i>Chapitre 3 : Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques de nouveaux lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique.....</i>	
	116
I. Introduction et étude bibliographique	118
II. Synthèse des lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique.....	121
1. Préparation des chaînes lipidiques comportant deux fonctions thioéthers.	122
2. Préparation du phosphite	124
3. Synthèse des phosphoramides	124
4. Obtention des sels d'ammonium.....	125
III. Détermination des propriétés physico-chimiques des lipides cationiques	125
1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC).....	125
2. Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par les tests d'anisotropie de fluorescence.....	126
3. Isothermes de compression	128
4. Ellipsométrie.....	130
IV. Études des propriétés de transfection des nouveaux phosphoramides contenant deux fonctions thioéthers par chaîne alkyle.	132
1. Détermination de la taille et du potentiel zêta des amphiphiles cationiques	132
2. Détermination de la taille et du potentiel zêta des lipoplexes	133
3. Test de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	134
4. Évaluation des propriétés de transfection <i>in vitro</i>	135
5. Évaluation de la viabilité cellulaire	137
V. Conclusion et perspectives	138
VI. Partie expérimentale	140
<i>Chapitre 4 : Synthèse d'amphiphiles cationiques comportant des chaînes lipidiques ramifiées. Études des propriétés physico-chimiques et application pour la transfection..</i>	
	147

I.	<i>Introduction</i>	149
II.	<i>Étude bibliographique</i>	149
III.	<i>Synthèse et étude d'amphiphiles cationiques ramifiées à têtes polaires différentes</i> 157	
1.	Synthèse du phosphite.....	157
2.	Couplage Atherton-Todd.....	158
3.	Quaternarisation des phosphoramides	160
IV.	<i>Étude des propriétés physico chimiques des nouveaux lipides cationiques</i>	162
1.	Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC).....	162
2.	Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par anisotropie de fluorescence	163
3.	Isothermes de compression	164
4.	Ellipsométrie.....	166
5.	Détermination de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ³¹ P en milieu organisé .	168
V.	<i>Études des propriétés de transfection des lipides cationiques</i>	169
1.	Mesure de la taille et du potentiel zêta des solutions liposomales	169
2.	Test de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	170
3.	Étude de l'efficacité de transfection <i>in-vitro</i>	171
4.	Étude de la viabilité cellulaire	173
VI.	<i>Synthèse de lipides cationiques ramifiés à chaînes plus longues</i>	177
VII.	<i>Étude des propriétés physico-chimiques des phosphoramidates synthétisés</i>	178
1.	Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC).....	178
2.	Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par anisotropie de fluorescence	178
3.	Isothermes de compression	179
4.	Ellipsométrie.....	180
5.	Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par ³¹ P en milieu organisé	181

VIII.	<i>Étude des propriétés de transfection et de la viabilité cellulaire</i>	182
1.	Préparation de solution liposomales	182
2.	Étude des propriétés de transfection des nouveaux vecteurs	182
3.	Évaluation de la viabilité cellulaire	183
IX.	<i>Conclusion et perspectives</i>	184
X.	<i>Partie expérimentale</i>	186
	<i>Chapitre 5 : Conception d'amphiphiles et bola-amphiphiles multipolaires</i>	193
I.	<i>Introduction</i>	195
II.	<i>Synthèse de molécules amphiphiles à tête polaire dendritique (stratégie A).</i>	196
1.	Synthèse	198
2.	Préparation de l'amine.....	199
3.	Synthèse du phosphite.....	201
4.	Couplage Atherton-Todd.....	201
5.	Réaction thiol-ène.....	202
III.	<i>Étude des propriétés physico-chimiques</i>	205
1.	Isothermes de compressions	205
2.	Ellipsométrie.....	207
3.	Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ³¹ P en milieu organisé	208
IV.	<i>Évaluation des propriétés de transfusions du composé BSV200</i>	209
1.	Détermination de la taille et du potentiel zêta des solutions liposomales	209
2.	Étude des propriétés de transfection.....	210
3.	Évaluation de la viabilité cellulaire	211
V.	<i>Synthèse de lipides cationiques à tête polaire volumineuse par ramification des chaînes lipidiques (stratégie B)</i>	212
1.	Synthèse de l'alcool par métathèse croisée	213

2.	Synthèse du phosphoramidate cationique	214
3.	Réaction thiol-ène.....	215
4.	Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ³¹ P en milieu organisé	216
VI.	<i>Synthèse de bola-amphiphiles.....</i>	218
1.	Préparation de solutions liposomales.....	220
2.	Évaluation de l'efficacité de transfection.....	221
VII.	<i>Conclusion</i>	221
VIII.	<i>Partie expérimentale</i>	222
	<i>Conclusion générale</i>	231

Liste des abréviations et acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
ARN	Acide ribonucléique
BrCCl ₃	Bromure de trichlorure de méthane
BSV	Brest Synthetic Vector
CAC	Concentration d'Agrégation Critique
CR	Charge Ratio
DC-Chol	Chlorure de 3 (N-(N'-N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle)cholestérol
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-Diméthoxy-2-PhénylAcétoPhénone
DOGS	Dioctadécylamine-glycine-spermine
DOPC	Dioléoyl phosphatidyl choline
DOPE	Dioléoyl-phosphatidyléthanolamine
DOSPA	2,3-dioléoxy-N- [2(sperminocarboxamido)éthyl]N,N-diméthyl 1- propanium trifluoroacétate
DOTAP	Méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl](N,N,N-triméthylammonium)
DOTMA	Chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]- N,N,N-triméthylammonium
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MLV	Multilamellar Vesicles
RLU	Relative Light Unit
rt	room temperature
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
si RNA	Small interfering ARN
SUV	Small Unilamellar Vesicles

Introduction Générale

La thérapie génique est une approche thérapeutique prometteuse qui vise à traiter des maladies monogéniques, jusque-là incurables, en apportant des séquences d'acides nucléiques à visée thérapeutique.

Les virus de par leur aptitude naturelle à véhiculer le matériel génétique se sont imposés comme outil de choix pour la vectorisation de ces gènes médicaments. Cependant, l'utilisation des virus présente certains inconvénients liés à des problèmes d'immunogénicité ou encore au coût et à la difficulté de production.

La communauté scientifique s'est alors intéressée à la conception de nouveaux agents de vectorisation synthétiques capables d'assurer le même rôle que les virus. Les amphiphiles cationiques s'intègrent dans cette famille de vecteurs synthétiques. Ces molécules, bien qu'elles soient plus simples à produire, ne sont pas aussi efficaces que les vecteurs viraux. Le succès de la thérapie génique non-virale nécessite alors une étude approfondie permettant de cibler les éléments de structure afin d'améliorer la capacité de ces agents de vectorisation à transfecter les cellules.

Depuis des années notre équipe s'intéresse à la conception de phospholipides bio-inspirés pour des applications en thérapie génique.

Ces travaux de thèse ont consisté à la synthèse de 4 nouvelles catégories de lipides cationiques en apportant des modifications sur les parties hydrophobes et hydrophiles de ces amphiphiles.

Ce manuscrit sera divisé en cinq parties principales

- En premier lieu, une étude bibliographique où seront abordés les principes de la thérapie génique.
- La deuxième partie de ce travail sera consacré à l'élaboration de nouveaux amphiphiles cationiques comportant une fonction thioéther par chaîne lipidique.
- Le troisième chapitre portera sur la synthèse de trois nouvelles molécules amphiphiles comportant deux fonctions thioéther par chaîne grasse.

- La quatrième partie sera consacrée à la conception de nouveaux phospholipides cationiques formés par des chaînes hydrophobes ramifiées.
- Le cinquième et dernier chapitre portera sur la synthèse de molécules amphiphiles multipolaires.

Chaque chapitre sera complété par l'étude des propriétés de transfection et des propriétés physico-chimiques des nouveaux vecteurs synthétisés.

Chapitre 1 : Étude Bibliographique

II. La thérapie génique

Depuis quelques années les biotechnologies ont commencé à prendre une place de plus en plus importante dans le domaine de la recherche médicale. L'objectif étant de développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour prévenir ou traiter toutes sortes de maladies. Parmi ces nouvelles stratégies s'inscrit la thérapie génique. Ce concept développé au milieu du XX^{ème} siècle consiste à utiliser des séquences d'acide nucléiques (ADN ou ARN) à des fins thérapeutiques (*Figure 1*).

En théorie, le principe de thérapie génique est simple. Il consiste à transférer un gène thérapeutique aux cellules. Ces séquences d'acides nucléiques sont utilisées pour produire, grâce à la machinerie cellulaire, de nouvelles protéines fonctionnelles. Ces dernières permettront soit de compenser la déficience ou le dysfonctionnement d'un gène, soit d'apporter une nouvelle fonction à la cellule dans un but thérapeutique ou préventif.

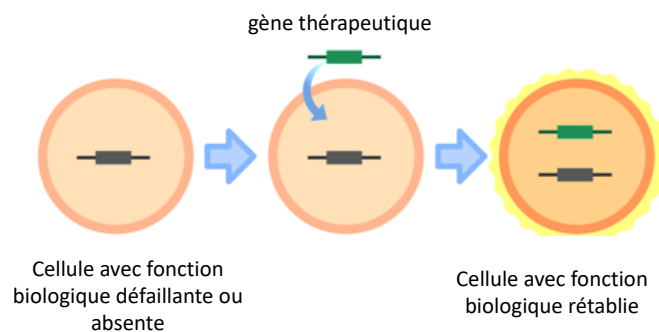


Figure 1 : Principe de la thérapie génique

La thérapie génique permet alors de s'attaquer à l'origine de certaines maladies pour les résoudre efficacement. En effet, les maladies monogéniques ont pour origine la présence d'un gène défectueux. En apportant un gène codant pour la protéine d'intérêt il serait alors possible d'apporter une réponse thérapeutique.

Grâce à la thérapie génique nous pouvons donc espérer non seulement traiter des maladies d'origine monogénique comme la mucoviscidose^{1,2} ou la dystrophie musculaire de Duchenne

¹ J. Rosenecker, S. Huth, C. Rudolph, *Curr Opin Mol Ther.* **2006**, 8, 439-445.

² N. J. Caplen, E.W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelle, *Nat Med*, **1995**, 1, 39-46.

³ mais aussi des maladies acquises telles que certains cancers ⁴ ou des maladies neurodégénératives comme Alzheimer ⁵. Cependant, la grande majorité d'essais cliniques en thérapie génique vise à traiter des maladies acquises, en particulier les cancers, comme le montrent les dernières statistiques (*Figure 2*).

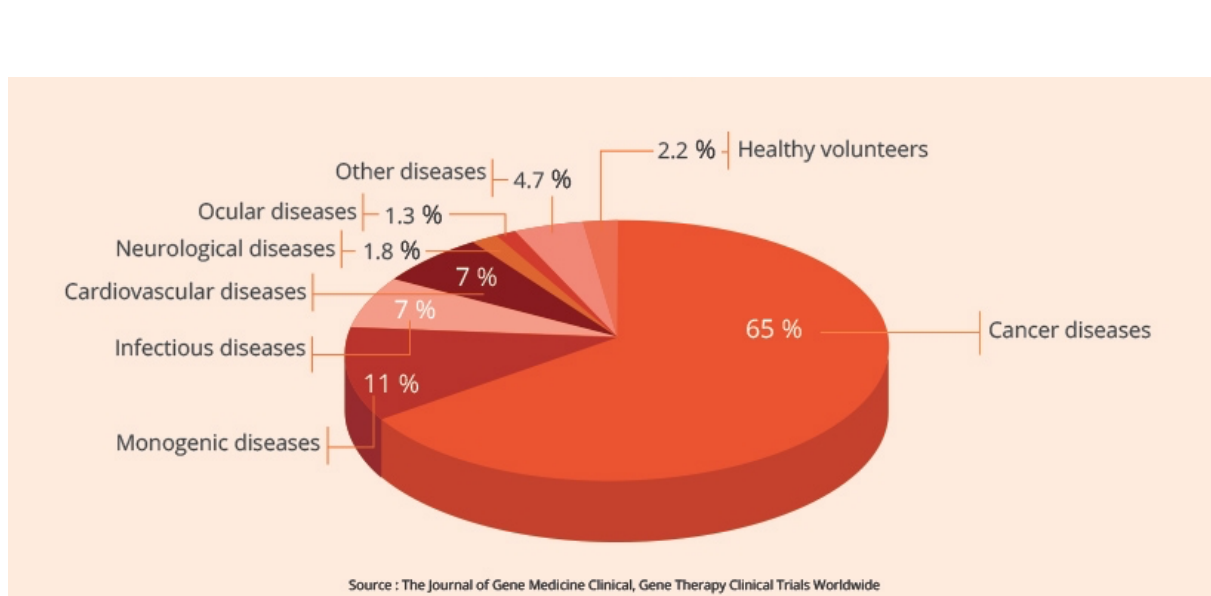


Figure 2 : Répartition des essais cliniques par cible thérapeutique entre 1989 et 2017 ⁶

Historiquement, l'idée de thérapie génique a commencé à émerger dans les années 1960, dès qu'il est devenu possible de localiser les gènes pathologiques. Sa mise en pratique n'a cependant débuté qu'à partir des années 70, avec la préparation du premier vecteur viral par Berg *et al* ⁷. Les premiers succès de transfert de gènes chez les animaux ont vu le jour en 1980 avec le développement des premiers vecteurs rétrovirus⁸.

Les premiers essais cliniques ont eu lieu en 1990 avec Blaese et ses collaborateurs qui ont réussi à traiter une patiente atteinte d'un déficit immunitaire sévère, caractérisé par l'absence d'adénosine désaminase ⁹.

³ C. Pichavant, A. Aartsma-Rus, P. R. Clemens, K. E. Davies, G. Dickson, S. Takeda, S. D. Wilton, J. A. Wolff, C. I. Wooddell, X. Xiao, J. P. Tremblay, *Mol Ther*, **2011**, 19, 830–840.

⁴ J. A. Roth, R. J. Cristiano, *J Natl Cancer Inst*, **1997**, 89, 21-39.

⁵ S. Alves, R. Fol, N. Cartier, *Hum Gene Ther*, **2016**, 27, 100-107.

⁶ Gene Therapy : <https://www.inserm.fr/en/health-information/health-and-research-from-z/gene-therapy> consulté le 01/10/2019

⁷ D. A. Jackson, R. H. Symons, P. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1972**, 69, 2904–2909.

⁸ R. E. Hammer, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, *Nature*, **1984**, 311, 65–67.

⁹ K.W. Culver, W. F. Anderson, R. M. Blaese, *Hum. Gene Ther*, **1991**, 2, 107–109.

Fort de ces résultats encourageants, le nombre d'essais cliniques a connu un véritable saut depuis les années 90 comme le montre la figure ci-dessous. Cependant certains événements tragiques comme le décès d'une patiente lors d'un test clinique en 1999¹⁰ où l'apparition de leucémie chez des patients traités pour un déficit immunitaire lié au chromosome X en 2002¹¹ ont freiné l'engouement général de cette nouvelle stratégie thérapeutique.

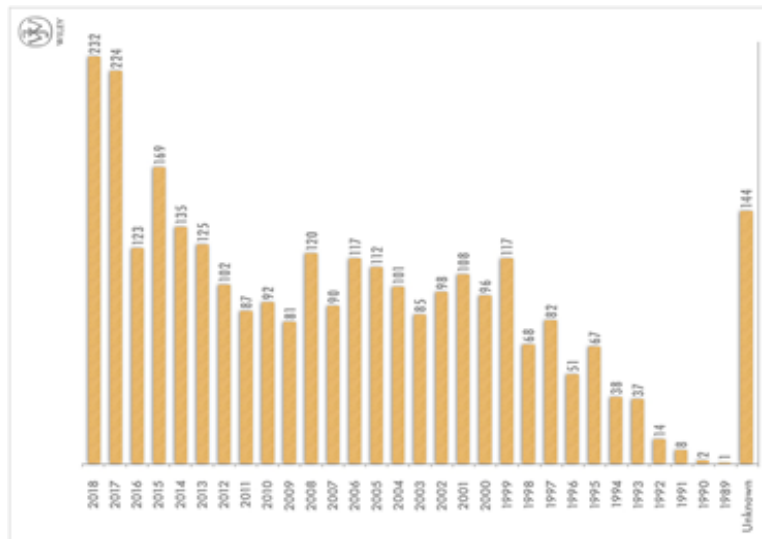


Figure 3 : Évolution de nombre d'essais cliniques de thérapie génique de 1989 à 2018¹²

L'un des succès le plus récent pour la thérapie génique est la mise sur le marché d'un nouveau médicament visant à traiter des cécités rares d'origine génétique suite à une mutation du gène RPE65. Il s'agit du Luxturna développé par Spark Therapeutics aux Etats Unis. Une seule injection de ce traitement dans chaque œil s'est avérée suffisante pour améliorer la vision des patients pour au moins trois ans¹³.

Malgré ce succès incontestable, les divers incidents cités précédemment soulignent l'importance de pouvoir développer une thérapie génique sûre et efficace, non seulement pour éviter d'autre incidents mais aussi pour améliorer l'efficacité de cette technologie et de pouvoir l'élargir à d'autres applications. En effet, la nature polyanionique et hydrophile des molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN), leur inaptitude à franchir les barrières

¹⁰ S. E. Raper, N. Chirmule, F. S. Lee, N. A. Wivel, A. Bagg, G. Gao, J. M. Wilson, M. L. Batshaw, *Mol. Genet. Metab*, **2003**, 80, 148–158.

¹¹ S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, A. N. Fischer, *Engl. J. Med*, **2003**, 348, 255–256.

¹² <http://www.abedia.com/wiley/years.php> consulté le 30 sep 2019.

¹³ E. Smalley, *Nat Biotechnol*, **2017**, 35, 998-999.

cellulaires ainsi que leur biodégradabilité présentent des obstacles majeurs pour le développement de cette thérapie.

Plusieurs techniques ont alors été proposées pour surmonter ces obstacles. Ces techniques peuvent être classées en deux grandes catégories :

- Les méthodes physiques et physico-chimiques
- L'utilisation de systèmes de vectorisation

1. Les méthodes physiques

Ce sont des méthodes dites de transfert direct qui permettent la pénétration des séquences d'ADN, généralement sous forme de plasmides, dans les cellules. Il existe de nos jours une multitude de méthodes physiques qui visent à favoriser l'entrée du gène thérapeutique soit au niveau de l'organe cible, soit dans l'organisme entier. Parmi ces techniques nous pouvons citer :

- **Le canon à ADN** (Gene Gun) : l'ADN, adsorbé sur des nanoparticules métalliques (or ou tungstène), est propulsé à l'aide d'un gaz au niveau des cellules ou tissus cibles ¹⁴.
- **La sonoporation** : c'est un mode de transfection consistant à appliquer des ultrasons afin de perméabiliser les membranes cellulaires et augmenter la pénétration de l'ADN dans les cellules ¹⁵.
- **L'électroporation** : c'est l'utilisation de courtes impulsions d'un champ électrique pour induire une perméabilité transitoire des membranes cellulaires, et faciliter la pénétration des molécules thérapeutiques (ADN, ARN ou principe actif) dans les cellules ¹⁶.

D'autres techniques physiques et physico-chimiques utilisées dans le cadre de thérapies géniques sont présentées sur la *Figure 4*.

¹⁴ C. H. Yang, S. C. Shen, J. C. Lee, P. C. Wu, S. F. Hsueh, C. Y. Lu, C. T. Meng, H. S. Hong, L. C. Yang, *Gene Therapy*, **2004**, 11, 1033–1039.

¹⁵ T. Suda, D. Liu, *Mol. Ther.*, **2007**, 15, 2063-2069.

¹⁶ E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *EMBO J*, **1982**, 1, 841–845.

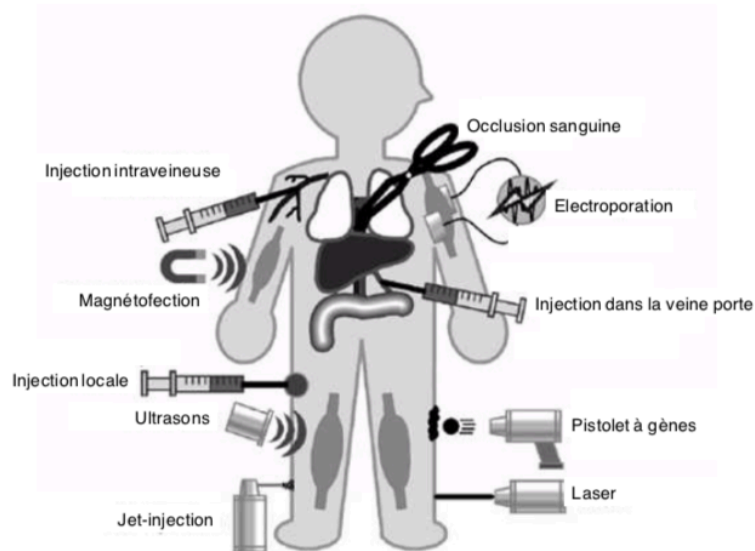


Figure 4 : Principales méthodes physiques utilisées pour le transfert de gènes ¹⁷

2. Les agents de vectorisation

Un autre moyen pour assurer le transfert de l'information génétique jusqu'à leur cible cellulaire est l'utilisation d'agents de vectorisation.

Afin d'être utilisé, un vecteur doit répondre à un certain nombre de critères. Tout d'abord il doit être capable de compacter le gène thérapeutique que l'on cherche à introduire. Ensuite, il doit le protéger face aux différentes sources de dégradation : à la fois extracellulaires, telles que le système immunitaire ou la présence d'enzymes (e.g. nucléases) et intracellulaires, comme les pH acides. Finalement, il doit être capable de pénétrer dans le plus grand nombre de cellules cibles pour assurer l'expression efficace et durable du transgène ^{18, 19}

Ces agents de vectorisation peuvent être classés en deux grandes catégories :

- Les vecteurs viraux « naturels »
- Les vecteurs synthétiques

Actuellement plus de 60 % des essais cliniques en thérapie génique sont effectués avec des vecteurs viraux. Tandis que les vecteurs d'origine synthétique représentent moins de 5% des essais cliniques entre 1989 et 2017 (*Figure 5*).

¹⁷ T. Niidome, L. Huang, Gene Ther, **2002**, 9, 1647– 1652.

¹⁸ Les vecteurs: des outils de la Thérapie Génique: <http://therapiegenique.e-monsite.com/pages/la-therapie-genique/les-vecteurs-des-outils-de-la-therapie-genique-1.html>, consulté le 28/10/2019.

¹⁹ S. Chira, C. S. Jackson, L. Oprea, F. Ozturk, M. S. Pepper, L. Diaconu, C. Braicu, L. Z. Raduly, G. A. Calin, L. Berindan-Neagoe, Oncotarget, **2015**, 6, 30675–30703.

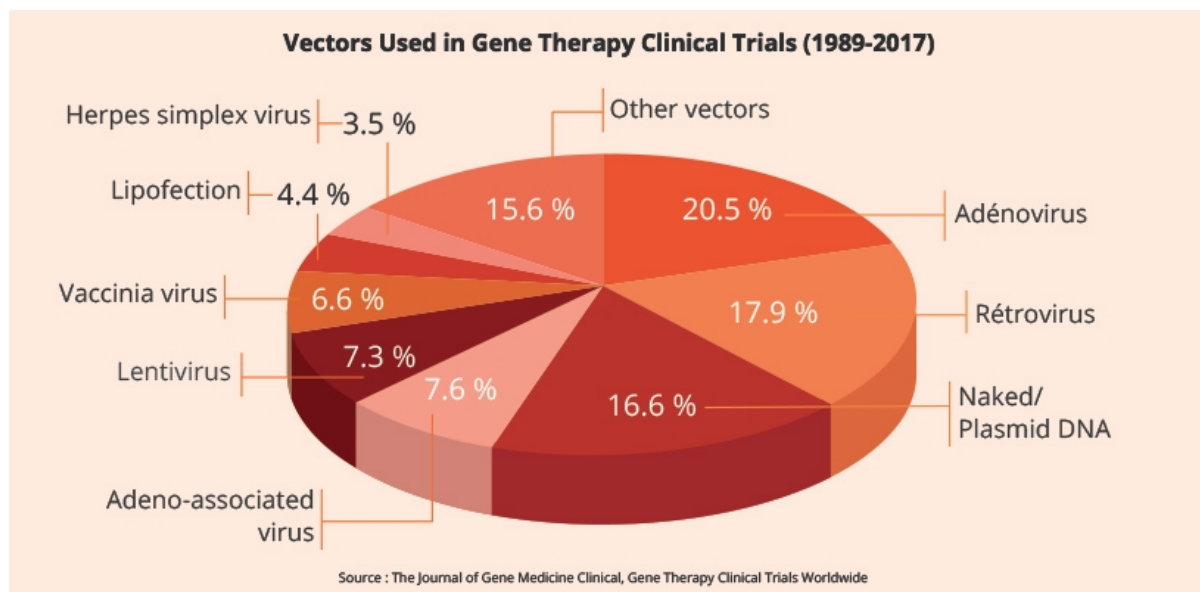


Figure 5: Répartition des vecteurs utilisés en essai clinique ⁶

2.1 Les vecteurs viraux

Les virus ont une prédisposition naturelle qui leur permet d'insérer efficacement leur patrimoine génétique dans les cellules hôtes afin de pérenniser leur cycle infectieux. Les chercheurs ont remarqué des similarités entre le concept de la thérapie génique et la capacité des virus à introduire leur matériel génétique dans les cellules et ils les ont considérés rapidement comme des candidats pour la vectorisation de gènes thérapeutiques ^{20,21}.

Le principe consiste à supprimer, du matériel génétique du virus, les séquences qui codent pour les protéines responsables du cycle pathogène, et de ne laisser que les séquences permettant de construire la particule virale et d'assurer le cycle d'infection. La dernière étape est l'introduction dans le génome du virus le gène thérapeutique d'intérêt.

Différents types de virus sont utilisés. Parmi eux, citons ici les vecteurs dérivés des adénovirus, et des rétrovirus.

- Les adénovirus

Ce sont des virus à ADN double brin de 36 à 40 kb. Ils sont capables d'encapsuler des grandes séquences d'ADN (30 kb) et peuvent infecter plusieurs types d'organes comme les voies

²⁰ A. N. Lukashev, A. A. Jr. Zamyatnin, *Biochemistry (Mosc)*, **2016**, 81, 700-708.

²¹ P. D. Robbins, S. C. Ghivizzani, *Pharmacol Ther*, **1998**, 80, 35-47.

respiratoires ou les yeux. Cependant ces vecteurs peuvent provoquer des réactions immunitaires²².

- Les rétrovirus

Ces virus sont impliqués dans de graves maladies humaines telles que le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Leur manque de spécificité cellulaire et leur faible capacité d'encapsulation sont des inconvénients majeurs pour l'utilisation de ces virus comme agent de vectorisation²³.

D'une façon générale, les vecteurs viraux présentent d'excellentes efficacités de transfection *in vivo* ce qui explique leur utilisation majoritaire pour les essais cliniques. Cependant, en dépit de cette efficacité, les vecteurs viraux présentent plusieurs inconvénients, liés principalement au coût et à la difficulté de leur production et du fait de leur nature virale qui peut engendrer des réactions inflammatoires ou immunogènes.

Afin de surmonter ces inconvénients les chercheurs se sont intéressés à l'élaboration de nouveaux vecteurs de nature synthétique.

2.2 Les vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques représentent aujourd'hui une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Ils sont simples à produire et à utiliser²⁴, ils peuvent encapsuler des séquences d'acides nucléiques de poids moléculaire important²⁵ et ils ne provoquent pas ou peu de réaction immunogène²⁶.

Généralement, les vecteurs synthétiques sont des molécules cationiques qui forment avec le gène thérapeutique des complexes suite à des interactions électrostatiques. Il existe tout de même dans la littérature des exemples de vecteurs anioniques²⁷ ou neutres²⁸ utilisés pour le transfert d'acides nucléiques.

²² S. M. W. Wold, K. Toth, *Curr. Gene Ther.*, **2013**, 13, 421–433.

²³ J. E. Vargas, L. Chicaybam, R. T. Stein, A. Tanuri, A. Delgado-Cañedo, M. H. Bonaming, *J. Transl. Med.*, **2016**, 14, 288-303.

²⁴ E. Vivien, N. Oudrhiri, J. P. Vigneron, M. Hauchecorne, R. Ramasawmy, S. Riquier, R. Toury, S. Fabrega, J. Navarro, J. M. Lehn, P. Lehn, *Annales de l'institut Pasteur*, **1999**, 10, 301-312.

²⁵ C. M. Varga, K. Hong, D. A. Lauffenburger, *Mol. Ther.* **2001**, 4, 438-446.

²⁶ I.G. Schmidt-Wolf, *Trends Mol. Med.*, **2003**, 9, 67-72.

²⁷ A. L. Barrán-Berdón, E. Aicart, E. Junquera, *Methods Mol Biol*, **2016**, 1445, 45-61.

²⁸ I. Villate-Beitia, I. Gallego, G. Martínez-Navarrete, J. Zárate, T. López-Méndez, C. Soto-Sánchez, E. Santos-Vizcaíno, G. Puras, E. Fernández, J. L. Pedraz, *Int. J. Pharm.*, **2018**, 550, 388-397.

Il est possible de classer les vecteurs de synthèse en deux grandes familles : les vecteurs polymériques et les vecteurs lipidiques. Les paragraphes suivants seront consacrés à décrire d'une façon non exhaustive ces deux familles.

- Les polymères cationiques

Ces vecteurs se caractérisent par une succession de charges positives qui leur confèrent la capacité d'interagir efficacement avec les groupements phosphates de l'ADN ou l'ARN. Les complexes formés sont appelés polyplexes ²⁹. Il existe plusieurs types de polymères cationiques parmi lesquelles les poly-L-lysines (PLL), les polyéthylèneimines (PEI) linéaires ou branchés ou encore le chitosane.

• Les poly-L-lysines (PLL) ³⁰

Les poly-L-lysine (PLL) (*Figure 6*) sont les premiers polymères cationiques utilisés pour le transfert de gènes. Ce polymère est formé de plusieurs résidus lysines qui possèdent des fonctions amines de pKa de 10,2. Ces amines sont donc chargées positivement à pH physiologique (7,4) et peuvent interagir avec les acides nucléiques par interactions électrostatiques. Bien qu'ils soient capables de former des complexes stables avec l'ADN, les PLL de haut poids moléculaire entraînent une cytotoxicité importante ³¹. L'ajout de groupements imidazoles ³² ou l'utilisation de chaînes dendritiques ³³ permettent de réduire cette toxicité.

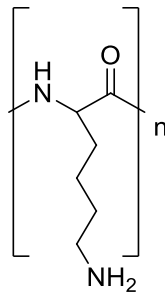


Figure 6 : Structure des poly-L-lysines (PLL)

²⁹ Y. Wang, B. Ma, A. A. Abdeen, G. Chen, R. Xie, K. Saha, S. Gong, ACS. Appl. Mater. Interfaces, **2018**, 10, 31915–31927.

³⁰ M. Walsh, M. Tangney, M. J. O'Neill, J. O. Larkin, D. M. Soden, S. L. McKenna, R. Darcy, G. C. O'Sullivan, C. M. O'Driscoll, Mol. Pharm, **2006**, 3, 644-653.

³¹ Y. H. Choi, F. Liu, J. S. Kim, Y. K. Choi, J. S. Park, S. W. Kim, J Control Release, **1998**, 54, 39–48.

³² D. Putnam, C. A. Gentry, D. W. Pack, R. Langer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, **2001**, 98, 1200–1205.

³³ M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, Bioconjug. Chem, **2002**, 13, 510–517.

- **Les polyéthylèneimines (PEI)**

Il s'agit de polyamines qui diffèrent par leur masse moléculaire et leur géométrie ramifiée ou linéaire (Figure 7)³⁴. Certains de ces composés ont été commercialisés comme le PEI linéaire de masse moléculaire 22 kDa, commercialisé sous le nom de jetPEI™. Ces molécules sont capables de condenser efficacement l'ADN³⁵, pour conduire à des polyplexes très stables. Leurs efficacités de transfection peuvent être attribuées à leur pouvoir tampon résultant de la protonation progressive des fonctions amines selon le pH du milieu.

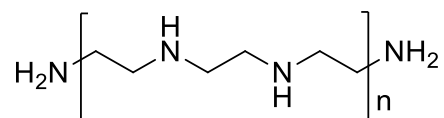


Figure 7 : Structure des polyéthylèneimines linéaires

- **Le chitosane**

Le chitosane est un polysaccharide (Figure 8). Il est produit par désacétylation partielle ou totale de la chitine³⁶, et peut être trouvé au niveau de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamars). La chitine est le biopolymère naturel le plus abondant trouvé dans la nature après la cellulose.

Le chitosane a été décrit comme un agent de vectorisation d'acides nucléiques pour la première fois par Mumper *et al*³⁷. Ces polymères sont biodégradables et très peu toxiques³⁸. D'autre part la présence de plusieurs charges cationiques leur permet de former des complexes stables avec l'ADN ou l'ARN.

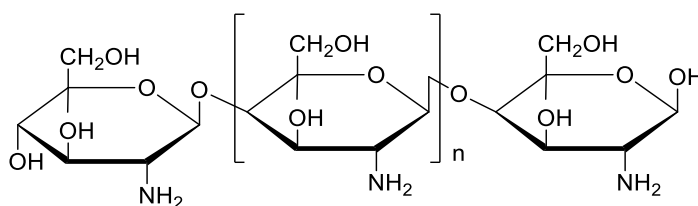


Figure 8 : Structure du Chitosan

³⁴ J. W. Wiseman, C. A. Goddard, D. McLelland, W. H. Colledge, *Gene Ther*, **2003**, 10, 1654–1662.

³⁵ P. Campeau, P. Chapdelaine, S. Seigneurin-Venin, B. Massie, J. P. Tremblay, *Gene Ther*, **2001**, 8, 1387-1394.

³⁶ S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J. C. Fernandes. *Eur J Pharm Biopharm.* **2004**, 57, 1-8.

³⁷ F. C. MacLaughlin, R. J. Mumper, J. Wang, J. M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A. P. Rolland. *J Control Release.* **1998**, 56, 259-272.

³⁸ P. D. Robbins, C. H. Evans, Y. Chernajovsky, *Gene Ther*, **2003**, 10, 902–911.

³⁹ H. L. Jiang, P. F. Cui, R. L. Xie, C. S. Cho, *Adv. Food. Nutr. Res.* **2014**, 73, 83-101.

- Les amphiphiles cationiques

Les amphiphiles cationiques ont la capacité de s'auto-assembler en milieu aqueux pour former des liposomes. Ces vésicules poly-cationiques interagissent électrostatiquement avec les molécules polyanioniques d'ADN ou d'ARN pour former des complexes stables nommés lipoplexes ⁴⁰. D'autre part, les liposomes cationiques interagissent aussi avec la membrane cellulaire chargée négativement ⁴¹ et peuvent entrer dans la cellule par un phénomène d'endocytose.

C'est en 1987 que fut décrit le premier lipide cationique pour une application en thérapie génique par Felgner *et al* ⁴². Il s'agit du chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (**DOTMA**) représentée sur la *Figure 9*.

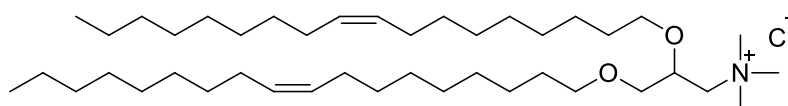


Figure 9 : Lipide cationique **DOTMA** synthétisé par Felgner *et al* ⁴²

La structure chimique des lipides cationiques s'articule autour d'un squelette commun composé de trois grandes parties (*Figure 10*) :



Figure 10 : Structure générale des lipides cationiques

Une partie hydrophobe : formée par une ou plusieurs longues chaînes hydrocarbonées qui peuvent être saturées ⁴³, insaturées⁴⁴, ramifiées ⁴⁵, chaîne perfluoroalkylées ⁴⁶ ou bien dérivées du cholestérol ⁴⁷, ou encore de la vitamine E ⁴⁸. La nature du domaine hydrophobe

⁴⁰ C. R. Dass, *Int. J. Pharm.* **2002**, 241, 1-25.

⁴¹ R. Cosimati, G. L. Milardi, C. Bombelli, A. Bonincontro, F. Bordi, G. Mancini, G. Risuleo, *Biochim Biophys Acta*, **2013**, 1828, 352-356.

⁴² P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**, 84, 7413-7417.

⁴³ A. A. Hiwale, C. Voshavar, P. Dharmalingam, A. Dhayani, R. Mukthavaram, R. Nadella, O. Sunnapu, S. Gandhi, V. G. M. Naidu, A. Chaudhuri, S. Marepally, P. K. Vemula, *RSC Adv*, **2017**, 7, 25398-25405.

⁴⁴ S. Arpicco, S. Canevari, M. Ceruti, E. Galmozzi, F. Rocco, L. Cattel, *Farmaco*, **2004**, 59, 869-878.

⁴⁵ N. J. Mitchell, P. Seaton, A. Pokorny, *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, 1858, 988-994.

⁴⁶ E. Klein, M. Ciobanu, J. Klein, V. Machi, C. Leborgne, T. Vandamme, B. Frisch, F. Pons, A. Kichler, G. Zuber, L. Lebeau, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 2, 360-371.

⁴⁷ J. Ju, M. Huan, N. Wan, H. Qiu, S. Zhou, B. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16, 5666-5681.

⁴⁸ B. Kedika, S. V. Patri, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 2581-2592.

peut avoir une influence sur la nature de l'assemblage supramoléculaire des amphiphiles et sur le caractère fusogène des liposomes.

Le bras espaceur : il permet de relier les parties hydrophiles et hydrophobes des lipides cationiques. Sa nature peut permettre d'influencer la stabilité et la biodégradabilité du vecteur ⁴⁹.

La tête polaire : de nature hydrophile, elle porte une ou plusieurs charges positives permanentes ou pH dépendants. Elle permet d'assurer l'interaction avec les acides nucléiques ⁵⁰.

3. Mode d'action des amphiphiles cationiques

Afin d'être utilisés comme vecteur pour le transfert de gènes, les amphiphiles cationiques doivent dans un premier temps être formulés en solutions liposomales. Ils sont ensuite mis en contact avec l'acide nucléique (e.g. ADN) pour former des lipoplexes. Ces lipoplexes ont alors un parcours extracellulaire puis intracellulaire. L'ensemble de ces étapes, de la formation des liposomes à la localisation nucléaire de l'ADN est présenté ci-après.

3.1 Les liposomes

Les amphiphiles cationiques ont la capacité de s'auto-assembler en milieu aqueux pour former des agrégats supramoléculaires (liposomes, micelles). En effet, l'équilibre entre les forces attractives entre les chaînes hydrophobes et les forces répulsives entre les têtes polaires cationiques, gouvernent l'organisation des amphiphiles cationiques dans l'eau.

De manière générale, les amphiphiles cationiques formés de deux chaînes alkyles (structure bicaténaire), adoptent une structure en bicouche lipidique, qui par repliement aboutissent à la formation de liposomes (*Figure 11*) ⁵¹.

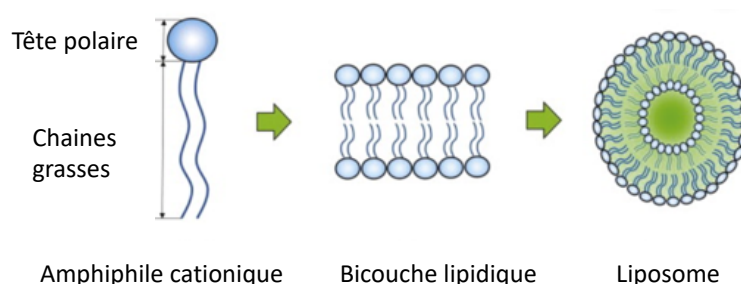


Figure 11 : Formation en milieu aqueux de liposomes

⁴⁹ A. Bajaj, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, J. Med. Chem, **2008**, 51, 2533-2540.

⁵⁰ D. Zhi, S. Zhang, S. Cui, Y. Zhao, Y. Wang, D. Zhao, Bioconjugate Chem, **2013**, 24, 487-519.

⁵¹ N. Maurer, D. B. Fenske, P. R. Cullis, Expert Opin. Biol. Ther, **2001**, 1, 923-947.

3.2 Les lipoplexes

Les lipoplexes sont les complexes formés à partir des molécules d'acides nucléiques et des liposomes. Suivant la nature des lipides utilisés, plusieurs types d'organisation supramoléculaire des lipoplexes ont été décrits:

- Structure lamellaire, dite en feuillet, où la séquence d'acides nucléiques est localisée entre deux bicouches lipidiques ⁵².
- Structure hexagonale inverse où l'ADN ou ARN se retrouve à l'intérieur des tubes formés par les têtes polaires des amphiphiles cationiques ⁵³.
- Structure hexagonale directe : les molécules d'acides nucléiques prennent place dans les interstices entre les micelles formées par les amphiphiles cationiques.

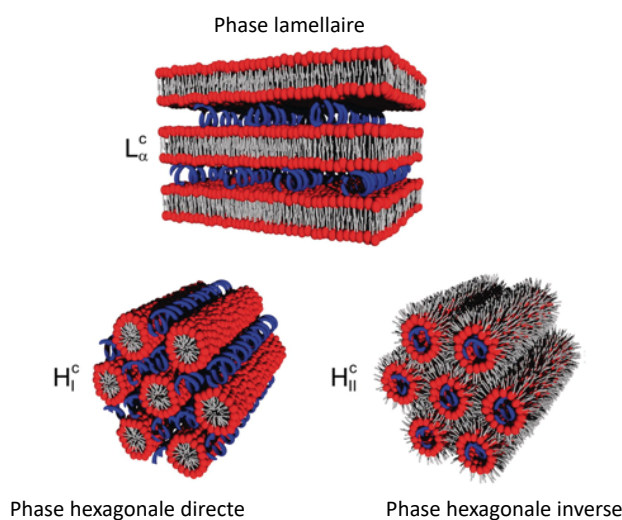


Figure 12 : Structure des lipoplexes ⁵⁴

3.3 Traffic extracellulaire

Le trafic extracellulaire est étroitement lié au mode d'administration des lipoplexes (aérosolisation,⁵⁵ voie intraveineuse...). Plusieurs facteurs peuvent limiter l'arrivée des lipoplexes jusqu'à leurs cibles, notamment leur taille. En effet des lipoplexes de tailles importantes peuvent s'agglomérer et rester bloqués au niveau des capillaires sanguins ⁵⁶. La charge cationique des lipoplexes peut aussi entraîner des interactions électrostatiques avec

⁵² N. S. Templeton, D. D. Lasic, P. M. Frederik, H. H. Strey, D. D. Roberts, G. N. Pavlakis, *Nat. Biotechnol.*, **1997**, 15, 647–652.

⁵³ J. Corsi, R. W. Hawtin, O. Ces, G. S. Attard, S. Khalid, *Langmuir*, **2010**, 26, 14, 12119-12125.

⁵⁴ V. Allain, C. Bourgaux, P. Couvreur, *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, 1891-1903.

⁵⁵ M. Berchel, P.A. Jaffrès, T. Le Gall, T. Montier, *ACS Symposium series*, **2019**, 1309, Chapter 2, 35-58.

⁵⁶ D. Simberg, S. Weisman, Y. Talmon, A. Faerman, T. Shoshani, Y. Barenholz, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 39858–39865.

certaines protéines présentes dans le sérum tel que l'albumine ⁵⁷. Des interactions hydrophobes avec des opsonines peuvent aussi conduire à la dégradation de ces complexes ⁵⁸.

3.4 L'entrée dans la cellule

L'intérêt de l'utilisation des lipoplexes est de faciliter le passage de la membrane cellulaire. En effet, selon leurs types, les cellules peuvent avoir des résidus anioniques à leur surface rendant leur membrane chargée négativement. Ainsi, afin de faciliter l'entrée du gène thérapeutique dans les cellules, les lipoplexes formés possèdent généralement une charge apparente positive.

Le mode le plus courant d'internalisation des lipoplexes est l'endocytose. Selon la nature, la taille et la présence d'agent de ciblage, les lipoplexes peuvent être internalisés selon divers types d'endocytose comme le montre la figure ci-dessous ⁵⁹.

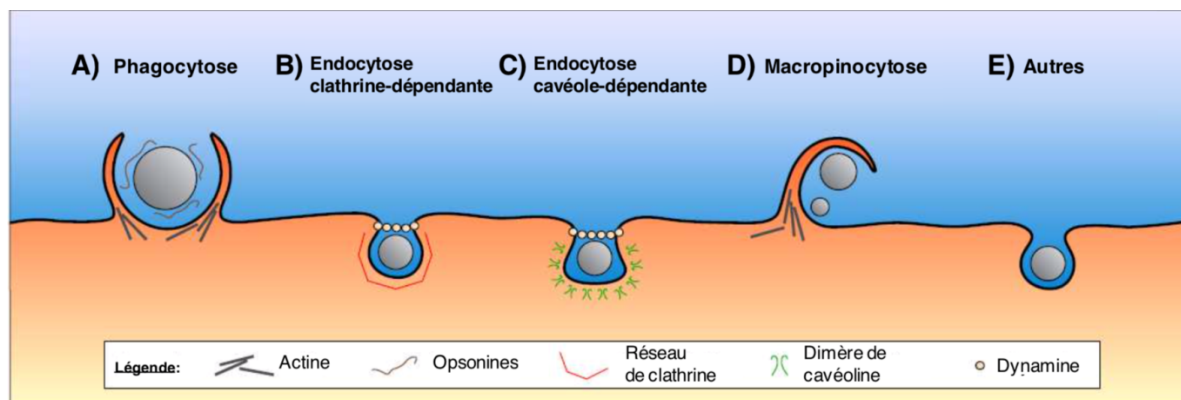


Figure 13 : Différentes voies d'endocytose ⁵⁹

Dans le cas des lipides cationiques, l'internalisation cellulaire se fait généralement par endocytose clathrine-dépendante ^{60,61}. Une fois dans la cellule, les lipoplexes se retrouvent piégés à l'intérieur d'une vésicule appelée endosome. Cet organelle évolue lors de sa maturation et se transforme d'un endosome précoce en endosome tardif puis en lysosome. Au cours de cette maturation, un gradient de pH s'établit à l'intérieur des vésicules, allant d'un pH de 6,5-6,8 pour les endosomes précoces à un pH proche de 5 pour les lysosomes ⁶². Cette diminution

⁵⁷ Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry*, **1996**, 35, 5616–5623.

⁵⁸ M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, E. Wagner, *Gene Ther.*, **1999**, 6, 595–605.

⁵⁹ H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2009**, 66, 2873–2896.

⁶⁰ Y. Li, J. Wang, M. G. Wientjes, J. L. Au, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, 64, 29–39.

⁶¹ Y. U. Bae, B. K. Kim, J. W. Park, Y. B. Seu, K. O. Doh, *Pharmaceutics*, **2012**, 9, 3579-3585.

⁶² F. R. Maxfield, D. J. Yamashiro, *Adv Exp Med Biol*, **1987**, 225, 189-198.

de pH associée à l'activation de systèmes enzymatiques peut conduire à la dégradation de l'ADN. Pour éviter cette dégradation, il est nécessaire que le complexe puisse sortir de l'endosome.

3.3 L'échappement endosomal

Szoka *et al*⁶³ ont proposé un mécanisme de « flip-flop » pour expliquer la déstabilisation de la membrane endosomale par les lipoplexes. En effet, une fois internalisés, les lipides cationiques des lipoplexes peuvent interagir avec les lipides anioniques de la membrane endosomale par des interactions électrostatiques. Un échange de lipides (lipid mixing) se produit suite à ces interactions et permet la libération de l'acide nucléique dans le milieu intracellulaire, comme le montre la figure ci-dessous .

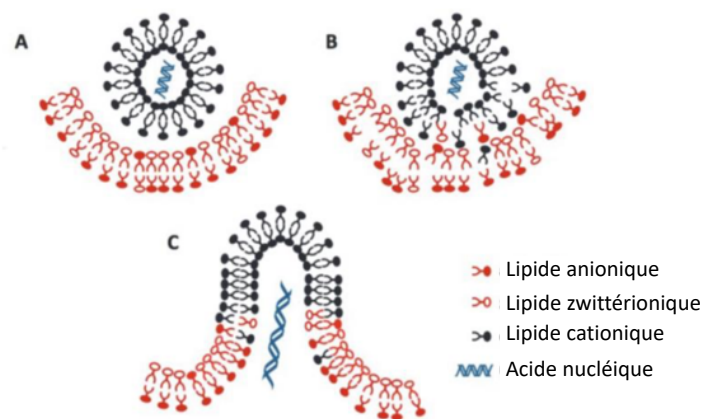


Figure 14 : Illustration du mécanisme du « flip-flop » conduisant à la libération de l'acide nucléique de l'endosome⁶⁴

Plusieurs facteurs peuvent favoriser les interactions entre les lipides cationiques des lipoplexes et les lipides anioniques de l'endosome parmi lesquelles : i) Le caractère fusogène des lipides cationiques⁶⁵ ou l'utilisation du co-lipide fusogène comme la DOPE ; ii) Le pouvoir tampon des vecteurs (phénomène d'éponge à protons) qui provoque une entrée massive d'ions chlorures et d'eau dans l'endosome, le gonflement de l'endosome puis sa rupture entraînant la libération de l'acide nucléique⁶⁶ ; iii) La nature de l'auto-assemblage supramoléculaire formé par les lipoplexes. En effet, il est largement connu que les phases non-

⁶³ Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry*, **1996**, 35, 5616-5623.

⁶⁴ M. P. Gosselin, Thèse de doctorat, Vectorisation de petits acides nucléiques par des lipopolyplexes : application au cancer du sein, **2016**, Université d'Orléans.

⁶⁵ Z. Y. Zhang, B. D. Smith, *Bioconjug. Chem*, **2000**, 11, 805-814.

⁶⁶ H. Farhood, N. Serbina, L. Huang, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1995**, 1235, 289-295.

lamellaires et en particulier la phase hexagonale ⁶⁷ améliorent significativement les propriétés fusogènes des amphiphiles cationiques.

3.4 Trafic intracellulaire et entrée dans le noyau

Il s'agit de l'étape la moins connue et l'une des plus limitantes parmi les différentes étapes de transfection. En effet, la diffusion des particules dans le cytoplasme est très lente à cause de la viscosité du milieu et de l'enveloppe nucléaire, constituée d'une double bicouche lipidique et qui ne peut être franchie qu'à travers les pores nucléaires ou lors de la mitose. C'est pour cela qu'il est plus facile de transfecter des cellules en division que des cellules quiescentes.

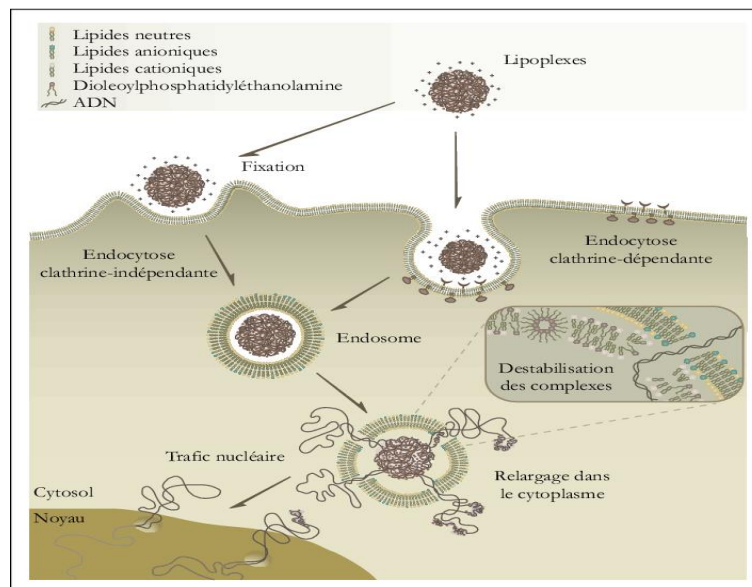


Figure 15 : Parcours intracellulaire des lipoplexes ⁶⁸

4. Évolution des lipides cationiques

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, les lipides cationiques sont formés de trois parties : les chaînes hydrophobes, la tête polaire et le bras espaceur. Il est alors possible de moduler la structure de ces molécules non seulement pour améliorer l'efficacité de transfection, mais aussi établir des relations structure/activité entre les propriétés physico-chimiques des lipides cationiques et leurs propriétés de transfection.

⁶⁷ L. Wang, R. Koynova, H. Parikh, R. C. MacDonald, *Biophysical J.*, **2006**, 91, 3692–3706.

⁶⁸ S. Bértin, M. Pedroso de Lima, V. Pierrefite-Carle, *Bull. Cancer*, **2007**, 94, 243-252.

4.1 Modulation de la tête polaire

La nature du domaine hydrophile des lipides cationiques n'a pas cessé d'évoluer depuis les travaux de Felgner en 1987 et la synthèse du premier lipide cationique **DOTMA** avec une tête polaire de type triméthylammonium. Sans être exhaustif, quelques exemples récents sont présentés ci-dessous.

En 2003, l'équipe du Pr Marc Ilies a rapporté la synthèse de nouveaux amphiphiles cationiques comportant une tête polaire de type pyridinium ⁶⁹. Ces lipides cationiques (*Figure 16*) ont montré une efficacité de transfection supérieure aux deux références commerciales **DOTAP** et Lipofectamine.

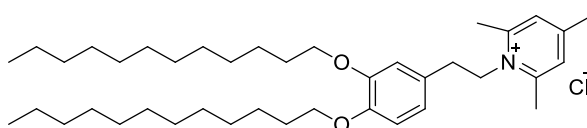


Figure 16 : Amphiphile cationique à tête pyridinium synthétisé par Ilies *et al* ⁷⁰

Une autre étude réalisée en 2018 par María Martínez-Negro a montré que des lipides cationiques contenant deux groupements histidines et diméthylé au niveau des hétérocycles imidazoles permet d'avoir d'excellent résultats en transfection sur les lignées HeLa et COS-7 tout en ayant une faible toxicité ⁷¹.

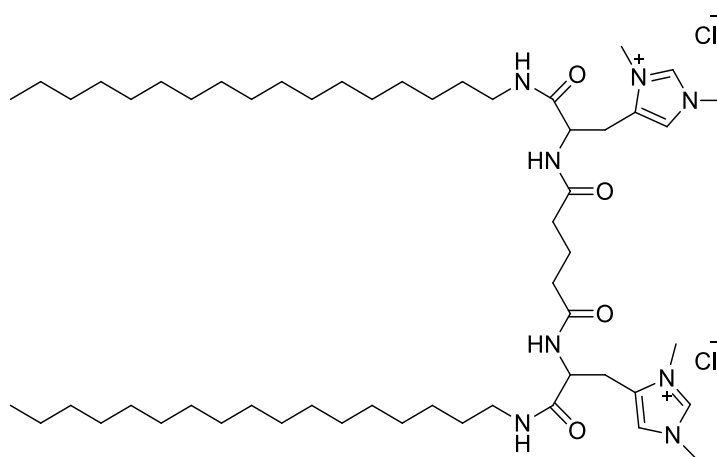


Figure 17 : Lipide cationique synthétisé par Martínez-Negro *et al* ⁷¹

⁶⁹ M. Ilies, W. Seitz, M. Caproiu, M. Wentz, R. Garfield, A. Balaban, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 14, 2645-2655.

⁷⁰ S. Savarala, E. Brailoiu, S.L. Wunder, M. A. Ilies, *Biomacromolecules*, **2013**, 2750-2764.

⁷¹ M. Martínez-Negro, L. Blanco-Fernández, P. M. Tentori, L. Pérez, A. Pinazo, C. Tros de Ilarduya, E. Aicart, E. Junquera, *Nanomaterials (Basel)*. **2018**, 8, 1061-1079.

D'autres amphiphiles cationiques composés d'une tête polaire amino-glycosidique dérivée de la kanamycine ont été synthétisés par l'équipe de Lehn *et al.* Ces molécules ont montré de bons résultats de transfection *in vitro* et également *in vivo* ⁷².

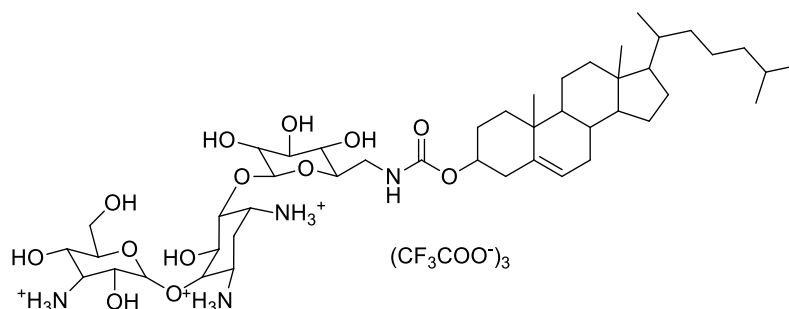


Figure 18 : Structure d'un amphiphile cationique dérivé de la kanamycine synthétisé par Lehn *et al* ⁷²

4.2 Modification du bras espaceur

Le bras espaceur ou linker est la partie des amphiphiles cationiques qui sert de lien entre le domaine hydrophobe et la partie hydrophile. La nature de l'espaceur a une influence majeure sur la stabilité, la biodégradabilité et la cytotoxicité des amphiphiles ⁷³. Ainsi la liaison éther présente dans le squelette du **DOTMA** a été remplacée par une fonction ester, clivable en milieu biologique (**DOTAP**). Bien que la viabilité cellulaire semble s'améliorer dans le cas où le groupement espaceur est une fonction ester, l'efficacité de transfection quant à elle reste meilleure dans le cas où le groupement espaceur est une fonction éther ⁷⁴.

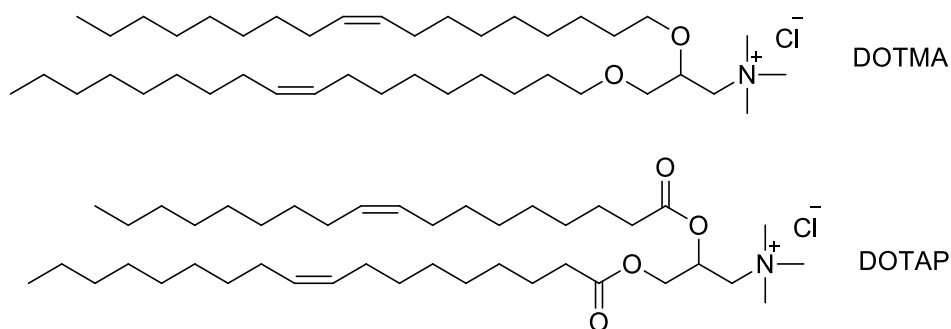


Figure 19 : Structure des amphiphiles cationiques **DOTMA** et **DOTAP**

⁷² M. Sainlos, M. Hauchecorne, N. Oudrhiri, S. Zertal-Zidani, A. Aissaoui, J. P. Vigneron, J. M. Lehn, P. Lehn, *Chem. Bio. Chem.*, **2005**, 6, 1023-1033.

⁷³ R. Srinivas, S. Samanta, A. Chaudhuri, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 3326-3338.

⁷⁴ T. Ren, D. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 1247-1250.

Une autre idée proposée par Tang *et al*⁷⁵ est l'utilisation d'un groupement disulfure au niveau du bras espaceur. En effet, la présence de la glutathione dans le milieu intracellulaire entraîne la réduction du pont disulfure et par conséquent, la déstabilisation du lipoplexe et la libération de l'ADN. Les essais de transfection ont confirmé que le composé **DOGSDSO** contenant le groupement disulfure est plus efficace pour la vectorisation de l'acide nucléique que son analogue **DOGSHDO** (Figure 20).

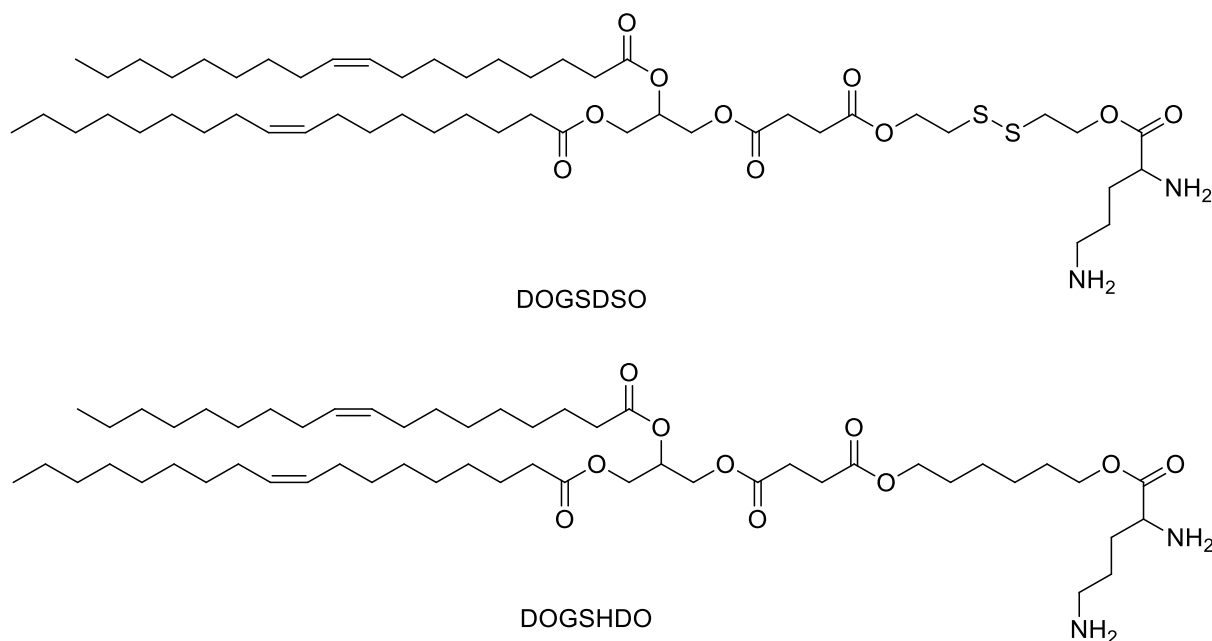


Figure 20 : Structure des amphiphiles synthétisés par Tang *et al*⁷⁵

D'autres types d'espacesurs pH-sensibles, photosensibles ou clivables en présence d'enzyme ont été aussi synthétisés⁷⁶. Il est cependant difficile de tirer des conclusions définitives sur l'effet du linker sur les propriétés de transfection⁷⁷.

4.3 Modification du domaine hydrophobe

La nature des chaînes hydrophobes des amphiphiles cationiques a une influence majeure sur leurs propriétés de transfection et leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi ces dernières années, plusieurs études basées sur la modification du domaine hydrophobe ont été conduites.

⁷⁵ F. tang, J. A. Huges, Biochem. Biophys. Res. Comm., **1998**, 242, 141-145.

⁷⁶ M. Mintzer, E. E. Simanek, Chem. Rev, **2009**, 109, 259-302.

⁷⁷ T. Fichert, A. Regelin, U. Massing, Bioorg. Med. Chem. Lett, **2000**, 10, 787-791.

Huang *et al* ont synthétisé en 1991, un nouvel amphiphile cationique, le DC-Chol, avec un motif cholestérol en guise de partie hydrophobe⁷⁸. En effet le cholestérol présente l'avantage d'être biocompatible ce qui réduit la toxicité des lipides cationiques⁷⁹.

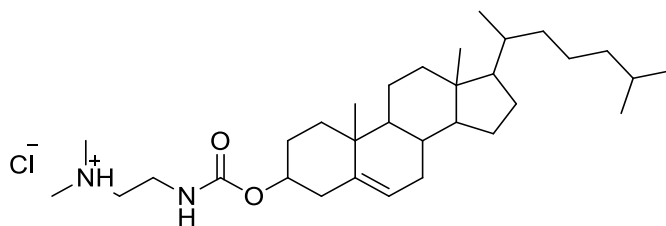


Figure 21 : Structure du DC-Chol

Zhang *et al* ont misé sur la biocompatibilité de la vitamine D pour la synthèse de nouvelles familles de lipides cationiques. Ces nouvelles molécules ont démontré de bons résultats de transfection *in vitro*⁸⁰.

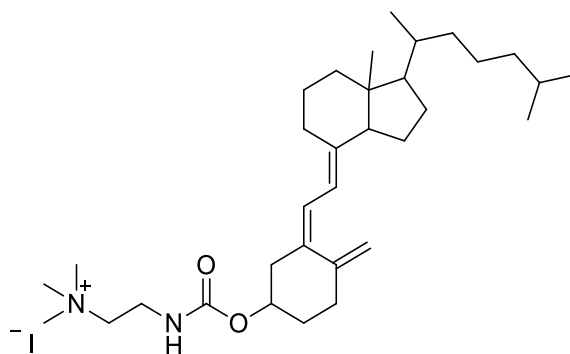


Figure 22 : Lipide cationique dérivé de la Vitamine D

La longueur des chaînes hydrophobes semble avoir un effet sur l'efficacité de transfection des lipides cationiques, comme cela a été montré par l'équipe de Byk *et al*. Dans cette étude ils montrent que l'efficacité de transfection des amphiphiles cationiques s'accroît en augmentant la longueur de la chaîne grasse⁸¹.

Une étude réalisée par Heyes *et al* a montré que les lipides cationiques formés par des chaînes hydrophobes dissymétriques sont plus efficace pour le transfert d'acides nucléiques que leurs analogues symétriques⁸².

⁷⁸ X. Gao, L. Huang, Biochem. Biophys. Res. Comm, **1991**, 179, 280-285.

⁷⁹ J. Ju, M. L Huan, N. Wan, H. Qiu, S. Y. Zhou, B. L. Zhang, Int. J. Mol. Sci. **2015**, 16, 5666-5681.

⁸⁰ T. Ren, G. Zhang, F. Liu, D. Liu, Bioorg Med Chem Lett, **2000**, 10, 891-894.

⁸¹ G. Byk, C. Dubertret, V. Escriou, M. Frederic, G. Jaslin, R. Rangara, B. Pitard, J. Crouzet, P. Wils, B. Schwartz D. scherman, J. Med. Chem., **1998**, 41, 224-235.

⁸² J. A. Heyes, D. Niculescu-Duvaz, R. G. Cooper, C. J. Springer, J. Med. Chem, **2002**, 45, 99-114.

5. Évolution des lipides cationiques synthétisés au laboratoire

Le groupe thématique « Phosphore et Vectorisation » de l'équipe « Chimie Organique Santé et Matériaux (COSM) » à Brest s'est intéressé à la conception de lipides cationiques bio-inspirés. En effet, l'équipe développe depuis des années des phospholipides inspirés des phospholipides présents dans les membranes cellulaires. Ces amphiphiles sont composés d'un groupement phosphoré qui sert de linker (espaceur) entre les parties hydrophiles et hydrophobes de ces molécules (*Figure 23*). Plusieurs modifications visant les trois composantes de ces lipides ont été effectuées ces dernières années, dans le but d'étudier leurs effets sur les propriétés physico-chimiques et de transfection de ces vecteurs.

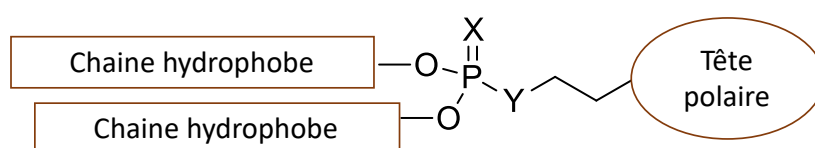


Figure 23 : Structure générale des phospholipides synthétisés par l'équipe « Phosphore et Vectorisation »

5.1 Modification du bras espaceur

Notre équipe s'est inspirée des travaux de Behr *et al*⁸³ ayant décrit le premier vecteur contenant un espaceur phosphorylé le **DPPES** (*Figure 24*). Ainsi au cours de la thèse de G. Le Bloc'h, de nouveaux amphiphiles cationiques contenant un groupement phosphonate comme bras espaceur ont été synthétisés⁸⁴. Parmi les molécules synthétisées lors de cette étude le composé **GLB 73** s'est distingué par une bonne efficacité de transfection aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

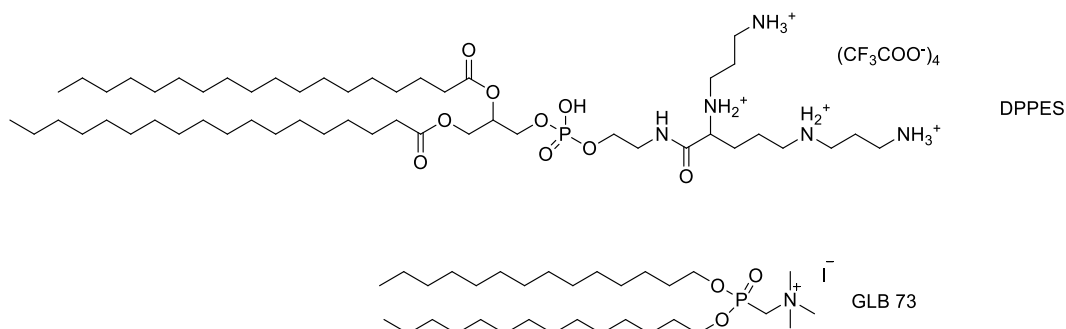


Figure 24 : Structure des lipides cationiques **DPPES** et **GLB 73**

⁸³ J. P. Behr, B. Demeniex, J. P. Loefeller, J. Perez-Mutul, Proc. Natl. Acad. Sci, **1989**, 86, 6982-6986.

⁸⁴ G. Le Bloc'h, thèse de doctorat, Synthèse de phosphonolipides pour la transfection non virale, **1997**, Université de Brest.

Au cours de sa thèse K. Le Ny a remplacé la fonction phosphonate par une fonction phosphoramidate afin d'obtenir un groupement espaceur facilement métabolisable⁸⁵. L'objectif était de faciliter la sortie de l'acide nucléique, une fois internalisé dans la cellule, en déstabilisant la structure du lipoplexe par clivage de la fonction phosphoramidate. Parmi les molécules synthétisées au cours de ces travaux, le composé **KLN 47** (Figure 25) formé par deux chaînes oléyles et une tête polaire de type triméthylarsonium a montré d'excellents résultats de transfection et une faible toxicité sur plusieurs lignées cellulaires.⁸⁶ Ce composé est utilisé comme l'un des vecteurs de référence au laboratoire.

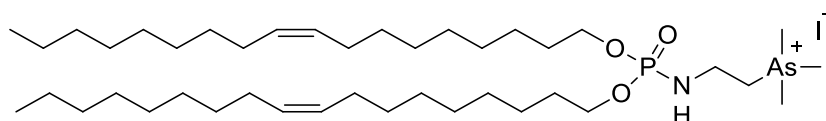


Figure 25 : Structure du **KLN 47**

La fonction phosphoramidate a par la suite été remplacée par une fonction thiophosphoramidate (Figure 26) suite aux travaux d'A. Fraix⁸⁷. Le but de cette étude visait encore une fois à faciliter l'échappement endosomal des lipides cationiques. En effet, l'atome de soufre est un atome moins accepteur de liaison hydrogène que l'atome d'oxygène : les lipoplexes ainsi formés seraient donc moins stables que leurs analogues contenant un espaceur phosphoramidate.

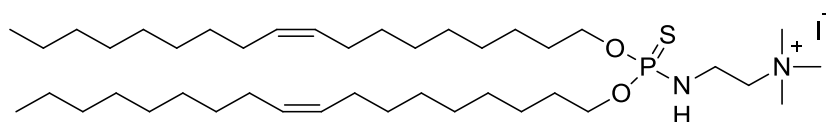


Figure 26 : Exemple de thiophosphoramidate synthétisé au cours de la thèse d'A. Fraix

Finalement, les travaux réalisés lors de la thèse de S. Le Corre⁸⁸ ont eu pour but de modifier le groupement phosphoramidate par un groupement phosphate, clivable en milieu biologique pour favoriser l'échappement endosomal (Figure 27).

⁸⁵ K. Le Ny, thèse de doctorat, Synthèse de nouveaux lipides cationiques pour la vectorisation d'ADN, **2004**, Université de Brest.

⁸⁶ V. Laurent, A. Fraix, T. Montier, S. Cammas-Marion, C. Ribault, T. Benvegno, P. A. Jaffrès, P. Loyer, *Biotechnology J.*, **2010**, 5, 314-320.

⁸⁷ A. Fraix, thèse de doctorat, Synthèse, caractérisation et formulation de nouveaux vecteurs phospholipidiques soufrés pour une application en transfert de gènes, **2010**. Université de Brest.

⁸⁸ S. Le Corre, thèse de doctorat, Nouveaux lipides cationiques phosphorés pour la délivrance d'acides nucléiques, **2014**, Université de Brest.

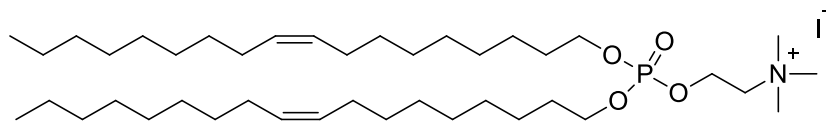


Figure 27 : Structure d'amphiphiles cationiques avec un groupement phosphate synthétisé par S. Le Corre

5.2 Modification de la tête polaire

Le rôle principal de la tête polaire est d'assurer les interactions entre le vecteur et les molécules d'acides nucléiques. Notre équipe a réalisé plusieurs études visant à modifier la nature de partie hydrophile des phospholipides, pour étudier son effet sur les propriétés de transfection de ces molécules. Ainsi, la tête triméthylammonium a été remplacée par une tête triméthylphosphonium ou triméthylarsonium (*Figure 28*). Les résultats obtenus ont montré qu'une taille du cation plus importante conduisait aux meilleures efficacités de transfection.

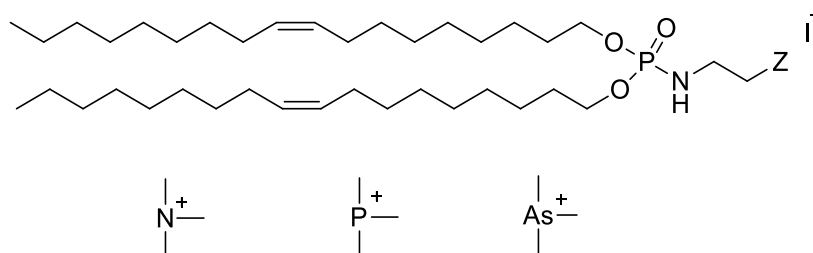


Figure 28 : Modification de la nature de la tête polaire des phosphoramides

Une autre stratégie explorée par notre équipe est la synthèse d'amphiphiles polycationiques. Au cours de la thèse de M. Mével et de S. Le Corre, des phospholipides dotés d'une tête polaire dicationique ont été synthétisés. Le but étant de favoriser les interactions avec les acides nucléiques (*Figure 29*). Les tests de transfection ont indiqué que ces vecteurs peuvent être considérés comme de bons candidats pour la vectorisation d'acides nucléiques. Cependant, certaines de ces molécules se sont avérées toxiques⁸⁸.

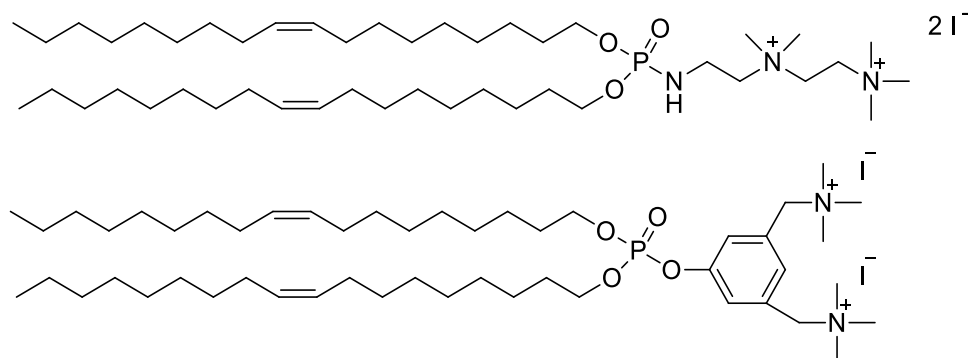


Figure 29 : Exemple de lipides dicationiques synthétisés au laboratoire

Des phospholipides neutres comportant un groupement imidazole ont aussi été synthétisés au cours de la thèse de M. Mével (*Figure 30*). Ces lipides neutres possèdent une fonction amine protonable à un pH de 6.2. Ce groupement permet d'avoir un effet d'éponge à protons pour éviter la dégradation de l'acide nucléique dans l'endosome, tout en faisant apparaître des propriétés de fusion plus importantes à pH acide qu'à pH neutre.⁸⁹

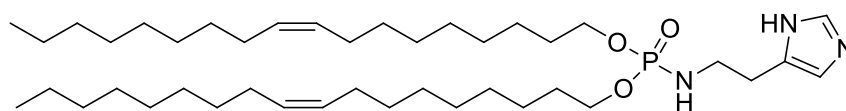


Figure 30 : Lipide neutre obtenu à partir de l'histamine

5.3 Modulation des parties hydrophobes

La partie hydrophobe des phospholipides synthétisés par l'équipe « Phosphore et Vectorisation » a subi plusieurs modifications au fil des années. En effet les chaînes hydrophobes jouent un rôle important pour la modulation des caractéristiques physico-chimiques de ces molécules. Ainsi, les premières études ont montré que l'utilisation de chaînes insaturées de types oléyles ou linoléyles conduit (*Figure 31*) à des vecteurs plus efficaces pour le transfert de gènes que leurs analogues formés par des chaînes saturées. Ces résultats s'expliquent par le désordre généré en raison des doubles liaisons de configuration Z qui améliore le caractère fusogène de ces amphiphiles.

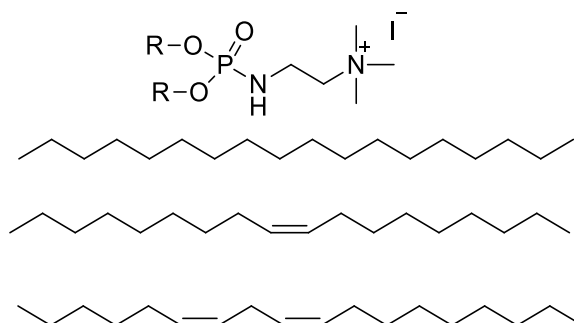


Figure 31 : Variation des chaînes hydrophobes par introduction d'insaturations

Une autre étude réalisée par A. Fraix s'est intéressée à l'introduction dans les chaînes hydrophobes des lipophosphoramides de fonctions redox sensibles, sous la forme d'un pont

⁸⁹ M. Mével, C. Neveu, C. Gonçalves, J.J. Yaouanc, C. Pichon, P. A. Jaffrès, P. Midoux, Chem. Commun, **2008**, 27, 3124-3126.

disulfure (Figure 32). Des études *in vitro* ont montré qu'en présence d'agent réducteur, il est possible de déstabiliser les lipoplexes formés et ainsi entraîner la décompaction de l'ADN.⁹⁰

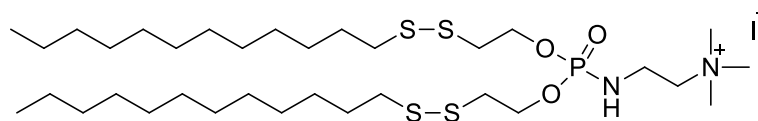


Figure 32 : Structure des lipides cationiques contenant des groupements disulfure redox sensibles⁸⁷

L'un des vecteurs synthétisés par notre équipe et ayant démontré une excellente efficacité de transfection est le composé **BSV 18** (Figure 33). Ce composé se caractérise par un domaine hydrophobe formé de deux chaînes phytanyles (chaîne ramifiée) et d'une tête polaire triméthylarsonium. Ce composé se démarque par une efficacité de transfection plus importante que le composé **KLN 47** (formées par des chaînes oléyles et une tête polaire triméthylarsonium). Des études de RMN ³¹P en milieu organisé ont montré que le composé **BSV 18** s'organise en phase hexagonale inverse, contrairement au **KLN 47** qui s'auto-assemble en phase lamellaire. Cependant, la formulation de ce composé en solution liposomale s'est avérée difficile de par le volume important de sa partie hydrophobe⁹¹.

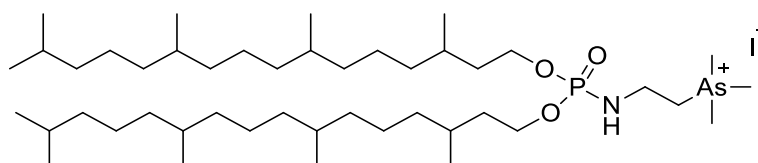


Figure 33 : Structure du **BSV 18**

Plus récemment, D. Afonso au cours de sa thèse s'est intéressé à moduler la structure des lipophosphoramides dans le but de générer des assemblages supramoléculaires non lamellaires. Ainsi, une nouvelle stratégie de synthèse visant à la synthèse de chaînes lipidiques ramifiées a été développée en utilisant des réactions photo-click « thiol-ène »⁹². Une série de nouveaux phosphoramides a été obtenue (Figure 34) et des études réalisées par RMN ³¹P

⁹⁰ A. Fraix, T. Le Gall, M. Berchel, C. Denis, P. Lehn, T. Montier, P.A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem*, **2013**, 11, 1650-1658.

⁹¹ M. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon-Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P.A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *Biomaterials*, **2012**, 33, 6240-6253.

⁹² D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E.J. Dufourc, T. Montier, P.A. Jaffrès, *Soft Matter*, **2016**, 12, 4516 – 4520.

et/ou ^2H des amphiphiles en milieu aqueux ont montré que ces molécules formaient des structures supramoléculaires hexagonales inverses.

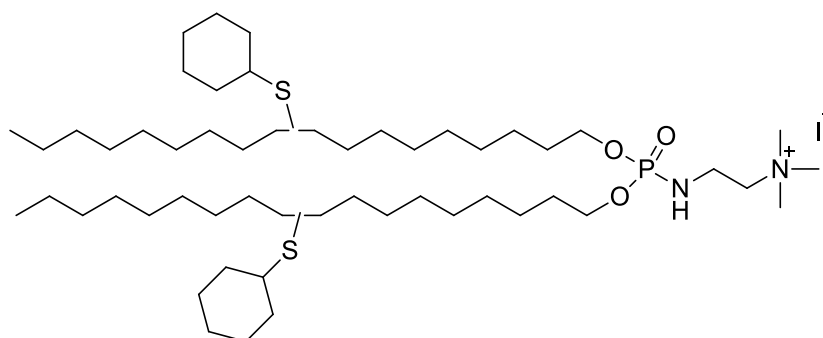


Figure 34 : Exemple de phosphoramidate ramifié synthétisé par réaction thiol-ène

Ces derniers travaux sur la synthèse d'amphiphiles ayant des chaînes lipidiques ramifiées obtenus par réaction photo-click thiol-ène ont montré que la stratégie de synthèse était pertinente pour produire des assemblages supramoléculaires non-lamellaires. Cette stratégie nous a ensuite permis d'étudier ces nouveaux amphiphiles en transfection et de montrer qu'ils étaient plus efficaces que leurs analogues comportant des chaînes linéaires (oléyles). Par ailleurs ces travaux ont montré que la réaction photo-click thiol-ène était intéressante pour la construction de composés amphiphiles.

La deuxième partie de ce chapitre bibliographique sera alors consacrée à l'étude des réactions click thiol-ène et leurs utilisations pour la synthèse de système de vectorisation d'acides nucléiques car il s'agit d'une réaction qui a été largement utilisée lors de ce travail.

III. Les réactions thiol-ène

La recherche de réactions chimiques modulables et efficaces a longtemps fait partie des priorités de la communauté scientifique. En 2001, Sharpless introduit un nouveau concept de réaction chimique appelé « chimie click »⁹³. Il s'agit de réaction de couplages entre deux unités fonctionnelles, réactives et modulables pour générer de nouveaux composés. Pour être qualifiée de réaction click, une réaction chimique doit satisfaire un ensemble de critères parmi lesquelles :

⁹³ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. R. Sharpless, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.

- Modulaire
- Présenter des rendements élevés et des temps de réaction courts.
- Stéréosélectivité le cas échéant
- Tolérance à l'eau, à l'oxygène et aux autres groupes fonctionnels
- Ne pas nécessiter de groupements protecteurs
- Être thermodynamiquement favorables
- Conditions de réaction douces (peu ou pas de solvant, température ambiante)
- Purification simple du produit final.

Plusieurs types de réactions peuvent satisfaire une partie ou l'ensemble de ces critères parmi lesquelles il est possible de citer : les cyclo-additions catalysées par le cuivre (CuAAC), la réaction de Diels-Alder, la réaction de thiol-Michael, ou encore les réactions thiol-ène radicalaires.

1. Réaction thiol-Michael

C'est une réaction qui fait intervenir l'addition d'un thiolate (généré dans le milieu réactionnel à partir d'un thiol) sur un alcène électrophile, car conjugué à une fonction ester par exemple, pour produire un thioéther⁹⁴. Il s'agit donc d'une addition conjuguée encore identifiée sous le terme d'addition de Michael. Le faible pKa du groupement thiol peut en effet être déprotoné dans des conditions douces en présence de bases faibles comme la triéthylamine qui exerce un rôle catalytique.

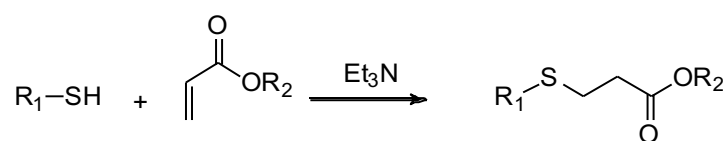


Figure 35 : Réaction d'addition de Michael d'un thiol sur un alcène activé

La réaction se déroule comme suit : l'amine tertiaire réagit avec le thiol pour former le cation ammonium et l'anion thiolate. Le thiolate s'additionne sur l'alcène, puis l'énolate formé déprotonne un autre groupement thiol entretenant le cycle catalytique pour donner l'adduit thio-éther avec une régiosélectivité anti-Markovnikov (Figure 36)⁹⁵.

⁹⁴ J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules*, **2010**, 43, 6381-6388.

⁹⁵ A. Petrelli, Thèse de doctorat, Synthèse par chimie click non métallo-catalysée de glycoconjugués macromoléculaires d'intérêt médical, **2006**, Université Grenoble Alpes.

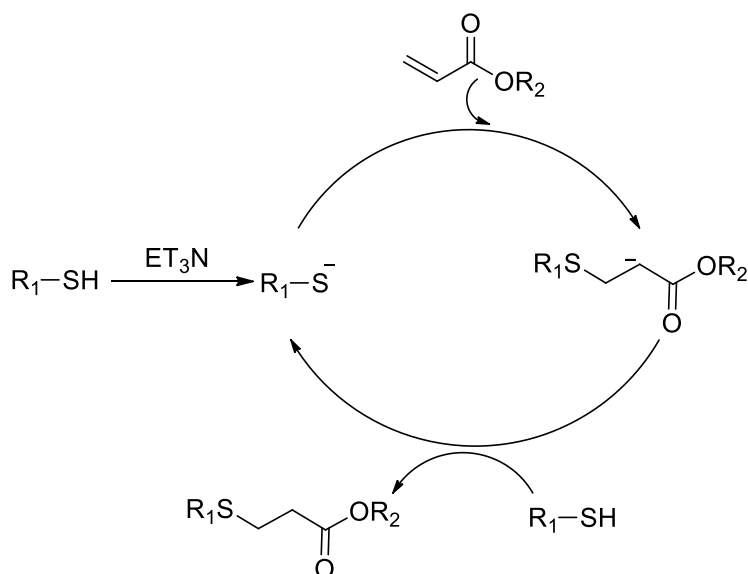


Figure 36 : Mécanisme proposé pour la réaction thiol-Michael

La figure 37 montre quelques exemples d'alcènes activés (accepteurs de Michael) pouvant être utilisés dans le cadre de réaction thiol-Michael.

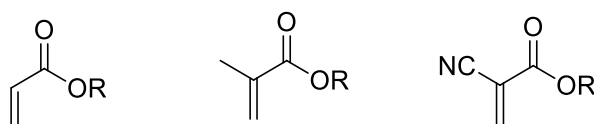


Figure 37 : Exemple d'alcènes activés utilisés lors de réaction de thiol-Michael

2. Réaction thiol-ène (radicalaire)

La liaison S-H se caractérise par une faible énergie de dissociation ce qui rend facile sa coupure homolytique par photo ou thermolyse pour générer un radical thiyl ($RS\cdot$). Ce radical peut alors facilement s'additionner sur les composés insaturés (alcènes ou alcynes) pour former des thioéthers.

Le mécanisme de la réaction thiol-ène (*Figure 38*) a été largement décrit dans la littérature ⁹⁶
⁹⁷. Il se compose de trois étapes principales :

- L'initiation
- La propagation
- La terminaison

⁹⁶ C.E. Hoyle, T.Y. Lee, T. Roper, J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem., **2004**, 42, 5301-5338.

⁹⁷ A. B. Lowe, Polym. Chem., **2014**, 5, 4820-4870.

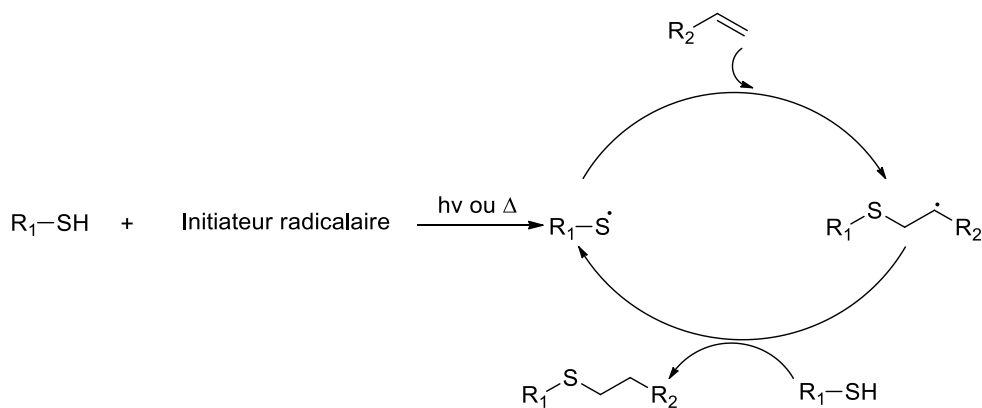


Figure 38 : Mécanisme de la réaction thiol-ène

2.1 L'initiation

La première étape de la réaction thiol-ène est à la génération d'un radical thiyl ($RS\cdot$) en éliminant un radical hydrogène d'un thiol par l'intermédiaire d'un incitateur de radicaux (*Figure 39*).



Figure 39 : Étape d'initiation de la thiol-ène

Deux types d'initiateur radicalaire peuvent être utilisés :

- Initiateurs radicalaires sensibles aux UV : tel que le 2,2-Diméthoxy-2-PhénylAcétoPhénone (DMPA). La coupure homolytique du DMPA par absorption de photons (*Figure 40*) génère deux radicaux capables de réagir avec le thiol pour former le radical thiyl ($RS\cdot$).

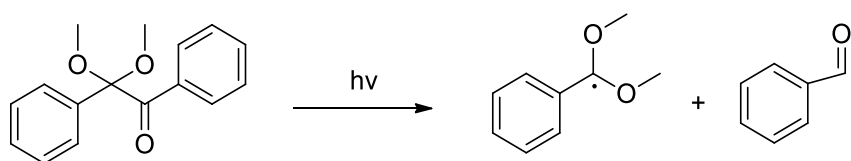


Figure 40 : Coupure homolytique du DMPA sous effet des UV

- Initiateurs radicalaires sensibles à la chaleur : tel que le l'AzobisIsoButyroNitrile (AIBN) se décompose facilement, sous l'effet de la chaleur, en diazote (gaz) et en un radical stabilisé par le groupement nitrile (*Figure 41*).

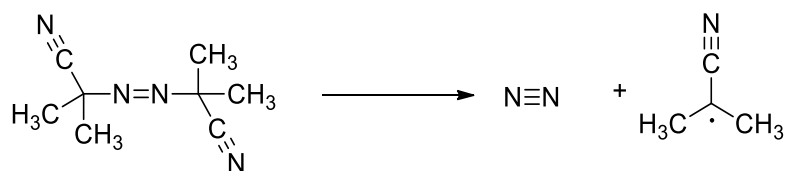


Figure 41 : Décomposition de l'AIBN sous l'effet de la chaleur

2.2 La propagation

L'addition du radical thiyl photo ou thermo généré sur les doubles liaisons forme un radical intermédiaire de type thioéther. Ce dernier réagit sur une nouvelle molécule R-SH pour former à nouveau un radical RS \cdot . Le produit de la réaction thiol-ène est obtenu, généralement⁹⁸, selon une régiosélectivité anti-Markovnikov (Figure 42).

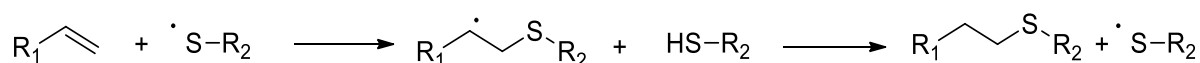


Figure 42 : Étape de propagation

2.3 La terminaison

La dernière étape de ce mécanisme est la réaction d'un radical sur un autre radical pour former un disulfure (Figure 43).

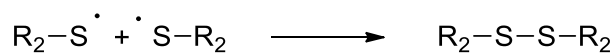


Figure 43 : Étape de terminaison et formation du disulfure

3. Application de la réaction thiol-ène

Grâce à la simplicité de sa mise en place, la réaction thiol-ène a suscité beaucoup d'intérêt. En effet il est possible de trouver de nombreuses applications allant de la modification de surface, la synthèse et la fonctionnalisation des polymères ou la préparation de molécules à visée thérapeutique. Dans les paragraphes ci-après, nous allons décrire, d'une manière non exhaustive, quelques exemples d'application de la réaction thiol-ène.

Lluch *et al* ont décrit la synthèse de polyuréthane thermoplastique par l'intermédiaire de deux réactions thiol-ène^{99, 100}. Une première réaction entre le 10-undécénoate d'allyle et le 3,6-dioxa-1,8-octanedithiol en présence de l'initiateur radicalaire DMPA permet d'obtenir des

⁹⁸ A. Mirjafari, R. A. O'Brien, K. N. West, J. H. Davis, Chemistry, **2014**, 20, 7576-7580.

⁹⁹ C. Lluch, G. Lligadas, J. C. Ronda, M. Galia and V. Cadiz, Macromol. Biosci., **2013**, 13, 614-622.

¹⁰⁰ C. Lluch, J. C. Ronda, M. Galia, G. Lligadas, V. Cadiz, Biomacromolecules, **2010**, 11, 1646-1653.

oligoesters comportant deux doubles liaisons terminales (Figure 44). Ces oligoesters sont par la suite engagés dans une deuxième réaction thiol-ène avec le mercapto-éthanol pour donner les oligomères téléchéliques utilisés pour la fabrication des polyuréthanes.

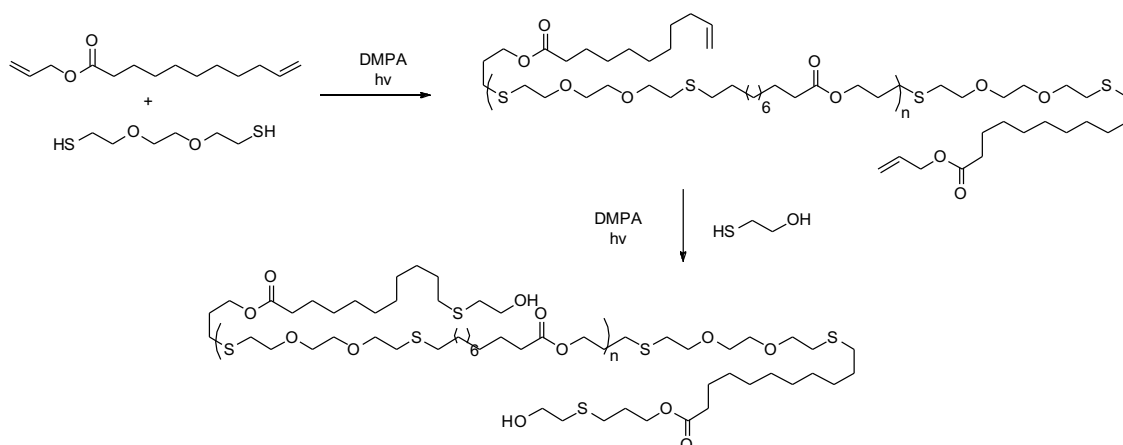


Figure 44 : Exemples de travaux de Lluch *et al*

Dans une autre étude Vilela, Silvestre and Gandini ont décrit la synthèse de monomères trifonctionnels par réaction thiol-ène entre le propane-1,2,3-triyl tris(undec-10-enoate) et le furan-2-ylmethanethiol (Figure 45). La polymérisation est par la suite réalisée par une réaction Diels-Alder entre les monomères obtenus et des dérivés de maléimides ¹⁰¹.

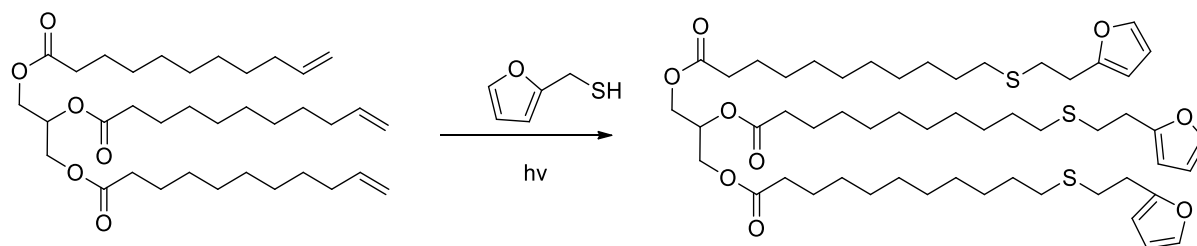


Figure 45 : Synthèse de monomères par réaction thiol-ène comme décrit par Vilela *et al*

Schlaad *et al* ont rapporté la fonctionnalisation des polybutadiènes par divers thiols hydrophiles. Le but étant de favoriser l'auto-assemblage des amphiphiles formés et de les utiliser comme agent de vectorisation de principe actif ¹⁰².

En 2016, Fang *et al* ont décrit la synthèse de nouveaux polysiloxanes suite à des réactions click thiol-ène entre le 1,2-éthanedithiol et le 1, 3-divinyl-1,1,3,3-tétraméthyl disiloxane. Les

¹⁰¹ C. Vilela, A. J. D. Silvestre, A. Gandini, J. Polym. Sci, Part A, Polym. Chem, **2013**, 51, 2260–2270.

¹⁰² Z. Hordyjewicz-Baran, L. You, B. Simarsly. R. Sigel, H. Schlaad, Macromolecules, **2007**, 40, 3901, 3903.

polymères obtenus ont été par la suite post fonctionnalisés pour obtenir des matériaux luminescents ¹⁰³.

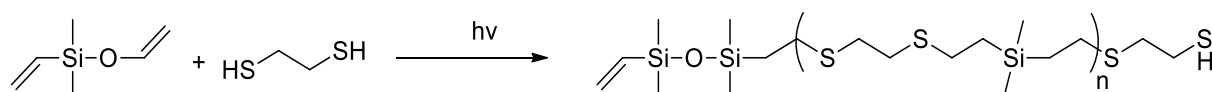


Figure 46 : Synthèse de polysiloxane par réaction thiol-ène

Dans un autre contexte Kaki *et al* ont décrit la synthèse de nouvelles molécules amphiphiles à travers des réactions thiol-ène entre l'oléate de méthyle et l'acide thioglycolique (*Figure 47*). Des couplages peptidiques entre la molécule obtenue et divers types d'acides aminés ont permis d'obtenir 7 nouveaux composés amphiphiles ayant des propriétés antibactériennes et anticancéreuses ¹⁰⁴.

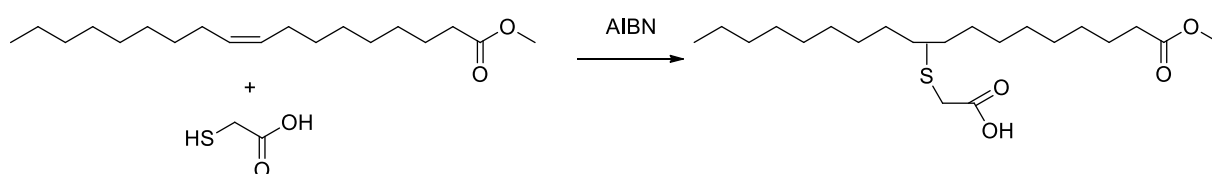


Figure 47 : Réaction thiol entre l'oléate de méthyle et l'acide thioglycolique

Dans l'équipe, Berchel *et al* ont décrit la synthèse de nouveaux bola-amphiphiles par réaction thiol-ène entre un phospholipide comportant des doubles liaisons au bout de la chaîne alkyle et le mercapto-éthanol (*Figure 48*). Le nouveau vecteur a montré de bons résultats de transfection sur les deux lignées A549 et 16HBE testées ¹⁰⁵.

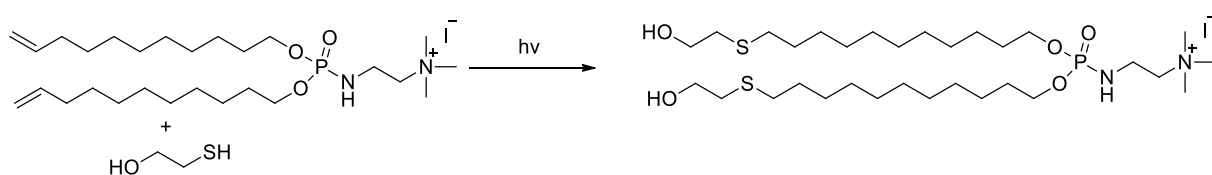


Figure 48 : Exemple de réaction thiol-ène entre un phospholipide et le mercapto-éthanol décrite par Berchel *et al*. ¹⁰⁵

¹⁰³ Y. Zuo, Z. Gou, J. Cao, X. Li, S. Feng, RSC Adv. **2016**, 6, 45193–45201.

¹⁰⁴ S. S. Kaki, S. Arukali, P. V. Korlipara, R. B. Prasad, P. Yedla, C. Ganesh Kumar, Bioorg Med Chem Lett. **2016**, 26, 209-212.

¹⁰⁵ M. Berchel, T. Le Gall, O. Lozach, J. P. Haelters, T. Montier. P. A. Jaffrès, Org. Biomol. Chem., **2016**, 14, 2846–2853.

I. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail est de continuer à explorer la relation structure activités de composés amphiphiles cationiques ou neutres conçus pour la vectorisation d'acides nucléiques. Nous avons envisagé des modifications de structure au niveau de la partie hydrophile et de la partie hydrophobe de ces molécules.

Concernant la modulation de la partie lipidique, les travaux de la littérature et de l'équipe indiquent qu'il est important que ces chaînes puissent comporter un élément structural qui contribue à l'obtention d'assemblages supramoléculaires suffisamment fluides. Jusqu'à présent, la stratégie la plus utilisée consistait à y placer une ou plusieurs insaturations de configuration Z. Celles-ci génèrent un coude dans les chaînes grasses et évitent la formation d'assemblages supramoléculaires compacts et rigides. Cette fluidité des chaînes lipidiques est nécessaire pour que les lipoplexes, après internalisation cellulaire par endocytose, puissent avoir une localisation cytosolique après échappement endosomal. Néanmoins, une première limite de cette stratégie réside dans la stabilité de ces chaînes grasses qui, du fait de la présence des insaturations, peuvent s'oxyder. Par ailleurs, la présence d'insaturations dans les chaînes lipidiques impose des contraintes au niveau de la méthodologie de synthèse. En effet, certaines conditions de réaction comme les réactions d'hydrogénation catalytique ne peuvent pas être utilisées si l'on souhaite préserver ces insaturations. Un des premiers objectifs de ce travail a été de proposer de nouvelles chaînes lipidiques saturées dans lesquels l'élément « perturbateur », pour éviter l'obtention d'assemblages supramoléculaires compacts, est une fonction thioéther. Les angles de valences et les longueurs de liaisons différentes autour d'une fonction thioéther nous conduisent à faire l'hypothèse qu'une fonction thioéther placées dans les chaînes lipidiques serait susceptible de conférer la fluidité requise aux amphiphiles cationiques envisagés. A partir de cette hypothèse nous avons envisagé deux séries de composés comportant, pour la première, une fonction thioéther par chaîne lipidique (chapitre 2) ou deux fonctions thioéthers par chaînes lipidiques (chapitre 3). Un exemple des molécules cibles pour chaque chapitre est représenté sur la *Figure 49*.

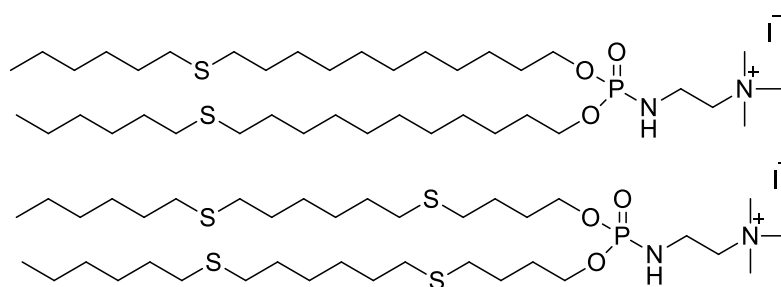


Figure 49 : Structures de vecteurs contenant une ou deux fonctions thioéthers

La seconde partie de ce manuscrit (chapitre 4) porte également sur des modifications de la partie lipidique. Comme indiqué précédemment, la présence d'insaturations dans les chaînes lipidiques facilite l'étape de sortie des lipoplexes des endosomes mais présente quelques inconvénients. Une autre stratégie consiste à utiliser des chaînes lipidiques ramifiées. En effet ces ramifications évitent la formation d'un assemblage supramoléculaire trop compact. De plus ces ramifications peuvent avoir des conséquences sur le type de structure supramoléculaire formé (e.g. lamellaire versus hexagonal). Jusqu'à présent au laboratoire, deux types de chaînes lipidiques ramifiées ont été utilisés. Les chaînes phytanyles (chaînes lipidiques naturelles linéaires ramifiées par 4 groupes méthyles) et des chaînes dont la ramification avait été apportée par réaction thiol-ène. Dans ces deux exemples précédents, nous avons soit des ramifications multiples (4 méthyles) soit une ramification localisée en milieu de chaîne. L'objectif du chapitre 4 vise à utiliser de nouvelles chaînes lipidiques ramifiées, facilement disponibles, et pour lesquelles la ramification est localisée à proximité de la partie polaire. Nous faisons l'hypothèse que ces ramifications devraient donner à l'amphiphile une géométrie conique qui pourra s'auto-assembler de façon non-lamellaire. Une telle structuration devrait faciliter la fusion avec la membrane endosomale lors de la transfection. Un exemple de molécule visé dans ce chapitre 4 est indiqué dans la *Figure 50*.

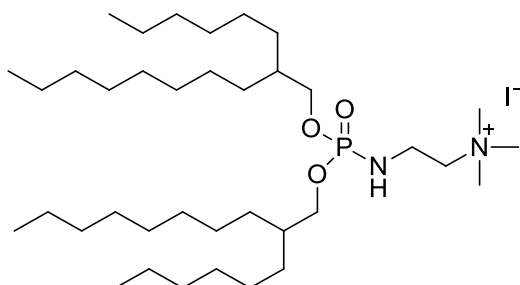


Figure 50 : Exemple de phosphoramidate contenant des chaînes ramifiées envisagées

Chapitre 2 : Lipides cationiques
contenant une fonction thioéther
par chaine lipidique : Synthèse,
caractérisation et étude des
propriétés physico-chimiques et de
transfection.

I. Introduction

L'étape de l'échappement endosomale, est l'une des barrières biologiques majeures limitant l'efficacité de transfection des vecteurs. Le caractère fusogène et la fluidité des composés amphiphiles favorisent les échanges avec la membrane endosomale et par conséquent contribuent à favoriser la libération de l'acide nucléique transporté dans le cytosol après une internalisation par endocytose. En contrepartie, des composés amphiphiles qui seraient trop fluides ou trop fusogènes pourraient conduire à la formation de lipoplexes ayant une stabilité précaire. Si cette instabilité se révèle avant l'internalisation cellulaire, alors une chute de l'efficacité de transfection risque d'être observée. En conséquence, les propriétés physico-chimiques des amphiphiles cationiques doivent répondre à un compromis afin d'optimiser leurs efficacités de transfection. Il est à noter que les propriétés physico-chimiques d'un amphiphile cationique doivent aussi prendre en compte le type d'acide nucléique véhiculé. En effet, l'acide nucléique contribue aussi à la structuration des agrégats supramoléculaires (lipoplexes). De longues séquences d'acides nucléiques (e.g. ADN plasmidique composés de plusieurs milliers de paires de base) auront un rôle structurant plus important que des séquences courtes (e.g. siARN comportant une vingtaine de paires de bases azotées). En conséquence il est intéressant pour le chimiste de développer des composés amphiphiles où une modulation des propriétés physico-chimiques est possible.

Dans le but d'obtenir des vecteurs plus efficaces pour le transfert de gènes, l'équipe « Phosphore et Vectorisation » s'est intéressée à moduler les différents domaines formant les lipides cationiques. La partie hydrophobe de ces molécules s'est avérée particulièrement intéressante à cause de son impact sur les propriétés de transfection, l'organisation supramoléculaires et les propriétés physico-chimiques des lipides cationiques.

Le laboratoire a précédemment montré que les lipides cationiques formés par des chaînes saturées comme les chaînes stéaryle génèrent des liposomes (lipoplexes) rigides et peu efficaces en transfection. Ceci est expliqué par les interactions hydrophobes (interactions de Van der Waals) qui favorisent un assemblage supramoléculaire compact entre les chaînes alkyles.

Afin d'augmenter la fluidité des chaînes lipidiques présentes dans la structure des lipides cationiques, une des stratégies consiste à utiliser des chaînes lipidiques contenant une

insaturation de configuration Z (e.g. chaînes oléyles ; C18 :1). En effet les doubles liaisons de configuration Z entraînent la formation d'un coude dans la chaîne lipidique, conduisant à un assemblage supramoléculaire moins compact des amphiphiles cationiques, du fait d'une limitation des interactions de Van der Waals (*Figure 53*). Ainsi, les amphiphiles bicaténaires comportant deux chaînes hydrophobes mono-insaturées génèrent en milieux aqueux des assemblages lamellaires plus fluide que ceux utilisant des chaînes saturées.¹⁰⁶

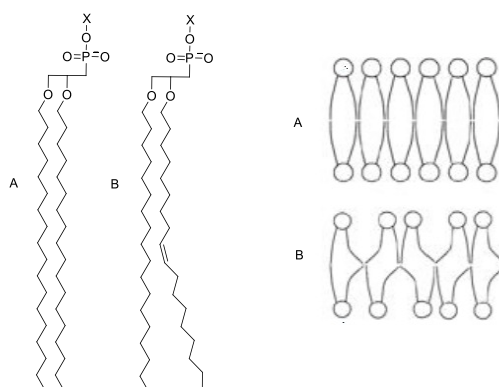


Figure 53 : Schématisation de l'effet de la double liaison sur l'assemblage lamellaire des molécules amphiphiles bicaténaires

Notre équipe a synthétisé des amphiphiles cationiques contenant un nombre variable d'insaturation (0 à 2)¹⁰⁷. Les résultats de transfection *in vivo* ont montré que le composé **BSV 4** (*Figure 54*) avec des chaînes linoléiques comportant deux doubles liaisons est plus efficace *in vivo* en transfection que le composé **KLN 47** possédant des chaînes oléiques contenant une seule double liaison.¹⁰⁸

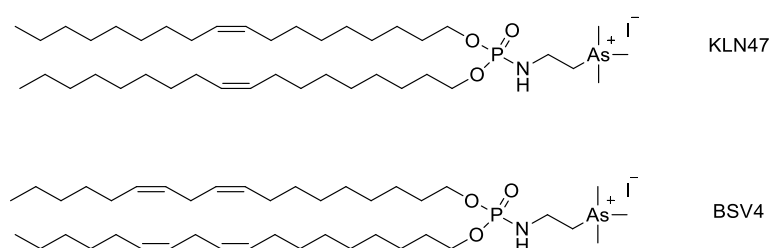


Figure 54 : Structure des lipides cationiques BSV4 et KLN47

¹⁰⁶ A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**, *8*, 163–176

¹⁰⁷ K. Le Ny, *Thèse de doctorat*, **2004**, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

¹⁰⁸ T. Le Gall, D. Loizeau, E. Picquet, N. Carmoy, J. J. Yaouanc, L. Burel-Deschamps, P. Delépine, P. Giamarchi, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1496-1508.

L'étude physico-chimique par anisotropie de fluorescence a montré que le lipide cationique formé par des chaînes linoléiques forme des liposomes plus fluides que le composé formé par les chaînes oléiques contribuant à expliquer l'amélioration des résultats de transfection.

La littérature montre que la majeure partie des composés amphiphiles cationiques utilisés en transfection comporte des chaînes lipidiques d'origine naturelle. En faisant l'hypothèse, que l'efficacité de transfection d'un composé amphiphile, dépend étroitement des propriétés physico-chimiques des assemblages supramoléculaires, nous avons souhaité explorer dans ce chapitre la conception de nouvelles chaînes lipidiques synthétiques. L'idée retenue était de remplacer une insaturation par un hétéroatome. Puisque nous souhaitons conserver la nature hydrophobe des chaînes lipidiques, nous nous sommes intéressés à l'introduction d'une fonction thioéther dans le domaine hydrophobe des amphiphiles cationiques. Notre hypothèse est que cet hétéroatome possède des angles de valences différents de celui du carbone hybridé sp^3 pouvant donc conduire à la formation d'un coude au sein de la chaîne hydrophobe. Des amphiphiles comportant ce type de chaîne devrait donc faire apparaître des assemblages supramoléculaires moins compacts que ceux observés pour des amphiphiles comportant des chaînes carbonées saturées. Nous avons aussi pour objectif de préparer une série homogène de composés afin de pouvoir dégager les paramètres physico-chimiques imputables à la présence de la fonction thioéther.

L'objectif de cette première étude est donc de décrire la synthèse d'une nouvelle famille de lipides cationiques contenant une fonction thioéther dans la chaîne grasse et d'étudier leurs propriétés physico-chimiques et leurs propriétés de transfection. Ce chapitre débute par une présentation bibliographique des composés amphiphiles comportant une fonction thioéther.

II. Étude bibliographique

L'équipe de Mavromoustakos a travaillé sur la synthèse d'amphiphiles neutres analogues de l'édelfosine comportant un motif glycérol et une tête polaire de type phosphocholine (*Figure 55*). Ces molécules sont connues pour leurs propriétés antinéoplasiques.

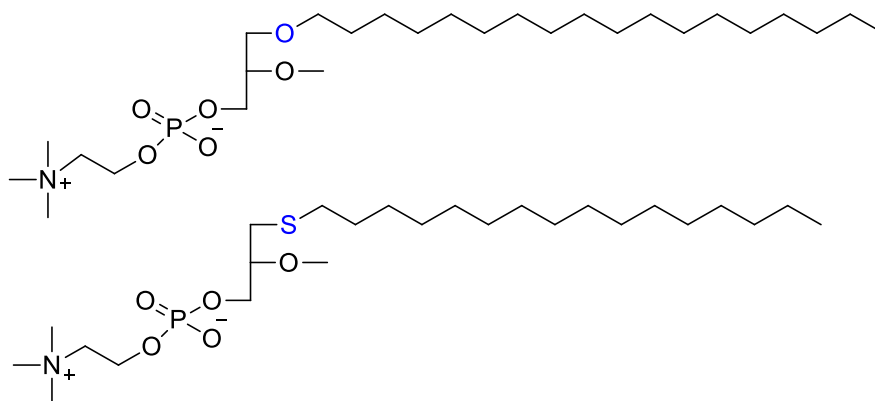


Figure 55: Structure des lipides synthétisés par l'équipe de Mavromoustakos

Lors d'une étude publiée en 1996, ils ont remplacé l'oxygène en position SN1 par un atome de soufre (fonction thioéther) ¹⁰⁹. Ils ont remarqué une flexibilité importante de la chaîne alkyle qui serait assurée par la fonction thioéther.

Dans un autre contexte, Dobner *et al* ont synthétisé une nouvelle famille de bola-amphiphiles où ils ont remplacé deux groupements méthylène par deux fonctions éther ou thioéther ¹¹⁰.

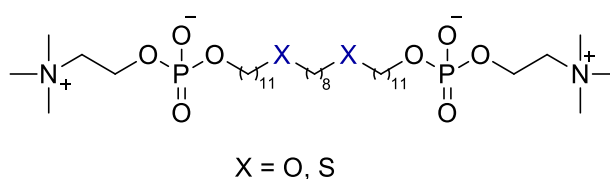


Figure 56 : Bola-amphiphiles synthétisés par Dobner *et al* ¹¹⁰

Les modélisations des molécules synthétisées montrent la présence d'un coude dans le cas où des atomes de carbone de l'espaceur lipidique sont remplacés par des atomes de soufre. Les auteurs attribuent l'existence de ces coudes aux longueurs et angles de liaison C-C, C-O, C-S (Tableau 1).

	Longueur de liaison	Angle de liaison
C-C / C-C-C	0.153 Å	113.5°
C-O / C-O-C	0.142 Å	113.3°
C-S / C-S-C	0.181 Å	96.1°

Tableau 1 : Valeurs des angles et longueurs de liaison

¹⁰⁹ T. Mavromoustakos, E. Theodoropoulou, D. P. Yang. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1996**, 84, 21-34.

¹¹⁰ S. Drescher, A Meister, G. Graf, G. Hause, A. Blume, B. Dobner, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 6796 – 6804.

D'autre part, cette équipe a aussi montré que contrairement à l'oxygène qui augmente considérablement la polarité de la chaîne grasse, la fonction thioéther permet de garder le caractère hydrophobe de la chaîne alkyle.

L'influence de la substitution d'un groupe méthylène (CH₂) par un atome de soufre a été aussi étudiée par Mirjafari *et al.* Dans le but d'examiner l'effet que peut avoir une fonction thioéther sur les températures de fusion des liquides ioniques. L'équipe a synthétisé diverses molécules contenant un atome de soufre dans des positions différentes de la chaîne alkyle. Ils ont remarqué que la présence d'une fonction thioéther dans la partie hydrophobe du liquide ionique entraîne une diminution de la température de fusion de ces molécules par rapport à leurs analogues contenant une chaîne stéaryle ou une chaîne oléyle (*Figure 57*)¹¹¹.

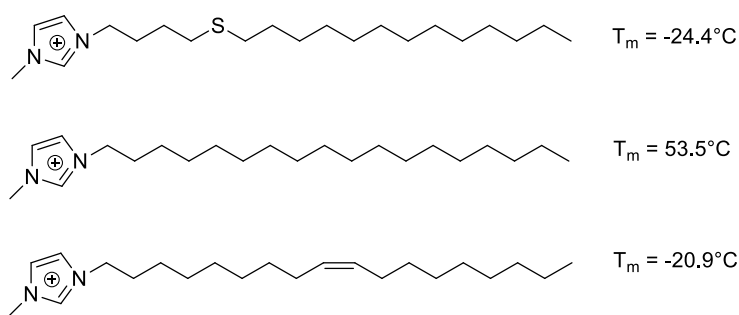


Figure 57 : Comparaison des valeurs de T_m de différents liquides ioniques

La liaison C-S étant plus longue que la liaison C-C et l'angle de liaison C-S-C étant plus petit que l'angle C-C-C, la présence d'une fonction thioéther induit un coude et contribue à réduire la cohésion des assemblages supramoléculaires comme peut le faire la présence d'une insaturation de configuration Z

Cependant la diminution des températures de fusion des liquides ioniques engendrée par la fonction thioéther dépend de la position du soufre dans la partie grasse comme le montre la *Figure 58*. La plus basse température de fusion pour cette série de molécule est obtenue quand le soufre est en position 5 dans une chaîne de 18 atomes. Il est aussi à noter que quand le soufre est situé aux extrémités de la chaîne alkyle les températures obtenues sont proches de celles obtenues avec la chaîne stéaryle saturée (*Figure 58*).

¹¹¹ R. A. O'Brien., A Mirjafari., K. M. Mattson, J. Phys. Chem. B. **2014**, 118, 10232–10239.

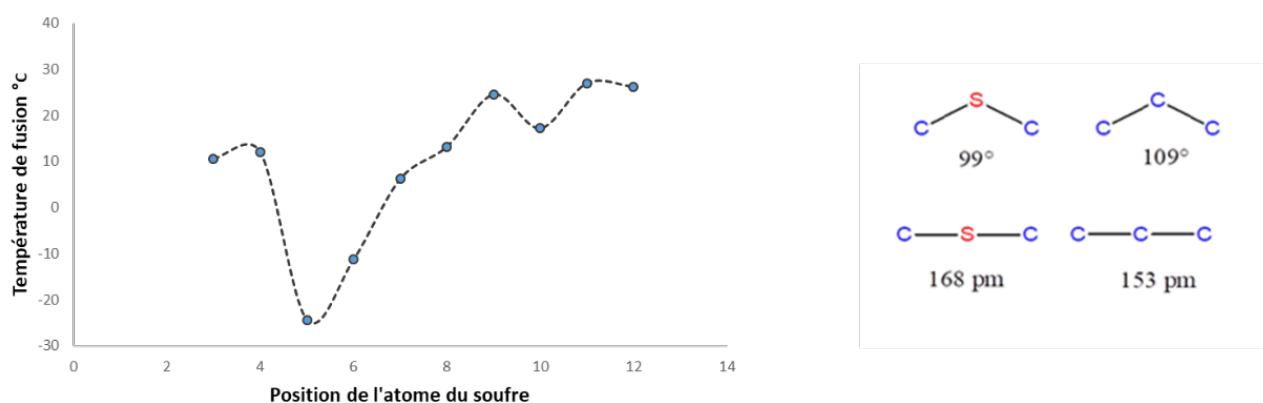


Figure 58 : Variation de la température de fusion des liquides ioniques en fonction de la position de l'atome du soufre dans la partie hydrophobe

Une deuxième étude publiée par la même équipe en 2017 indique que des liquides ioniques synthétisés par réaction click thiol-yne ¹¹² (Figure 59) peuvent être considérés comme des bons candidats pour le transfert d'acides nucléiques sans que les conséquences physico-chimiques de la présence des atomes de soufre dans la structure moléculaire ne soit détaillée dans cette étude.

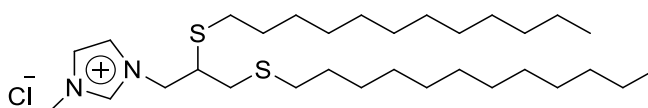


Figure 59 : Structure des liquides ioniques synthétisés par l'équipe de Mirjafari ¹¹²

En se basant sur l'ensemble de ces études, il s'avère que l'introduction d'une fonction thioéther dans la chaîne grasse des phosphoramides pourrait être une nouvelle stratégie pour introduire du désordre dans le domaine hydrophobe, et ainsi, améliorer la fluidité et potentiellement le caractère fusogène de ces molécules. Il apparaît également que la position de la fonction thioéther dans la chaîne lipidique a une grande incidence sur les propriétés physico-chimiques.

Ce chapitre sera alors consacré à la synthèse d'une famille de 4 nouveaux lipides cationiques contenant deux chaînes lipidiques possédant chacune une fonction thioéther en différentes position (4, 6, 10 et 12). Par ailleurs, ces chaînes lipidiques auront toute un commun de

¹¹² J. Gaitora, L. Paulb, A. Mirjafari, Chem Commun (Camb). **2017**, 20, 8328–8331.

posséder un squelette de 18 atomes. Dans tous les cas la partie polaire cationique sera identique (cation triméthylammonium).

Les propriétés de transfection et les propriétés physico-chimiques des nouveaux lipides cationiques seront comparés à deux molécules de références. Le **BSV 36** formée par deux chaînes oléiques (C18 :1) et une tête triméthylammonium, et **BSV 101** formée d'une chaîne saturée (chaîne stéaryle, C18 :0) et une tête polaire triméthylammonium.

Comme le montre la *Figure 60*, la série de molécules est homogène avec comme seul point de variation structurale la structure des chaînes lipidiques. Cette homogénéité de structure nous permettra de dégager les conséquences induites par la présence des fonctions thioéther sur les propriétés physico-chimiques et les efficacités de transfection.

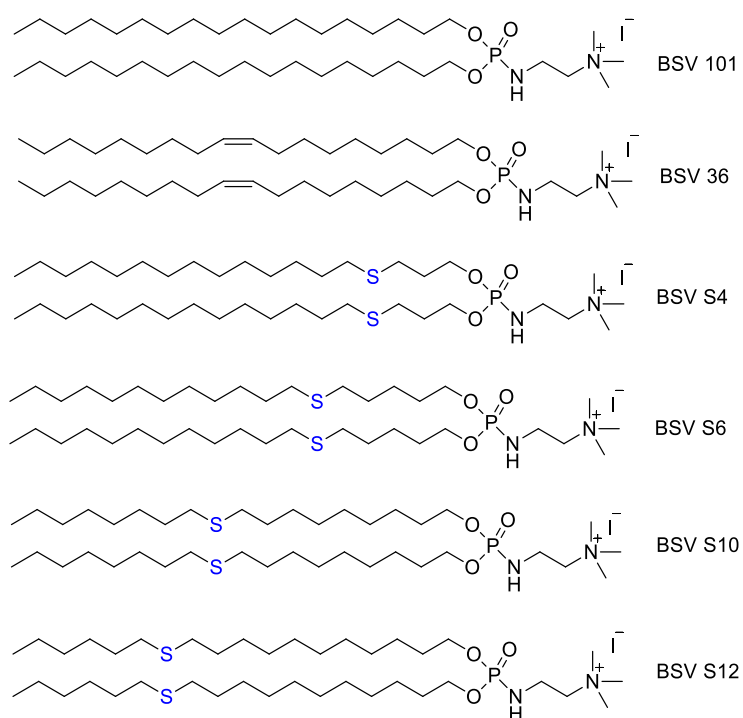


Figure 60 : Structures des lipides cationiques synthétisés

III. Synthèse de lipophosphoramides contenant une seule fonction thioéther par chaîne lipidique.

Cette partie se consacre à la description de la voie de synthèse permettant d'accéder aux différents lipophosphoramides cationiques contenant une fonction thioéther dans chaque chaîne alkyle.

1. Synthèse du phosphite

La première étape de synthèse consiste à la synthèse du phosphite à partir d'un alcool contenant une double liaison terminale. Afin de varier la position de l'atome de soufre dans la chaîne grasse quatre alcools commerciaux de longueurs différentes sont choisis (*Tableau 2*).

Alcool	Nombre d'atome de carbone dans la chaîne
Alcool allylique	3
4-Pentène-1-ol	5
8-Nonen-1-ol	9
10-Undecen-1-ol	11

Tableau 2 : Liste d'alcools commerciaux utilisés pour la synthèse de lipides cationiques

Deux méthodes ont été utilisées selon la longueur de la chaîne alkyle de l'alcool utilisé

Méthode 1 :

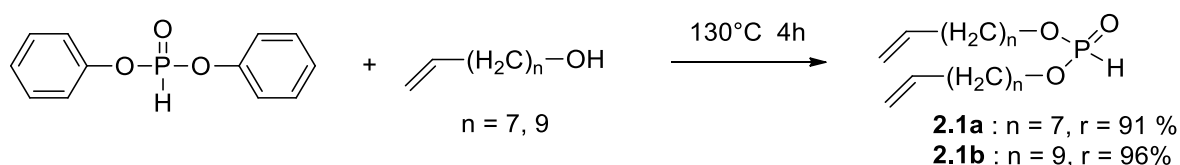


Figure 61 : Synthèse des phosphites **2.1a** et **2.1b** par réaction de transestérification

Il s'agit d'une réaction de transestérification entre l'alcool et le diphenyl-phosphite. Le mélange est placé dans un montage adapté au Kugelrohr (four à boules) puis chauffé à 130°C à pression réduite (4×10^{-2} mbar) pendant 2h. Le phénol formé au cours de cette réaction est éliminé au fur et à mesure par sublimation¹¹³. Les phosphites attendus **2.1a** et **2.1b** sont obtenus avec des rendements quantitatifs et à une échelle de plusieurs grammes (5 g). La RMN ^{31}P (*Figure 62*) mais aussi ^1H attestent de la pureté satisfaisante des phosphites obtenus.

¹¹³M. F. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon-Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *Biomaterials*. **2012**, 33, 6240-6253.

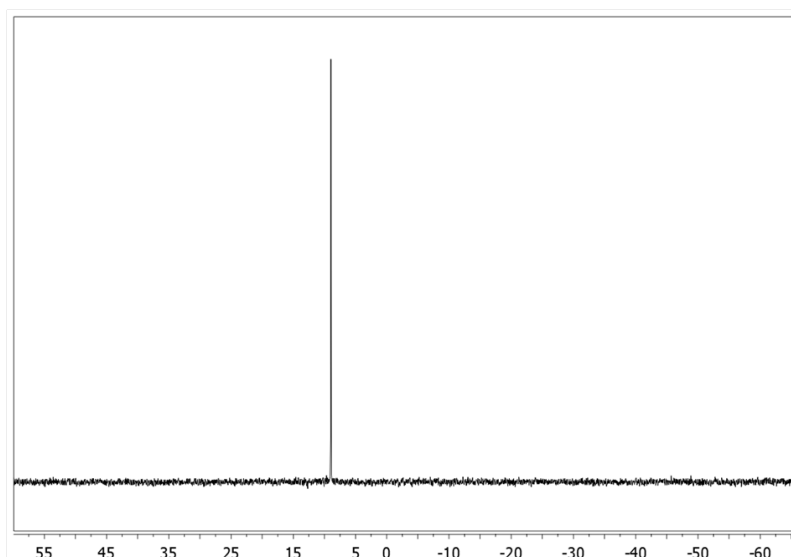


Figure 62 : Spectre RMN ^{31}P (CDCl_3) du composé **2.1a**

Méthode 2 :

La méthode 1 n'est cependant pas adaptée pour des alcools à courtes chaînes dont les températures d'ébullition sont inférieures à 135°C (alcool allylique et pentène-1-ol). Ainsi une deuxième méthode est utilisée pour la synthèse des phosphites (Figure 63). Le procédé consiste à ajouter goutte à goutte un mélange de triéthylamine et d'alcool à une solution de trichlorure de phosphore PCl_3 dans le toluène à 0°C au bout de 2h. un troisième équivalent d'alcool est ajouté et la réaction se poursuit toute la nuit à température ambiante¹¹⁴.

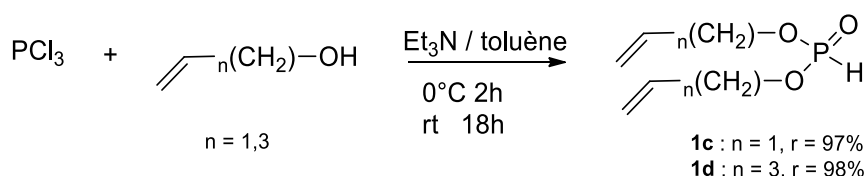


Figure 63 : Synthèse de phosphite à partir de PCl_3

Cette méthode a été appliquée à la préparation des phosphites possédant les chaînes carbonées les plus courtes. Les produits attendus sont isolés avec des rendements quantitatifs, sans étapes de purification et en quantité suffisante (2 à 3 g). Les spectres de RMN ^{31}P et ^1H attestent de la bonne pureté des composés.

¹¹⁴T.W. Kassa, N. Zhang, A. F. Palmer, J. S. Matthews. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol*, **2013**, 41, 109-115.

2. Couplage Atherton-Todd

Les phosphites obtenus sont par la suite engagés dans un couplage d'Atherton-Todd. Il s'agit de faire réagir le phosphite avec une amine primaire (ici la *N,N* diméthyléthylènediamine) en présence d'une base *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) et du bromure de trichlorométhane (BrCCl_3) dans le dichlorométhane (Figure 64)¹¹⁵.

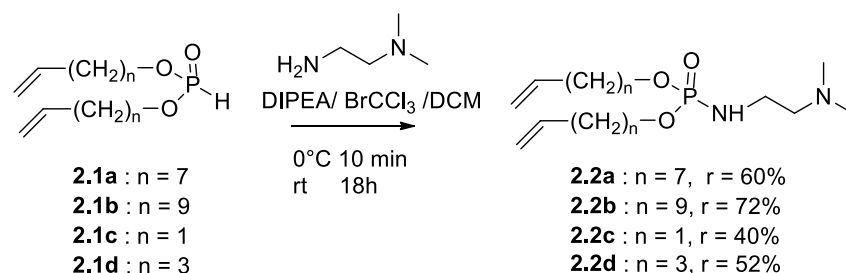


Figure 64 : Couplage Atherton-Todd

La présence du produit est confirmée par RMN ^{31}P avec la disparition du pic du phosphite à 8.7 ppm et l'apparition d'un pic à 10.2 ppm (Figure 65). Une chromatographie sur gel de silice permet d'obtenir le composé pur avec un rendement de 40 à 72%.

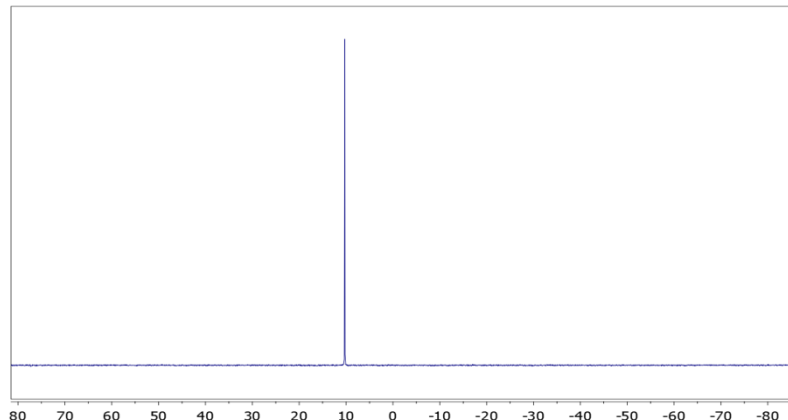


Figure 65 : Spectre RMN ^{31}P (CDCl_3) du composé **2.2a**

3. Quaternarisation

L'étape suivante est l'introduction de la tête polaire par quaternarisation de l'amine tertiaire. L'équipe a montré précédemment que les phosphoramides contenant une tête

¹¹⁵S. S Le Corre, M. Berchel, H. Couthon-Gourvès, J. P. Haelters, P. A. Jaffrès, Beilstein J. Org. Chem. **2014**, 10, 1166–1196.

triméthylammonium présentent l'avantage d'être facile d'accès et peuvent être obtenu à l'échelle de gramme.

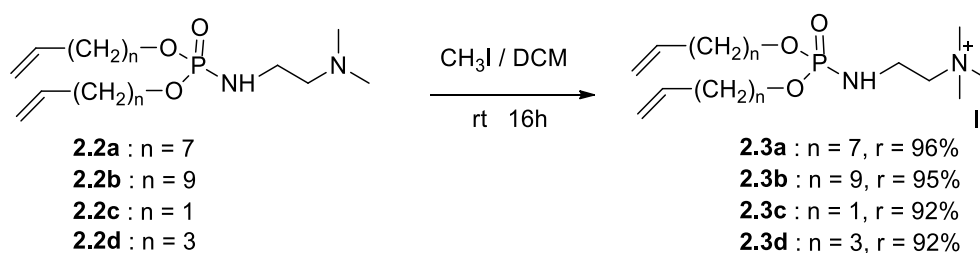


Figure 66 : Réaction de quaternarisation

La réaction consiste à ajouter un excès d'iodométhane au phosphoramidate dissout dans le dichlorométhane (Figure 66). L'évolution de la réaction peut être suivie par RMN ^{31}P où il est possible d'observer la disparition du pic du phosphoramidate à 10.2 ppm et l'apparition d'un nouveau pic à 8.9 ppm (

Figure 67). Le produit final est obtenu après évaporation du solvant et de l'excès d'iodométhane

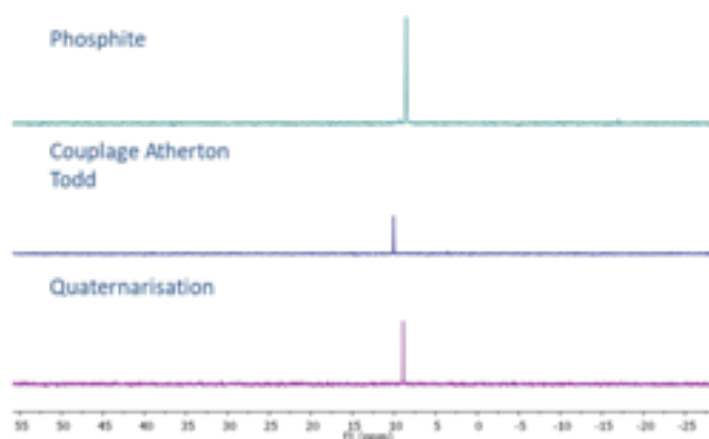


Figure 67 : Suivi par RMN ^{31}P (CDCl_3) des différentes étapes de la synthèse des lipides cationiques

4. Réaction thiol-ène

La dernière étape de synthèse est une réaction thiol-ène qui permet l'addition d'un thiol sur une double liaison (Figure 68). Le phosphoramidate obtenu lors de la réaction précédente est mis dans un tube de Schlenk avec une quantité catalytique du photo-initiateur (DMPA) et le

thiol correspondant. Le mélange est par la suite dégazé sous azote puis irradié pendant la nuit sous UV à 365 nm.

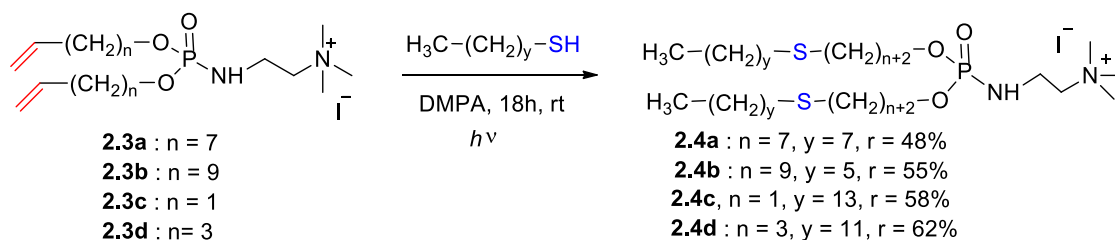


Figure 68 : Synthèse de lipide cationiques par réaction thiol-ène

Le choix du thiol est fait dans le but d'avoir une longueur totale de 18 atomes dans la chaîne alkyle du phosphoramidate. Quatre thiols commerciaux sont ainsi choisis, ils sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Thiol commercial	Longueur de la chaîne	Alcool correspondant	Longueur totale de la chaîne grasse
Tétradécane thiol	15 Atomes	Alcool allylique	18 Atomes
Dodécane thiol	13 Atomes	4-pentène-1-ol	18 Atomes
Octane thiol	9 Atomes	8-nonène-1-ol	18 Atomes
Hexane thiol	7 Atomes	10-undécène-1-ol	18 Atomes

Tableau 3 : Liste de thiols commerciaux choisis pour les réactions thiol-ène

L'évolution de cette réaction peut être suivie par RMN ^1H où il est possible de voir la disparition des signaux correspondant aux protons portés par la double liaison et l'apparition d'un signal correspondant aux protons portés par le carbone en alpha de l'atome de soufre (Figure 69).

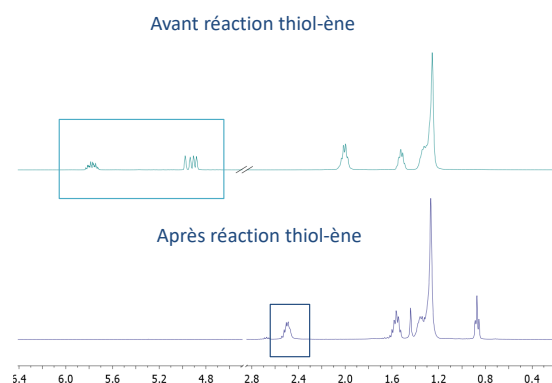


Figure 69 : Suivi RMN ^{31}P et ^1H de la réaction thiol-ène

Le produit est par la suite purifié par chromatographie sur gel de silice pour donner les produits finaux avec des rendements entre 48 à 62%.

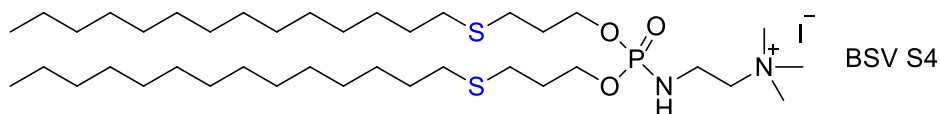


Figure 70 : Structure du composé **2.4c** (BSV S4)

La nomenclature des nouveaux vecteurs est faite comme suit BSV SX: BSV pour Brest Synthetic Vector et X présentant la position de l'atome de soufre dans la chaîne alkyle (*Figure 70*). Les rendements globaux des différents composés sont présentés dans le tableau suivant.

Composé	Rendement Global (masse g)
2.4a BSV S10	25 % (0,6 g)
2.4b BSV S12	36 % (1,3g)
2.4c BSV S4	20 % (0,6 g)
2.4d BSV S6	29 % (0,9 g)

Tableau 4 : Rendements globaux des différents lipides cationiques synthétisés

5. Synthèse des composés de référence

La synthèse des deux composés de référence (**BSV 36** et **BSV 101**) a été réalisée comme décrit dans la littérature (*Figure 71*)¹¹⁶. La première étape est la préparation de phosphite par réaction de transestérification entre l'octadecan-1-ol ou l'alcool oléique et le diphenyle phosphite. Il s'en suit un couplage Atherton-Todd permettant l'obtention du phosphoramidite. Finalement la quaternarisation de la fonction amine tertiaire par ajout d'un excès d'iodométhane permet l'obtention des deux composés de référence avec des quantités suffisantes (environ 4g).

¹¹⁶ S. S. Le Corre, M. Berchel, N. Belmadi, C. Denis, J. P. Haelters, T. Le Gall, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 1463-1474.

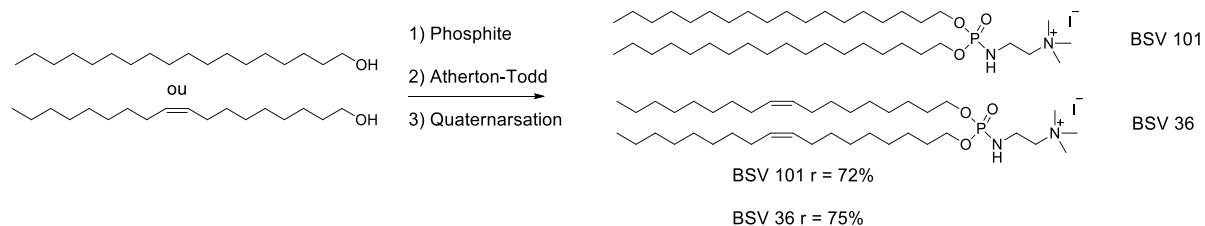


Figure 71 : Synthèse des lipides cationiques de références **BSV 36** et **BSV 101**

L'objectif des travaux de la thèse est d'étudier l'impact des domaines hydrophobes et hydrophiles des amphiphiles cationiques ou neutres sur leurs propriétés physico-chimiques d'une part et sur leurs propriétés de transfection d'un autre. Pour atteindre cet objectif plusieurs techniques ont été utilisées.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la présentation des différentes techniques physico-chimiques utilisées permettant de caractériser les molécules synthétisées. Cette partie intègre également les méthodes utilisées par les collègues biologistes, de l'équipe du Pr Tristan Montier, partenaires de ce projet, pour l'évaluation de l'efficacité de transfection et l'évaluation de la toxicité des nouvelles formulations.

II. Présentation des différentes techniques physico-chimiques et de transfection utilisées

1. Préparation et caractérisation des solutions liposomales.

Les amphiphiles cationiques ont la capacité de s'auto-assembler en milieu aqueux pour former des liposomes. Il existe plusieurs procédés expérimentaux permettant la préparation de solutions liposomales. Le choix de la méthode dépend de plusieurs paramètres tels que la nature des molécules synthétisées ou le type de liposomes que l'on souhaite obtenir. Parmi ces méthodes, il est possible de citer l'injection éthanolique, ou encore l'hydratation de film lipidique qui reste la méthode la plus utilisée pour la préparation des solutions liposomales

4.1 1.1 Injection éthanolique

Dans ce procédé, les composés amphiphiles sont dissous dans l'éthanol puis injectés à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse soumise à forte agitation. Cette méthode ne permet cependant pas d'obtenir des particules de tailles uniformes.

5.1 1.2 Hydratation d'un film lipidique.

C'est en 1965 que Bangham *et al* ont décrit la formation des liposomes par hydratation de films phospholipidiques¹¹⁷.

Cette technique consiste à dissoudre le composé amphiphile ou le mélange de composés amphiphiles dans un solvant organique, généralement le chloroforme. Le solvant est par la suite éliminé par évaporation à l'évaporateur rotatif à faible température afin de former un film de faible épaisseur sur les parois du tube (*Figure 72*).

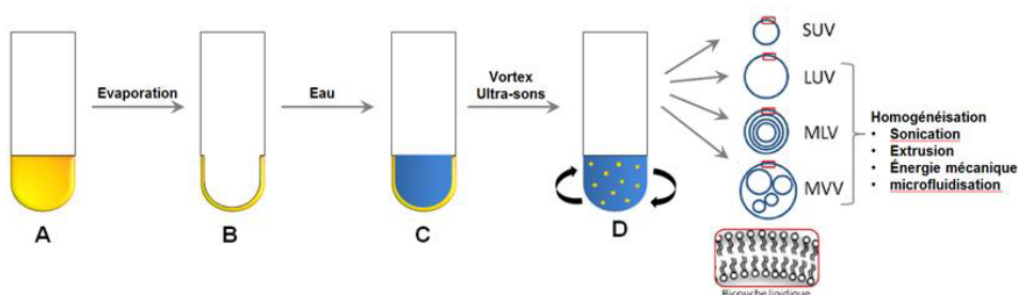


Figure 72 : Préparation des solutions liposomales par la méthode d'hydratation de film lipidique

L'hydratation s'effectue par la suite par ajout d'une solution aqueuse ou d'un tampon au film formé. Le temps d'hydratation peut être très variable selon la capacité du composé à s'hydrater (de quelques heures à plusieurs jours). Il se forme ainsi des vésicules multilamellaires (Multilamellar Vesicles MLV) de grandes tailles (de l'ordre du micromètre). Les tailles des liposomes obtenus sont par ailleurs très hétérogènes. Afin de réduire et d'homogénéiser les tailles des particules formées¹¹⁸, les solutions sont placées dans un bain à ultrasons. Le temps de sonication et la température du bain peuvent influencer la taille des vésicules obtenues¹¹⁹.

Il est à noter que ces solutions liposomales, formées d'une ou de plusieurs couches de bicouches de composés amphiphiles et contenant un cœur aqueux, sont utilisés en

¹¹⁷ A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*, 238-252.

¹¹⁸ J. Perrin, D. Gammack, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1962**, *14*, 567-572.

¹¹⁹ T. Yamaguchi, M. Nomura, T. Matsuoka, S. Koda, *Chem. Phys. Lipids*, **2009**, *160*, 58–62.

cosmétologie¹²⁰ ou en pharmacologie¹²¹ pour l'encapsulation et la vectorisation des principes actifs par exemple.

2. Méthode permettant le contrôle de la taille des liposomes

6.1 2.1 Les ultrasons

C'est la méthode la plus utilisée pour former des liposomes de petites tailles (Small Unilamellar Vesicles SUV) à partir des vésicules multi-lamellaires MLV. Les solutions liposomales préparées sont soumises à l'effet des ultrasons soit par l'utilisation d'un bain à ultrasons dans lequel est placées des tubes à hémolyse contenant la solution liposomale, soit en plongeant une sonde à ultrasons directement dans la solution.

7.1 2.2 L'extrusion sur membrane de polycarbonate

Afin de mieux contrôler la taille des liposomes que l'on souhaite avoir, une des méthodes les plus utilisées est l'extrusion. La méthode consiste à extruder (à plusieurs reprises) la solution liposomale à travers une membrane de polycarbonates poreux dont la taille des pores est contrôlée.

8.1 2.3 Méthode de congélation décongélation « freeze-thaw method »

A partir d'une suspension de liposomes préparée par la méthode d'hydratation de film lipidique précédemment présentée, cette technique consiste à appliquer plusieurs cycles de congélation (dans l'azote liquide à -198°C) et décongélation (dans l'eau chaude à 50°C)¹²². La fusion des Small Unilamellar Vesicles (SUV) au cours de ce processus permet la formation des Large Unilamellar Vesicles (LUV) ou des Multilamellar Large Vesicles (MLV). Cette méthode est utilisée pour augmenter le taux d'encapsulation d'un composé dans les vésicules formées¹²³. Elle est cependant fortement inhibée par l'augmentation de la force ionique du milieu. Cette méthode peut aussi être utilisée pour homogénéiser des solutions liposomales de très forte concentration.

¹²⁰Y. Rahimpour, H.Hamishchkar, Expert Opin Drug Deliv. **2012**,9, 443-455.

¹²¹H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, A. Akbarzadeh, Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol, **2016**, 44, 381-391.

¹²²M. Traikia, D. E. Warschawski, M. Recouvreur, J. Cartaud, P. F. Devaux, Eur Biophys J, **2000**, 29, 184-195.

¹²³ A. P. Costa , X. Xu, D. J. Burgess, Pharm. Res, **2014**, 31, 97-103.

3. Caractérisation des solutions liposomales par DLS

La taille des nanoparticules formées est un paramètre important pouvant influencer leurs propriétés comme le mode d'entrée dans la cellule.¹²⁴ Il est donc important d'évaluer la taille des nanoparticules mais aussi d'avoir une estimation de leurs polydispersités. La diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la taille des liposomes et des lipoplexes.

Découvert par Brown en 1827¹²⁵ la méthode consiste à mesurer les mouvements d'une particule soumise uniquement au choc avec des molécules du solvant (mouvement Brownien). La DLS est une technique spectroscopique non destructive. Elle permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Celui-ci correspond au diamètre de la particule auquel s'ajoute l'épaisseur de la couche diffuse et la couche de Stern. La valeur obtenue dépend de la concentration, du pH, de la force ionique du milieu et de la température.

Le principe de la méthode se base sur la mesure de la variation au cours du temps de l'intensité de la lumière diffusée. Plus la particule est petite plus elle est mobile et par conséquent plus la variation de l'intensité de la lumière diffusée est élevée et inversement.



Figure 73 : Zetasizer utilisé pour la mesure de la taille et du potentiel zêta des nanoparticules formées

L'appareil permet de mesurer le coefficient de diffusion translationnelle. Le diamètre hydrodynamique est par la suite calculé par la loi de Stokes-Einstein (Équation 1).

$$D = \frac{k T}{6 \pi r \mu} \quad (1)$$

¹²⁴ J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* **2004**, 377, 159–169.

¹²⁵ R. Brown, *Philosophical Magazine*, **1828**, 4, 161-173.

Loi de Stokes Einstein : où D : coefficient de diffusion, T : température en Kelvin, r : rayon de la particule, k :
Constante de Boltzmann, μ : viscosité dynamique

Dans notre cas les mesures sont faites sur un Zetasizer Nano ZS de Malvern (*Figure 73*). Cet appareil permet de mesurer les tailles des agrégats dans des solutions fortement ou faiblement concentrées grâce à son analyseur à deux angles.

4. Détermination du potentiel zêta

Le potentiel zêta des particules représente leurs charges électrostatiques surfaciques en fonction de leur environnement ionique. Les valeurs obtenues dépendent de la charge de la molécule et de la force ionique du milieu et du pH.

Lors de leur stockage, les nanoparticules ont tendance à s'agréger. En effet, quand le potentiel zêta est proche de zéro les forces interparticulaires diminuent et les forces attractives deviennent plus importantes entraînant ainsi l'agglomération des particules. En revanche, quand le potentiel zêta est élevé (en valeur absolue) les forces répulsives interparticulaires deviennent plus importantes ce qui augmente la stabilité colloïdale de la formulation.^{126 127}

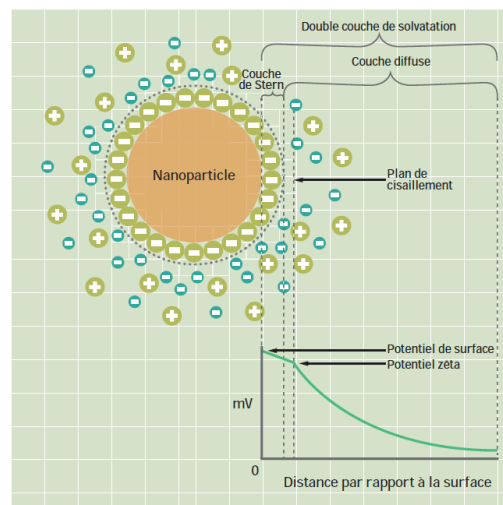


Figure 74 : Présentation du potentiel zêta¹²⁸

La mesure du potentiel zêta est effectuée par le même équipement utilisé pour déterminer la taille des particules qui permet ces deux analyses. Cet équipement utilise la méthode

¹²⁶ La mesure du potentiel Zêta pour comprendre, stabiliser et contrôler : <http://nano.sd-tech.com/files/fr/pdf/publication/2017/Zeta.pdf>, consulté le 05/05/2019.

¹²⁷ G. W. Lu, Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems, 2010, 59-94.

¹²⁸ SMLS : "static multiple light scattering", technologie de mesure de l'appareil Turbiscan de la société Formulation.

d'électrophorèse capillaire associée à un interféromètre laser à effet doppler. Pour la mesure du potentiel zêta, une cuve dotée d'électrode est nécessaire (Figure 75).

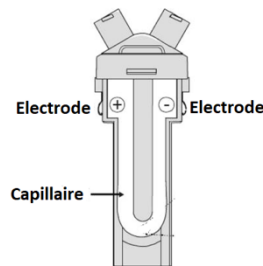


Figure 75 : Cuve utilisée pour la mesure du potentiel zêta¹²⁹

La méthode peut être décrite comme suit : un faisceau laser passe à travers l'échantillon contenu dans un capillaire soumis à une tension grâce à deux électrodes situées de chaque côté de la cellule. Le mouvement des particules entraîne un décalage en fréquence de la lumière diffusée. Ce décalage est directement proportionnel à la mobilité électrophorétique des particules et alors à leur potentiel zêta.

5. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

Les phospholipides synthétisés au cours de ce travail sont des molécules amphiphiles formées d'une partie hydrophobe et d'une tête polaire cationique hydrophile.

En milieu aqueux, afin de satisfaire leur double affinité ces molécules se placent à l'interface eau / air (*Figure 76 zone I*). En augmentant la concentration la plupart des molécules restent à l'interface ce qui entraîne la chute de la tension superficielle (*zone II*). A partir d'une certaine concentration l'interface devient saturée et les molécules commencent à s'agréger.

La Concentration d'Agrégation Critique (CAC) désigne la concentration au-dessus de laquelle les amphiphiles cationiques passent d'un état monomère à la formation d'agrégats en solution aqueuse.

¹²⁹Zeta deviation larger than the mean how can that be? consultée sur : <https://www.materials-talks.com/blog/2015/09/24/zeta-deviation-larger-than-the-mean-how-can-that-be/> consulté le **18/06/2019**.

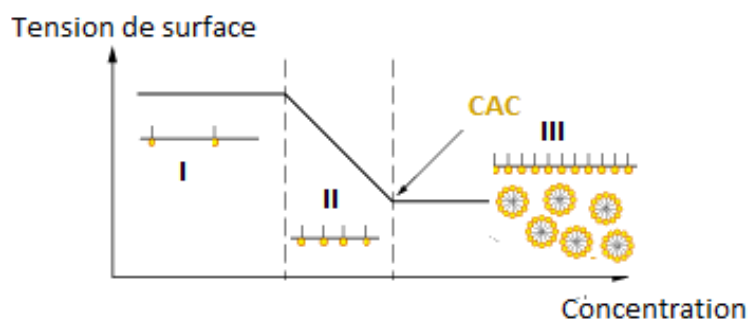


Figure 76 : Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du tensioactif. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la détermination de la CAC tel que la conductimétrie ¹³⁰, la calorimétrie ¹³¹ ou la fluorescence ¹³².

Au cours de ces travaux la concentration d'agrégation critique est déterminée par fluorescence, en utilisant la sonde fluorescente rouge du Nil dont la structure est présentée sur la *Figure 77*.

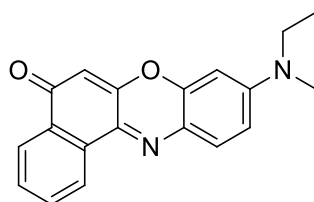


Figure 77 : Structure du rouge du Nil utilisé pour les mesures de la concentration d'agrégation critique

Il s'agit d'une sonde hydrophobe largement utilisée pour la détermination des concentrations micellaires critiques pour les solutions liposomales^{133, 134}. Le rouge du Nil possède des propriétés solvatochromiques avec un spectre d'émission qui se déplace de 630-635 nm en milieu apolaire à 660 nm en milieu polaire. Elle est capable d'établir des liaisons hydrogènes avec les solvants protiques ce qui rend son émission dans l'eau très faible.

¹³⁰ K. Nesmerak, I. Nemcova, *Analytical Letters*, **2006**, 39, 1023–1040.

¹³¹ W. Loh, C. Brinatti, K. C. Tam, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2016**, 1860, 999–1016.

¹³² P. Goon, C. Manohar, V. V. Kumar, *J. Colloid Interface Sci*, **1997**, 189, 177-180.

¹³³ F. R. Alves, M. E. D. Zaniquelli, W. Loh, E. Feitosa, *J. Colloid Interface Sci*, **2007**, 316, 132–139.

¹³⁴ M.C.A. Stuart, J. C. Van de Pas, J. B. F. N. Engberts, *J. Phys. Org. Chem*, **2005**, 18, 929-934.

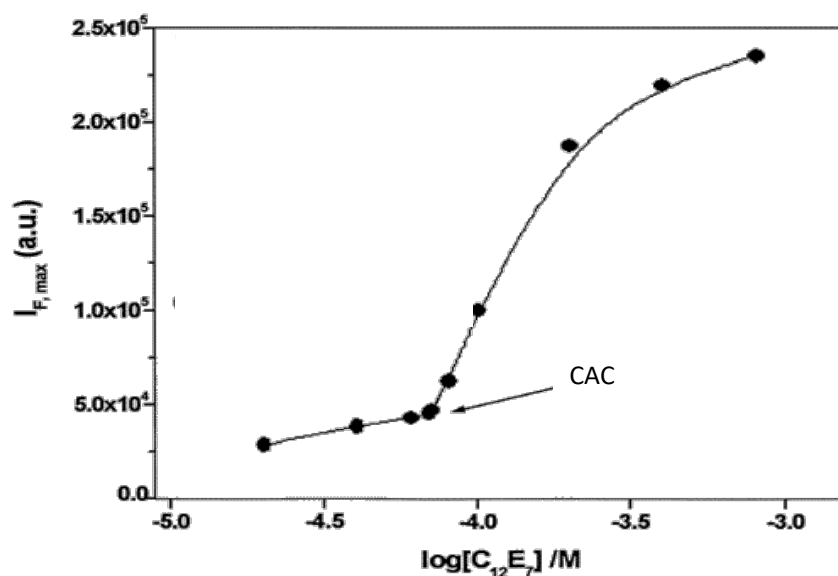


Figure 78 : Évolution de l'intensité maximale d'émission du rouge du Nil en fonction de la concentration en phospholipide¹³⁵

A faible concentration en amphiphile cationique le rouge du Nil est soluble dans l'eau et le maximum d'émission correspond à celui où il est en solution aqueuses (660 nm). En augmentant la concentration, un décalage du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus faible est observé. La valeur de CAC correspond au début de l'augmentation de l'intensité de fluorescence comme le montre la *Figure 78*.

6. Anisotropie de fluorescence

La fluidité de la bicouche lipidique formant le liposome est un facteur important permettant de faciliter le processus de la libération de l'ADN véhiculé au sein d'un lipoplexe ^{136, 137}. La technique d'anisotropie de fluorescence est un outil intéressant pour estimer cette fluidité et pour déterminer la température de transition de phases (T_m) des lipides cationiques synthétisés.

La fluidité de la bicouche lipidique varie en fonction de la température. En effet, quand la température est inférieure à la T_m les chaînes alkyles du domaine hydrophobe sont ordonnées, étirées au maximum et peu mobile (état gel). L'augmentation de la température

¹³⁵ P. J. G. Coutinho, E. M. S. Castanheira, M. C. Rei, M. E; C. D. Real Oliveira, J. Phys. Chem. B, **2002**, 106, 12841-12846.

¹³⁶ D. F. Zhi, S. B. Zhang, B. Wang, B. L. Yang, S. J. Yu, Bioconjugate Chem. **2010**, 21, 563–577.

¹³⁷ T. Shimanouchi, H. Ishii, N. Yoshimoto, H. Umakoshi, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **72**, **2009**, 1–5.

entraîne l'augmentation de la mobilité des molécules. Au-dessus de la température de transition de phase les chaînes hydrocarbonées deviennent plus désordonnées et les bicouches lipidiques passent à l'état fluide (état cristal liquide) (Figure 79)¹³⁸.

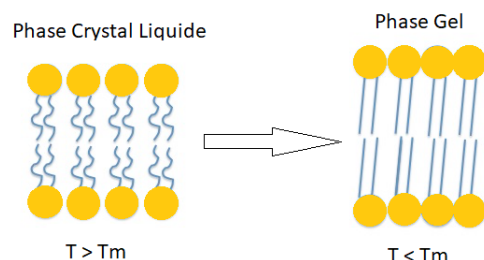


Figure 79 : Transition de phase des molécules amphiphiles par variation de la température. La valeur de la température de transition de phase dépend étroitement de la nature de la partie hydrophobe des molécules¹³⁹ (longueur de la chaîne, degré d'insaturation, ramification). Plus les chaînes hydrocarbonées sont longues plus la température de transition de phase est élevée. En revanche, l'utilisation de chaînes insaturées ou ramifiées entraînent la diminution de la valeur de T_m .

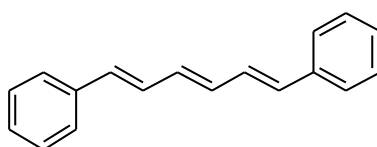


Figure 80 : Structure du diphénylhexatriène

L'anisotropie de fluorescence d'une sonde hydrophobe comme le diphénylhexatriène (Figure 80) permet d'estimer la fluidité du milieu dans lequel se trouve la sonde. En effet l'anisotropie est corrélée à la vitesse de diffusion rotationnelle de la sonde, elle-même liée, entre autre, à la viscosité du milieu. Une anisotropie faible indique une diffusion rapide donc un milieu peu visqueux qu'on peut aussi qualifier de fluide. Dans le cas contraire, une forte anisotropie indique une diffusion lente donc un milieu visqueux¹⁴⁰.

¹³⁸ A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Bresseur, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**, 8, 163-176.

¹³⁹ L. Zhu, R.I. Mahato, *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2010**, 7, 1209–1226.

¹⁴⁰ B. M. Stott, M. P. Vu, C. O. McLemore, M. S. Lund, E. Gibbons, T. J. Brueseke, H. A. Wilson-Ashworth, J. D. Bell, *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 1202–1215.

7. Isothermes de Compression et ellipsométrie

A l'interface air/eau les amphiphiles cationiques ont une orientation particulière. Les têtes polaires plongent dans l'eau tandis que les parties hydrophobes sont orientées vers l'air afin de minimiser le contact avec la phase aqueuse.

En comprimant ces molécules, une monocouche lipidique, appelée film de Langmuir, se forme^{141 142}. Différentes informations concernant la taille, la forme et la stabilité du film peuvent être obtenues à partir de l'étude des monocouches formées à l'interface air/liquide.

De point de vue expérimentale la technique consiste à déposer la solution de molécules amphiphiles à l'aide d'une microseringue à la surface de la cuve remplie par la sous-phase (eau ou mélange eau NaCl) comme l'illustre la *Figure 81*. Par la suite les molécules de lipides sont comprimées à l'aide de barrières mobiles. Il se forme ainsi une monocouche à l'interface air/liquide. Plusieurs techniques permettent de caractériser le film formé comme l'isotherme de compression.

Étant donnée la taille des monocouches que nous étudions, une propreté irréprochable de la cuve est nécessaire. Avant chaque mesure, une compression « à vide » est alors réalisée avant de déposer chaque monocouche. La pression de surface doit demeurer proche de zéro en l'absence d'impuretés.

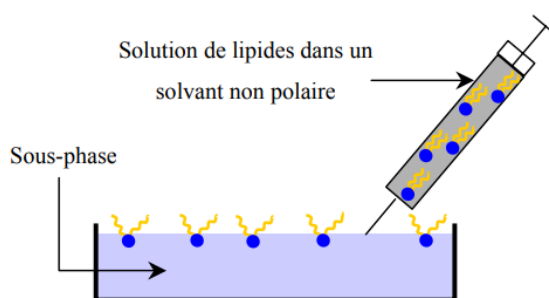


Figure 81 : Dépôt des molécules amphiphiles à l'interface air/liquide

L'isotherme de compression consiste à tracer la courbe de variation de la pression de surface (exprimée en mN/m) en fonction de l'aire moléculaire (exprimée en Å²). En effet la pression de surface π dépend directement de l'aire accessible aux molécules. Plus la pression de

¹⁴¹ K. B. Blodgett, J. Am. Chem. Soc. **1935**, 57, 1007

¹⁴² K. B. Blodgett, Langmuir, I. Phys. Rev. **1937**, 51, 967

surface est importante plus le film est ordonné. Plus l'aire moléculaire est faible plus le film est compact.

L'isotherme permet d'autre part de mettre en évidence les différentes phases présentes au cours de la compression. En effet, après la fin du dépôt et pour des aires moléculaires importantes les molécules se trouvent dans un état où le contact latéral entre les molécules est globalement absent. Cet état est communément appelé « état gaz ». Les lipides cationiques sont repartis aléatoirement sur la surface.

En comprimant les molécules à l'aide des barrières mobiles, les molécules se rapprochent. Nous obtenons ainsi la phase liquide expansée (LE). En continuant la compression nous atteignons la phase liquide condensée (LC) où les chaînes alkyles sont orientées perpendiculairement à la surface. Si nous comprimons davantage, le film passe à l'état solide (*Figure 82*). Finalement, en continuant la compression, la surface n'est plus assez grande pour contenir toutes les molécules. Ceci entraîne la destruction de la monocouche autrement appelée « Collapse »

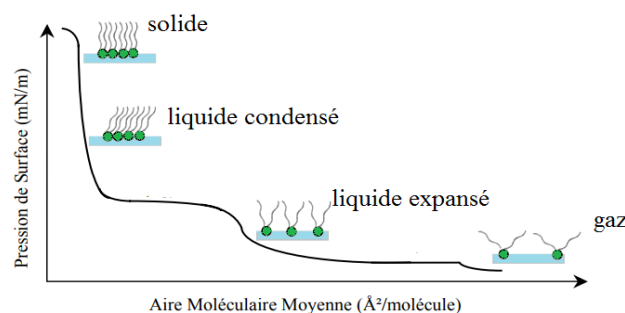


Figure 82 : Différentes phases observables lors de la compression de molécules à l'interface air/eau

La cuve de Langmuir utilisée est également dotée d'un ellipsomètre qui permet, lors de la compression, de caractériser les monocouches de lipides cationiques formées à l'interface air/liquide par ellipsométrie. Il s'agit d'une méthode optique d'analyse non-invasive permettant d'étudier le changement d'état de polarisation de lumière après réflexion sur une surface plane (*Figure 83*).

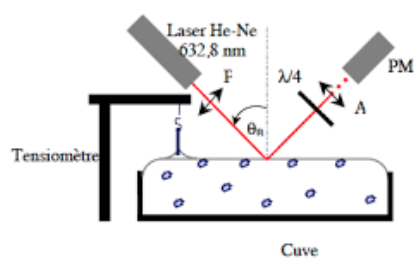


Figure 83 : Montage d'ellipsométrie à l'interface air/eau ¹⁴³

Expérimentalement, un faisceau lumineux polarisé grâce à un polariseur est envoyé à la surface de l'échantillon. Le faisceau se réfléchit modifiant ainsi son état de polarisation. La lumière réfléchie est par la suite repérée grâce à un analyseur. L'information extraite par cette mesure est l'angle ellipsométrique Δ qui peut être corrélé avec l'épaisseur de la monocouche formée. La valeur de Δ dépend de la quantité de matière déposée à la surface de la cuve (équation 2) ¹⁴⁴.

$$\Gamma(\text{mg}/\text{m}^2) = 0.20 \times \Delta(^{\circ}) \quad (2)$$

Où Γ : quantité de matière présente à l'interface, Δ : angle ellipsométrique,

8. RMN du Phosphore des composés amphiphiles en milieu organisé pour la détermination de la nature des assemblages supramoléculaires

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer le type de structure supramoléculaire formé par auto-assemblage de composés amphiphiles.

La première correspond aux techniques de diffraction des rayons X aux petits angles ¹⁴⁵ (SAXS : Small angle X Ray Scattering). Les structures supramoléculaires faisant apparaître des structures périodiques, certains paramètres sont donc accessibles par diffraction et permettent d'indiquer si une organisation est lamellaire, hexagonale ou cubique par exemple.

La RMN du phosphore de composés amphiphiles en milieu organisé est une technique spectroscopique qui permet également d'accéder à ce type d'information. En milieu organisé,

¹⁴³ E. Gicquel, G. Paboeuf, V. Burgaud, A. Renault, S. Beauvils. **2016**, Saint-Nazaire, France.

¹⁴⁴ J. A. De Feijter, J. Benjamin, F. A. Veer, *Biopolymers*, **1987**, 17, 1759-1772.

¹⁴⁵ N. V. Bereznoy, D. Lundberg, N. Korolev, C. Lu, J. Yan, M. Miguel, B. Lindman, L. Nordenskiöld, *Biomacromolecules*, **2012**, 10, 4146-4157.

les spectres du phosphore de phospholipides sont extrêmement larges. Cette largeur (anisotropie de déplacement chimique) reflète la mobilité des composés moléculaires. Selon le type d'organisation supramoléculaire (e.g. lamellaire versus hexagonale), la mobilité moléculaire sera impactée conduisant alors à des spectres caractéristiques d'une organisation lamellaire ou hexagonale

Dans notre cas, les molécules synthétisées possèdent toutes un noyau phosphore. Il était donc intéressant d'utiliser la Résonance Magnétique Nucléaire RMN ^{31}P en milieu hydraté afin de déterminer la nature de la phase obtenue.

La technique consiste à utiliser une séquence Echo de Hahn qui est adaptée pour l'enregistrement de signaux très larges (c'est-à-dire correspondant à une FID très courte). C'est une séquence RMN de type Spin-écho découverte en 1950. La séquence se déroule comme indiqué ci-dessous :

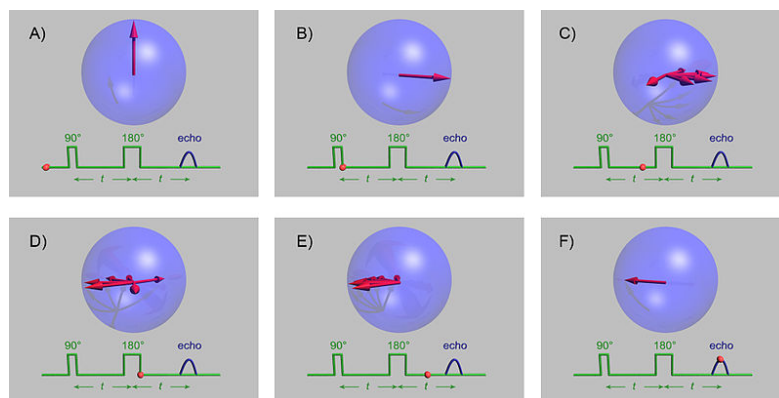


Figure 84 : Représentation de la séquence d'écho de Hahn

Une impulsion de $\pi/2$ permet de basculer l'aimantation macroscopique de l'échantillon dans le plan XY (B). L'inhomogénéité du champ magnétique entraîne le déphasage du moment magnétique (C). Une impulsion de π est appliquée entraînant l'inversion des moments magnétiques (D). Les moments finissent par se rephaser et forment un écho de spin.

Selon la nature du spectre obtenu il est possible de conclure quant à la nature de la phase formée. En effet, une phase lamellaire est caractérisée par une anisotropie de déplacement chimique caractérisée par un épaulement à gauche. Les lipides cationiques qui s'auto-assemblent en phase hexagonale présentent quant à eux un pic avec un épaulement du côté

droit comme le montre la *Figure 85* ci-dessous. Dans ce cas l'anisotropie de déplacement chimique est plus faible que celle observée pour une organisation lamellaire.

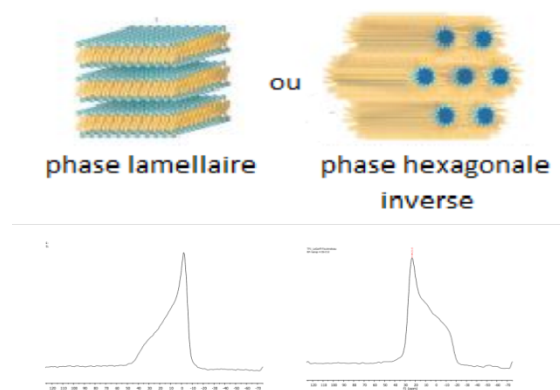


Figure 85 : Variation du signal du spectre RMN en fonction de la nature de la phase formée

9. Test de complexation de l'ADN sur gel d'agarose

Avant d'évaluer les propriétés de transfection des lipides cationiques synthétisés, il est nécessaire d'étudier leurs capacités à compacter l'ADN et de déterminer le charge ratio CR (c'est-à-dire le rapport de charge positive provenant du lipide cationique par charge négative provenant de l'ADN) pour lequel ce dernier est totalement compacté.

L'ADN est mélangé avec des quantités différentes de solution liposomales afin de préparer des lipoplexes à des rapports de charge (CR) allant de 0.5 à 8. Les lipoplexes sont par la suite déposés sur un gel d'agarose à 0.8% contenant du bromure d'éthidium (BET). La migration par électrophorèse dure quelques minutes à 90 V.

En effet le bromure d'éthidium est capable de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques entraînant l'apparition d'une bande visible lors de l'exposition aux UV. L'absence d'une bande indique alors que la totalité de l'ADN a été compactée par l'amphiphile cationique.

10. Évaluation des propriétés de transfection des lipides cationiques

Un des critères essentiels pour le choix d'un vecteur est sa capacité d'entraîner l'expression du gène dans la cellule. Il est donc important d'évaluer les propriétés de transfection des lipides cationiques synthétisés afin de vérifier la possibilité de les utiliser comme des systèmes de vectorisation d'ADN.

Plusieurs lignées cellulaires ont été testées, principalement les lignées A549 et 16HBE provenant des voies respiratoires humaines. La lignée HeLa provenant de cellules cancéreuses du col de l'utérus et la lignée C2C12 qui sont des cellules musculaires.

L'ADN utilisé pour réaliser les tests de transfection code pour l'enzyme luciférase. Il s'agit d'une enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation de la protéine luciférine en oxyluciférine comme l'illustre la *Figure 86*. Cette réaction est accompagnée par l'émission de photons. Plus le nombre de photons émis est important, plus la transfection sera considérée comme efficace. Cependant cette méthode ne permet pas de déterminer le pourcentage de cellules transfectées.

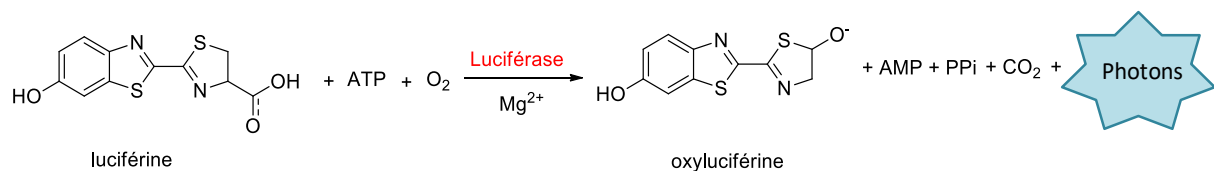


Figure 86 : Réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase

La quantification des photons émis au cours de cette manipulation est réalisée par un luminomètre.

11. Évaluation de la viabilité cellulaire

La toxicité des molécules utilisées comme systèmes de vectorisation d'acides nucléiques est un autre critère important. Il est en effet important de trouver le meilleur équilibre entre l'expression maximale d'un gène et un impact minimal sur la viabilité cellulaire.

Au cours de ce manuscrit, la toxicité des lipides cationiques synthétisés a été évaluée par un test de bioluminescence qui consiste à déterminer la quantité d'adénylate kinase relarguée par les cellules mortes ou faisant apparaître une paroi cytoplasmique défectueuse.

L'adénylate kinase, une enzyme normalement localisée dans le cytoplasme, permet la formation d'ATP à partir de deux molécules d'ADP. L'ATP ainsi formé est alors dosé par luminescence selon la réaction d'oxydation de luciférine en oxyluciférine (étape 2 ci-dessous).

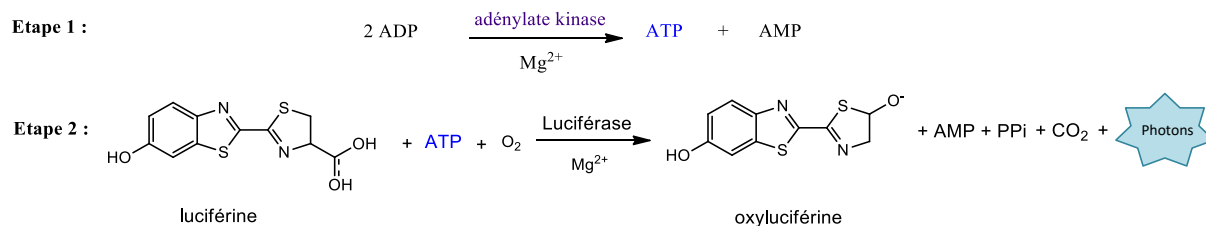


Figure 87: Réactions mises en jeu lors de l'évaluation de la viabilité cellulaire

Cette réaction d'oxydation s'accompagnant par l'émission de photons. Un dosage par bioluminescence permet ainsi de déterminer la quantité d'ATP formé et par conséquent la quantité d'adénylate kinase libérée par les cellules endommagées.

IV. Étude des propriétés physico-chimiques des lipides cationiques synthétisés

Dans le but d'étudier l'effet apporté par l'ajout d'une fonction thioether dans la chaîne alkyle sur les propriétés physicochimiques des nouveaux lipides cationiques synthétisés plusieurs études ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans cette partie.

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique

La Concentration d'Agrégation Critique (CAC) désigne la concentration au-dessus de laquelle les lipides cationiques passent d'un état monomère à la formation d'agrégats. Cette valeur est importante car elle permet de définir la gamme de concentration à partir de laquelle des liposomes peuvent être formés. Nous avons choisi de déterminer les CAC par l'utilisation d'une sonde fluorescente (rouge de Nil) dont l'intensité de fluorescence dépend de la polarité du milieu.

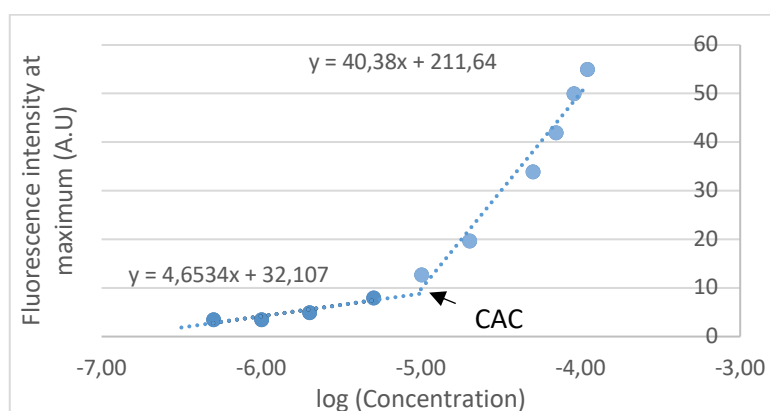


Figure 88: Variation de la fluorescence en fonction de log(C) pour la détermination de la CAC pour le composé **2.4d (BSV S6)**

Afin de déterminer les valeurs de CAC pour les phosphoramides synthétisés, une vingtaine d'échantillons de chaque lipide cationique, de concentration allant de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ à $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sont préparés. Chacune de ces solutions contient $3 \times 10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$ de rouge du Nil. La courbe de variation de l'intensité de fluorescence du rouge du Nil en fonction du Log (C) est par la suite tracée. La valeur de la CAC correspond à l'intersection des deux domaines linéaires comme le montre la *Figure 88*.

Pour les différents phosphoramides synthétisés les valeurs de CAC sont comprises entre 1 et $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Il nous est cependant difficile de donner plus de précision en employant cette technique.

2. Anisotropie de fluorescence

La valeur de la température de transition de phase dépend étroitement de la nature de la partie hydrophobe des molécules (longueur de la chaîne, degré d'insaturation, ramification). Plusieurs exemples dans la littérature indiquent que l'introduction d'une double liaison dans les chaînes grasses des lipides cationiques entraîne une diminution de la température de transition de phase comme l'illustre la figure ci-dessous.

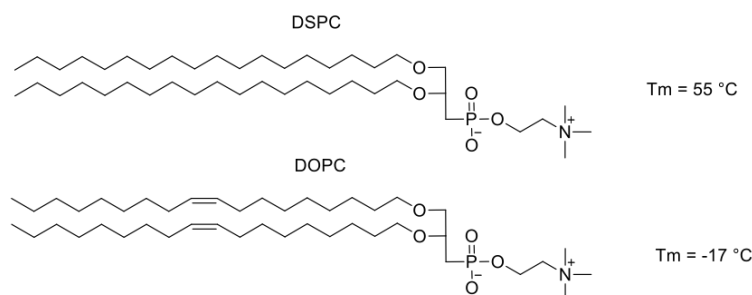


Figure 89 : Effet de l'introduction d'une double liaison sur les températures de fusions des lipides cationiques ¹⁴⁶

Il est de ce fait intéressant de déterminer les valeurs de T_m des lipides synthétisés afin d'étudier l'effet apporté par l'introduction de l'atome de soufre sur la température de transition de phase. La technique d'anisotropie de fluorescences est alors utilisée dans le but d'étudier la fluidité des vecteurs synthétisés et de déterminer leur température de transition

¹⁴⁶Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids
https://avantlipids.com/wpcontent/uploads/2015/11/Phase_Transition_Temps_for_Glycerophospholipids_Table.pdf, consulté le 12/06/2019.

de phase. Cette technique utilise une sonde fluorescente hydrophobe (1,6-diphenylhexatriène : DPH) qui est placée en faible quantité dans le liposome. Cette sonde se localisera au niveau de la bicouche lipidique des liposomes du fait de son caractère hydrophobe. L'anisotropie de fluorescence observée renseignera sur la dynamique de ces domaines hydrophobes. Plus l'anisotropie sera faible plus la sonde sera mobile et par extrapolation cela correspondra à des chaînes lipidiques elles-mêmes mobiles. De façon réciproque une forte anisotropie de fluorescence correspondra à un système lipidique rigide. Une diminution brutale de l'anisotropie de fluorescence dans une gamme étroite de température correspond à la transition de phase (T_m) entre une phase gel à une phase cristalline liquide.

Pour chaque lipide cationique synthétisé une solution liposomale de concentration 2×10^{-4} mol. L⁻¹, contenant 1×10^{-6} mol. L⁻¹ de la sonde DPH, est préparée. L'anisotropie de la sonde est mesurée en fonction de la température et les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous

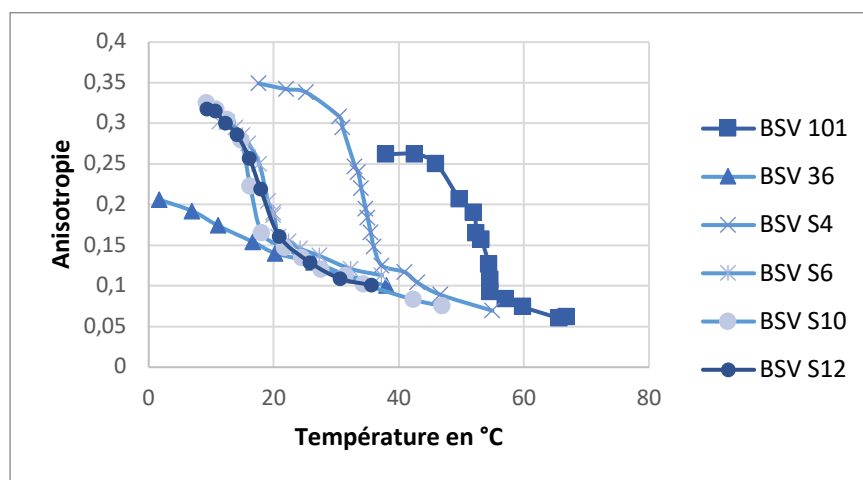


Figure 90: Anisotropie de fluorescences

Il est à noter que la nature de la chaîne hydrophobe des molécules influence considérablement la température de transition de phase. Le composé **BSV 101** ayant des chaînes alkyles saturées présente la valeur de T_m la plus élevée à 50°C. L'incorporation des fonctions thioéthers dans la partie hydrophobe entraîne la diminution de la T_m des phospholipides synthétisés comme le montre le tableau ci-dessous :

Composés	T _m
BSV S4 (2.4c)	38°C
BSV S6 (2.4d)	19°C
BSV S10 (2.4a)	19°C
BSV S12 (2.4b)	16°C
BSV 36	<0°C
BSV 101	54°C

Tableau 5 : Température de transition de phase (T_m) des lipides cationiques déterminée par Anisotropie de fluorescence

Les valeurs de la température de transition de phases des lipides cationiques contenant une fonction thioéther dépendent de la position de l'atome de soufre dans la chaîne grasse. Ainsi quand le soufre est présent en position 4 de la chaîne (**BSV S4**), la transition de phase a lieu à 38°C. Cependant quand la fonction thioéther est proche du milieu de la chaîne (composés **BSV S6**, **BSV S10** et **BSV S12**) les valeurs obtenues vont de 16°C à 19°C (Tableau 5).

Finalement pour le composé **BSV 36** avec les chaînes oléyles le passage de l'état cristallin à l'état gel n'a pas pu être déterminé par cette technique car cette transition intervient certainement à une température inférieure à 0°C comme pour le composé DOPC (Figure 90).

En conclusion, le désordre entraîné par la présence des atomes de soufre dans la partie hydrophobe serait à l'origine de la diminution de la valeur des T_m des nouveaux composés amphiphiles. L'atome de soufre du fait de ses spécificités (atome de taille plus importante que le carbone, longueur de liaison, angle de liaison) conduit à générer un coude dans la chaîne lipidique et donc à réduire la force d'interaction entre les molécules expliquant ainsi leur fluidité accrue par rapport à des chaînes saturées. Il est aussi à noter qu'à 37°C (température physiologique) les composés **BSV S6**, **S10**, **S12** et **BSV 36** sont tous à l'état cristallin.

3. Isothermes de compression

À l'interface air/liquide les molécules amphiphiles adoptent une orientation particulière afin de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et l'eau. Il se forme ainsi une monocouche appelée film de Langmuir. Plusieurs techniques permettent d'étudier les

caractéristiques de la monocouche formée parmi lesquelles l'isotherme de compression et l'ellipsométrie.

L'isotherme de compression est une technique qui permet de suivre la variation de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire. Il est ainsi possible de déterminer l'aire minimale occupée par chaque molécule à son point de compressibilité maximale. Ces données peuvent renseigner sur la capacité des composés amphiphiles à former des monocouches ainsi que sur la stabilité de ces monocouches. La comparaison des données de chaque composé nous renseigne alors sur les différences induites par l'incorporation d'une fonction thioéther en différentes position des chaînes lipidiques.

Les expériences d'isothermes de compression et d'ellipsométrie ont été réalisées dans les laboratoires de **l'UMR CNRS 6251 de l'Université de Rennes 1 au sein de l'équipe du Dr Véronique Vié** à l'occasion de trois mobilités d'une semaine réalisées lors de cette thèse.

Les échantillons sont dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1) pour préparer des solutions de concentration égale à 1mM. Un volume de 25 μL est par la suite déposé à l'interface d'une cuve remplie de 400 mL d'eau distillée. Après le dépôt un temps d'attente de 10 minutes permet l'évaporation du solvant organique. Les molécules sont par la suite comprimées à l'aide de barrières mobiles réglées à une vitesse de 5 cm^2/min . Les isothermes de compressions obtenus sont présentés ci-dessous.

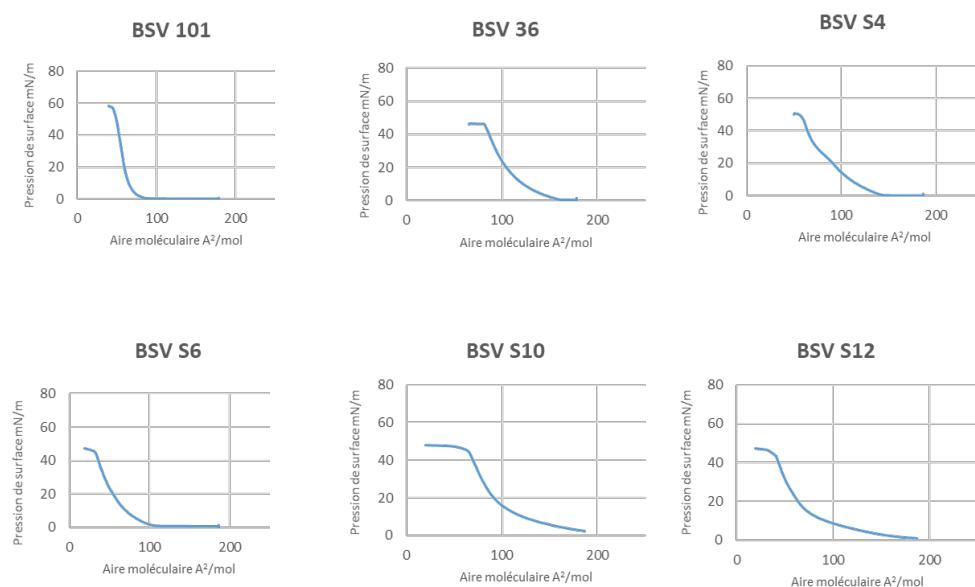


Figure 91: Résultats isothermes de compressions

Plusieurs points sont à tirer de ces isothermes : l'aire moléculaire au lift off c'est-à-dire lorsque la pression de surface commence à augmenter, l'aire moléculaire au collapse indiquant l'aire minimale occupée par la molécule à son point de compressibilité maximale et la pression au collapse qui correspond à la pression au-dessus de laquelle le film est détruit. Ces données sont résumées dans le tableau suivant.

	Lift-off Å ² /molécule	Aire moléculaire au collapse Å ² /molécule	Pression au collapse mN/m
BSV S4 (2.4c)	140 ± 2	50 ± 2	50 ± 0.25
BSV S6 (2.4d)	110 ± 2	40 ± 1	47 ± 0.25
BSV S10 (2.4a)	180 ± 2	60 ± 2	47 ± 0.25
BSV S12 (2.4b)	180 ± 2	45 ± 2	47 ± 0.30
BSV 36	160 ± 2	75 ± 2	47 ± 0.35
BSV 101	80 ± 2	45 ± 1	58 ± 0.25

Tableau 6 : Valeurs des aires moléculaires et la pression au collapse déterminées à partir des isothermes de compression

Tous les lipides cationiques synthétisés possèdent la même tête polaire. De ce fait les différences observées sur les isothermes de compressions sont dues à la nature de la partie hydrophobe de ces molécules.

Aire moléculaire au lift-off : Les valeurs de l'aire moléculaire au lift off montrent que le composé **BSV 101** possède le plus petit aire moléculaire (80 Å²/molécule). Cette valeur peut s'expliquer par le fait que les chaînes alkyles adoptent partiellement ou complètement des enchainements C-C-C de conformation s-trans. Cette conformation conduit à l'obtention de chaînes lipidiques occupant un volume minimal et donc une faible valeur de l'aire moléculaire au lift-off. L'incorporation d'une fonction thioéther ou d'une insaturation de configuration Z dans le domaine hydrophobe perturbe ou rend impossible la conformation « all s-trans » le long de la chaîne lipidique et entraîne des valeurs d'aire moléculaires au lift-off plus importantes indiquant que les amphiphiles possédant ces chaînes grasses (**BSV 36**, **BSV S10** et **BSV S12**) occupent davantage la surface disponible en l'absence de pression latérale.

Aire moléculaire au collapse : Le composé **BSV 36** avec les chaînes oléyles occupe l'aire moléculaire la plus importante parmi les molécules testées (75 Å²/molécule). Ceci est dû à la présence de l'insaturation de configuration Z qui empêche au niveau de la double liaison C=C d'obtenir une conformation trans perturbant ainsi l'assemblage des chaînes alkyles en un assemblage plus compact. L'incorporation de l'atome de soufre induit des aires moléculaires

entre 40 à 60 Å²/ molécule indiquant ainsi la formation d'un film plus compact. Néanmoins les différences observées entre les différents amphiphiles possédant des fonctions thioéther est difficile à expliquer.

Pression au collapse : La pression de surface au collapse démontre que les composés **BSV 101** et **BSV S4** possèdent les monocouches les plus robustes face à la compression. Ces valeurs peuvent s'expliquer par les différentes interactions qui peuvent avoir lieu entre les chaînes hydrophobes (interaction hydrophobe, interaction de Van Der Waals). Ces valeurs confirment les résultats obtenus par anisotropie de fluorescence qui montrent que ces deux composés possèdent les températures de transition de phase les plus élevées.

La présence de la fonction thioéther proche du milieu de la chaîne alkyle ou la présence d'une insaturation entraîne des pressions au collapse identiques à 47 mN/m pour les composés **BSV 36**, **BSV S6**, **BSV S10** et **BSV S12**. La destruction de la monocouche intervient à des pressions plus faibles indiquant une plus grande instabilité.

Globalement, ces isothermes de compression nous indiquent que la présence d'une fonction thioéther perturbe les assemblages supramoléculaires en augmentant la surface moléculaire au lift-off (comparaison par rapport au **BSV 101**), et en réduisant la stabilité des assemblages aux fortes compressions (aire moléculaire au collapse). Sur ce dernier paramètre, les résultats permettent de distinguer le composé **BSV S4** (position de la fonction thioéther proche de la tête polaire) des autres amphiphiles possédant des fonctions thioéthers.

4. Détermination de l'épaisseur de la monocouche par ellipsométrie

Une indication de l'épaisseur des monocouches formées à l'interface air/eau est possible grâce à des mesures d'ellipsométrie. La mesure de l'angle ellipsométrique Delta est faite au même moment que les expériences d'isothermes de compression et les résultats obtenus sont présentés dans le *Tableau 7*. A noter que la différence Δ Delta (Delta max – Delta min) permet de comparer l'épaisseur des films à l'interface. Cette analyse repose sur l'hypothèse que la composition chimique (différente selon les échantillons) des chaînes lipidiques exposées à l'interface eau-air a un effet semblable sur la variation de l'angle ellipsométrique et que seule son épaisseur influence la variation de cet angle.

En l'absence de compression (Delta min) : Le film le plus épais correspond au composé **BSV 101**. Ce résultat est consistant avec l'isotherme de compression. Ce composé est sans doute pré-organisé à la surface du fait d'interactions favorables entre des chaînes lipidiques en conformation « all-s-trans ». Concernant les composés avec des fonctions thioéthers, le composé **BSV S4** se distingue des 3 autres phosphoramides avec un delta min deux fois supérieur. Les très faibles valeurs de Delta min pour les composés **BSV S6**, **S10** et **S12** semblent indiquer que ces composés s'étalent à la surface pour occuper au maximum l'interface air-eau.

A la compression maximale (Delta max) : Le film le plus épais reste le composé **BSV 101**. On peut penser que cette augmentation de l'épaisseur du film (par rapport à la valeur Delta min) résulte de l'obtention d'un film dont l'orientation des chaînes lipidiques se rapproche de l'orthogonalité par rapport à la surface. Les composés comportant des fonctions thioéthers s'adaptent à la compression pour faire apparaître un film épais à la compression maximale. Les valeurs observées sont significativement supérieures à la valeur du composé **BSV 36** (Chaînes oléyles). Cela indique que si les chaînes thioéthers peuvent couvrir un maximum de surface en l'absence de compression (dans une moindre mesure **BSV S4**), ils peuvent aussi ajuster leurs conformations en présence d'une pression latérale et donc conduire à des films épais. La dernière colonne du Tableau 7, montre très clairement l'adaptabilité des amphiphiles comportant des fonctions thioéthers et en particulier les composés **BSV S6**, **BSV S10** et **BSV S12**. Il est à noter que cette adaptabilité conformationnelle augmente du **BSV S4** au **BSV S12** de façon assez régulière indiquant que le positionnement de la fonction thioéther proche du milieu de chaîne favorise cette caractéristique. Ces résultats suggèrent que la présence d'une insaturation (**BSV 36**) ne permet pas une réorganisation conformationnelle aussi importante du fait de la présence d'une insaturation de configuration Z.

	Delta min (n=2 or 3)	Delta max (n=2 or 3)	Δ Delta (Delta max – Delta min)
BSV S4 (2.4c)	3.9 ±0.1	8.6 ±0.1	4.7
BSV S6 (2.4d)	1.6 ±0.2	6.6 ±0.1	5
BSV S10 (2.4a)	1.4 ±0.2	6.8 ±0.2	5.4
BSV S12 (2.4b)	1.5 ±0.1	7.7 ±0.1	6.2
BSV 36	3.5 ±0.1	5.8 ±0.1	2.3

BSV 101	6.1 ±0.1	9.3 ±0.1	3.2
----------------	----------	----------	-----

Tableau 7: Valeurs de l'angle éllipsométrique Delta obtenu par éllipsométrie

Ces résultats indiquent que les lipides cationiques contenant une fonction thioéther sont capables de moduler leur comportement en fonction de la contrainte. Ainsi en absence de compression, les chaînes hydrophobes occupent un espace maximal et les monocouches formées sont peu épaisses. Cependant, à leur point de compressibilité maximale, ces molécules sont capables de modifier leur conformation pour former des films épais. Ce comportement se traduit par une différence importante entre les valeurs de Delta min (au début de la compression) et Delta max (au collapse) qui varie entre 4,7 et 6,2° pour les phosphoramides contenant une fonction thioéther. Ces valeurs sont nettement plus faibles pour les composés de références (2,3° pour le composé **BSV 36** et 3.2° pour le composé **BSV 101**)

5. Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par la RMN ³¹P en milieu organisé

Israelachvili a montré qu'il existe un lien étroit entre la structure des lipides et leurs assemblages supramoléculaires. Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'étude de la phase formée par les nouvelles molécules lorsqu'elles sont hydratées. Il a été précédemment montré que le composé **BSV 36**¹⁴⁷ adopte en solution aqueuse une phase lamellaire. Le but de cette étude est donc de caractériser le type de phase formé pour les nouveaux composés comportant une fonction thioéther par chaîne lipidique.

Pour pouvoir réaliser cette étude par RMN ³¹P en milieu hydraté, une première étape consiste à formuler les lipides dans l'eau. Afin de réduire le temps d'acquisition les échantillons sont préparés à une concentration élevée de 100mg/mL. Comme les nouveaux amphiphiles cationiques synthétisés possèdent une structure similaire (la position de l'atome de soufre est la seule variable), seul le composé ayant donné les meilleurs résultats de transfection (**BSV S12**) est choisi pour déterminer la nature de l'autoassemblage formé.

¹⁴⁷ D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E. Dufourc, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Soft Matter*. **2016**, 18, 4516-4520.

L'échantillon est préparé de la manière suivante (*Figure 92*) : 100 mg du composé **BSV S12** sont placés dans un tube à hémolyse et dissout dans 1mL de chloroforme. Le solvant organique est évaporé (1) puis 1mL d'eau stérile est ajoutée et le mélange est placé dans un bain à ultrasons à 50°C jusqu'à la dispersion totale du lipide (3). La solution obtenue est lyophilisée pendant la nuit puis 1mL d'eau stérile est ajouté. Le mélange est vortexé pendant 15s. Il s'en suit une étape de 3 cycles froid / chaud (-198°C/ 50°C) pour obtenir à la fin un gel jaunâtre (7).

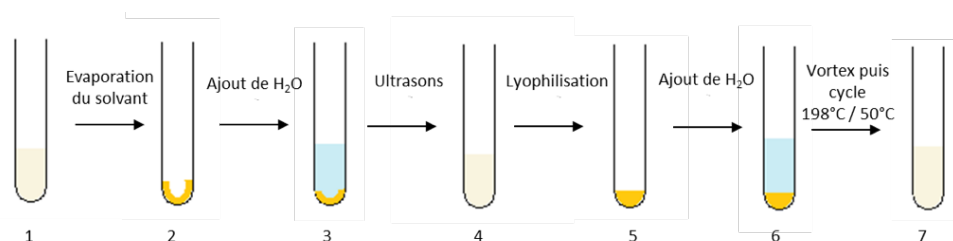


Figure 92: Préparation de l'échantillon pour la réalisation de la RMN ^{31}P selon la séquence écho de Hahn

Le spectre obtenu (*Figure 93*), bien que de qualité moyenne, montre la présence d'un pic du côté droit (σ_{\perp}) vers 0 ppm et un épaulement (σ_{\parallel}) vers 60 ppm. Ces deux valeurs conduisent à une anisotropie de déplacement chimique de 60 ppm ($\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$). Ce type de spectre suggère la formation d'une phase lamellaire.¹⁴⁸ Des études antérieures ont également montré que le composé **BSV 36** s'organise également, dans les mêmes conditions de préparation de l'échantillon, en phase lamellaire.¹⁴⁹

¹⁴⁸ a) R. L. Thurmond, G. Lindblom, M. F. Brown, *Biochemistry*, **1993**, 32, 5394–5410; (b) A. M. Thayer, S. J. Kohler, *Biochemistry*, **1981**, 20, 6831–6834; (c) A. Grélard, P. Guichard, P. Bonnafous, S. Marco, O. Lambert, C. Manin, F. Ronzon, E. J. Dufourc, *FASEB J*, **2013**, 27, 4316–4326.

¹⁴⁹ D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E.J. Dufourc, T. Montier, P.A. Jaffrès, *Soft Matter*, **2016**, 12, 4516 – 4520.

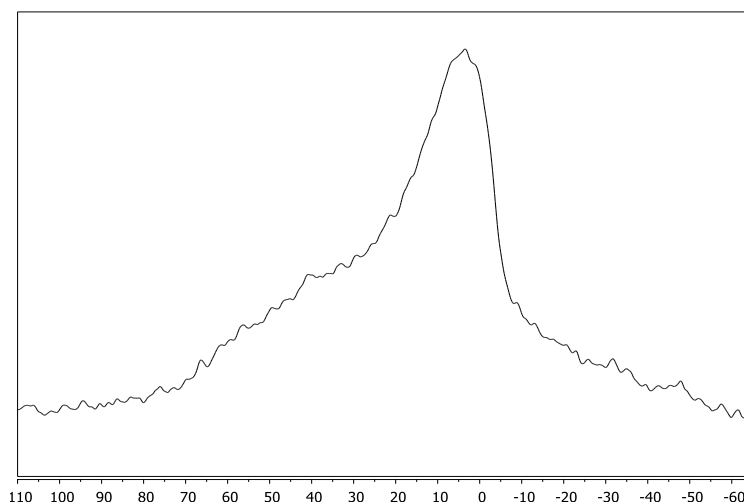


Figure 93: Spectre RMN ^{31}P en milieu organisé du composé **BSV S12**

6. Préparation et caractérisation des solutions liposomales

Ayant à disposition les nouveaux lipides cationiques comportant des fonctions thioéthers, ainsi que les deux molécules de références **BSV 101** avec deux chaînes stéaryles et **BSV 36** contenant deux chaînes oléyles, les solutions liposomales sont ensuite préparées par la méthode d'hydratation de film lipidique.

Le processus consiste à placer un volume V d'une solution mère de lipide cationique dissout dans le chloroforme dans un tube à hémolyse. Le solvant organique est par la suite évaporé pendant 3h à l'aide un évaporateur rotatif. Le film formé est hydraté pendant une nuit à 4°C . La solution est alors placée dans un bain à ultrasons chauffé à 60°C pendant 30 à 45 min jusqu'à l'obtention d'une solution homogène comme le montre la *Figure 94*.



Figure 94 : Solutions liposomales préparées par la méthode d'hydratation de film lipidique
Les solutions obtenues sont caractérisées par DLS dans le but de déterminer la taille et le potentiel zêta des objets formés. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessus.

	Taille (nm)	PdI	Zéta (mV)
BSV S4 (2.4c)	75 ± 5	0.35	58 ± 3

BSV S6 (2.4d)	75 ± 3	0.36	37 ± 3
BSV S10 (2.4a)	89 ± 1	0.24	55 ± 1
BSV S12 (2.4b)	94 ± 8	0.32	61 ± 3
BSV 36	198 ± 2	0.31	59 ± 1
BSV 101	200 ± 2	0.35	48 ± 6

Tableau 8: Mesure de taille et de potentiel Zêta après une nuit d'hydratation à 4°C, puis vortex et sonication (30-45 min)

Les liposomes formés par les deux lipides cationiques de références possèdent les tailles les plus importantes (200 nm). Les nouveaux phosphoramides synthétisés présentent, quant à eux, tous des tailles inférieures à 100 nm. Ces valeurs suggèrent que la présence de la fonction thioéther dans la chaîne hydrophobe permet d'avoir des liposomes avec un rayon de courbure supérieur à celui obtenu avec des chaînes stéaryles ou oléyle. Ce résultat semble en cohérence avec les résultats des isothermes de compression qui indiquaient que les nouveaux amphiphiles cationiques pouvaient s'adapter à la surface disponible et donc moduler le volume occupé par la partie lipidique en fonction de la pression latérale. Il est en effet suggéré dans la littérature que la différence de pression latérale entre le feuillet interne et externe est fonction du rayon de courbure.¹⁵⁰ En conséquence, les amphiphiles comportant une fonction thioéther par chaîne lipidique compte tenu de leur adaptabilité à la pression latérale peuvent adapter leur conformation aux contraintes spécifiques des deux feuillets de la bicouche et donc conduire à la formation de liposomes de petites tailles.

L'indice de polydispersité des différentes formulations est compris entre 0.2 et 0.3. Ceci indique que les populations obtenues ne sont pas homogènes. En effet un indice de polydispersité inférieur à 0.1 indique que les particules formées sont monodisperse c'est-à-dire il s'agit d'une seule population. Dans le cas contraire, un PDI supérieure à 0.1 indique que les particules formées n'ont pas toutes la même taille.

Le potentiel zêta, indiquant la charge surfacique apparente des liposomes, affiche des valeurs positives (entre 37 et 62 mV). Ces valeurs sont en accord avec les natures cationiques des

¹⁵⁰ M. Traïkia, D. E. Warschawski, O. Lambert, J. L. Rigaud, P. F. Devaux, *Biophys. J.*, **2002**, 83, 1443-1454.

molécules synthétisées et assurent une bonne stabilité colloïdale des formulations préparées^{151 152}.

7. Détermination de la taille et du potentiel Zêta des lipoplexes

Dans le but d'effectuer les mesures des tailles et des potentiels Zêta des lipoplexes, le plasmide pGM144 (*Figure 95*) codant pour la luciférase de luciole est utilisé. Il s'agit d'un ADN double brin contenant 3759 paires de base (pb). Ce plasmide a été développé par l'équipe du Pr. S.C. Hyde¹⁵³ et optimisé afin de limiter la réponse immune. En effet la partie bactérienne du plasmide fait normalement apparaître de nombreux enchainements non méthylés Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) qui peuvent alors être reconnus par le système immunitaire. Pour le plasmide pGM144, un maximum d'enchainements non méthylés CpG ont été retirés conduisant à le qualifier de plasmide CpG free. Par ailleurs, comme tout plasmide, il est formé de 3 régions principales :

- **Promoteur** : c'est le lieu d'accroche de l'ADN polymérase afin de débiter l'étape de transcription. Dans le cas du plasmide pGM144, le promoteur a lui-même été optimisé (promoteur hybride hCEFI).
- **La Casette d'Expression (CE)** : C'est l'unité contenant le gène d'intérêt (codant pour la luciférase) ainsi que des séquences régulatrices permettant une expression dans les cellules de mammifères.
- **Le backbone Bactérien (BB)** : Il permet l'amplification des plasmides à l'intérieur des bactéries. Il contient entre autres un gène de résistance a un antibiotique afin de ne sélectionner que les bactéries produisant le gène voulu et une origine de répllication bactérienne pour produire le plasmide dans les cellules bactériennes.

¹⁵¹ J. Pan, S. S. Feng. *Biomaterials*, **2009**, 30, 1176–1183.

¹⁵² Y. W. Khin, S. S. Feng. *Biomaterials*, **2005**, 26, 2713–2722.

¹⁵³ S. C. Hyde, I. A. Pringle, S. Abdullah, A. E. Lawton, L. A. Davies, A. Varathalingam, *Nat Biotechnol*, **2008**, 26, 549-551.

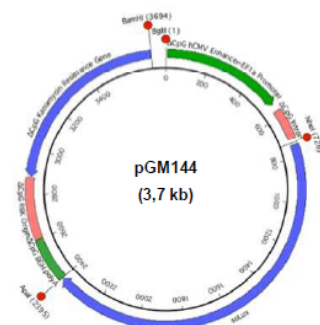


Figure 95 : Composition du plasmide pGM144

Pour préparer les lipoplexes, 20 μL d'ADN (1mg/mL) sont dissout dans 80 μL d'eau stérile. Un volume V de solution liposomales (Tableau 9) à 1.5 mM est ajouté selon la charge ratio (CR) désirée. Un volume V' d'eau stérile est enfin ajouté pour obtenir un volume total de solution de 2 mL.

CR	0.5	2	4	6
Volume V (μL)	20	80	160	320

Tableau 9: Volumes de solutions liposomales et d'eau stérile ajoutés pour la préparation des lipoplexes

Les résultats montrent que les tailles des édifices formés dépendent du charge ratio et donc de la quantité de lipide cationique présent dans la solution. Ainsi, la taille des lipoplexes diminue en augmentant le ratio lipide cationique/ADN. Ce type de résultats a été précédemment observé par plusieurs équipes.^{154,155}

CR	Potentiel zêta (mV)			
	0.5	2	4	6
BSV S4 (2.4c)	1210 \pm 14	226 \pm 4	119 \pm 2.6	181 \pm 1
BSV S6 (2.4d)	172 \pm 4	139 \pm 5	68 \pm 1.6	64 \pm 1
BSV S10 (2.4a)	4845 \pm 16	203 \pm 11	191 \pm 1.2	108 \pm 1
BSV S12 (2.4b)	3880 \pm 18	192 \pm 4	163 \pm 4.7	201 \pm 1
BSV 36	123 \pm 1	113.0 \pm 4	59 \pm 0.7	60 \pm 1
BSV 101	441 \pm 7	195 \pm 6	254 \pm 3.8	118 \pm 3

Tableau 10: Détermination de la taille des lipoplexes en fonction du Charge Ratio (CR)

¹⁵⁴ Y. Xu, S. W Hui, P. Frederik, F. C. Szoka, Biophys. J. **1999**, 77, 341-353

¹⁵⁵ C. Madeira, L. M. Loura, M. R. Aires-Barros, A. Fedorov, M. Prieto. Biophys. J, **2003**, 85, 3106–3119.

Le potentiel zêta des lipoplexes préparés dépend aussi de la quantité de lipide cationique présente dans les formulations. Pour le CR=0.5 toutes les formulations présentent une charge surfacique négative ou proche de la neutralité. En ajoutant un excès de lipide cationique (CR supérieur ou égale à 2) le potentiel zêta devient systématiquement positif.

CR	Potentiel zêta mV			
	0.5	2	4	6
BSV S4 (2.4c)	-2 ± 2	53 ± 2	51 ± 2	43.5 ± 2
BSV S6 (2.4d)	-27 ± 1	41 ± 1	61 ± 3	61.6 ± 3
BSV S10 (2.4a)	20 ± 2	52 ± 2	47 ± 3	58.6 ± 2
BSV S12 (2.4b)	15 ± 3	50 ± 2	52 ± 3	48.9 ± 3
BSV 36	8 ± 1	47 ± 5	47 ± 1	49.4 ± 1
BSV 101	-18 ± 1	47 ± 2	44 ± 3	49.5 ± 3

Tableau 11: Détermination du potentiel Zêta des lipoplexes

8. Tests de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Avant d'étudier les propriétés de transfection des vecteurs synthétisés, il est important d'évaluer la capacité de chaque formulation à complexer l'ADN. Des tests de complexation d'ADN sur gel d'agarose sont alors réalisés. Les différents tests biologiques ont été réalisés à l'Unité INSERM 1078 par l'équipe du Professeur Tristan Montier.

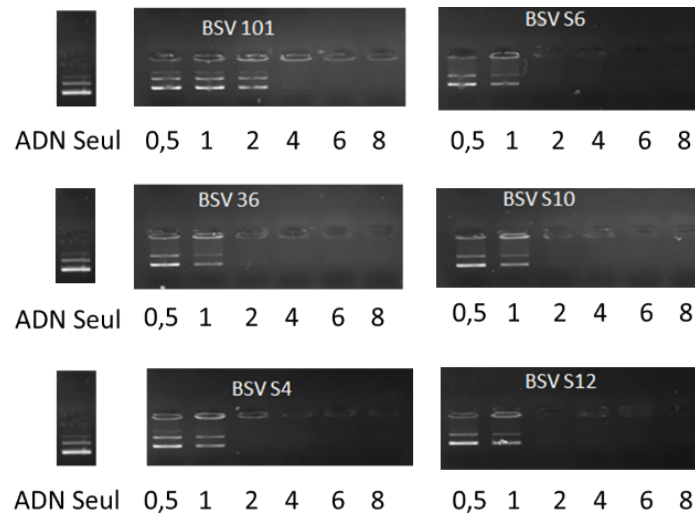


Figure 96 : Gel retard des formulations de lipides cationiques synthétisés

Les résultats montrent que toutes les formulations sont capables de compacter complètement l'ADN à partir d'un rapport de charge égal à 2 (Figure 96).

9. Évaluation des propriétés de transfection *in-vitro*

L'activité de transfection *in vitro* des vecteurs est déterminée sur deux lignées cellulaires A549 et 16HBE. Ce sont des lignées dérivées de cellules épithéliales des voies respiratoires humaines, la lignée A549 provenant de l'adénocarcinome pulmonaire humain, et la lignée 16HBE est une lignée non cancéreuse provenant de l'épithélium bronchique.

Afin de quantifier l'activité de transfection des molécules synthétisées, le plasmide pGM144 codant pour la luciférase est utilisé. Le principe de test de transfection repose sur la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction est catalysée par l'enzyme luciférase et s'accompagne par l'émission de photons. La quantité de photons émise est ensuite normalisée à la quantité de protéine totale.

Six conditions sont testées pour chaque phosphoramides en modifiant le rapport de charge (CR = 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 et 8). Pour rappel le CR correspond au nombre de charge positive provenant du lipide cationique par charge négative provenant de l'ADN. Ceci afin de déterminer le rapport lipide cationique / ADN qui permettrait d'avoir les meilleurs résultats de transfection. Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 97*.

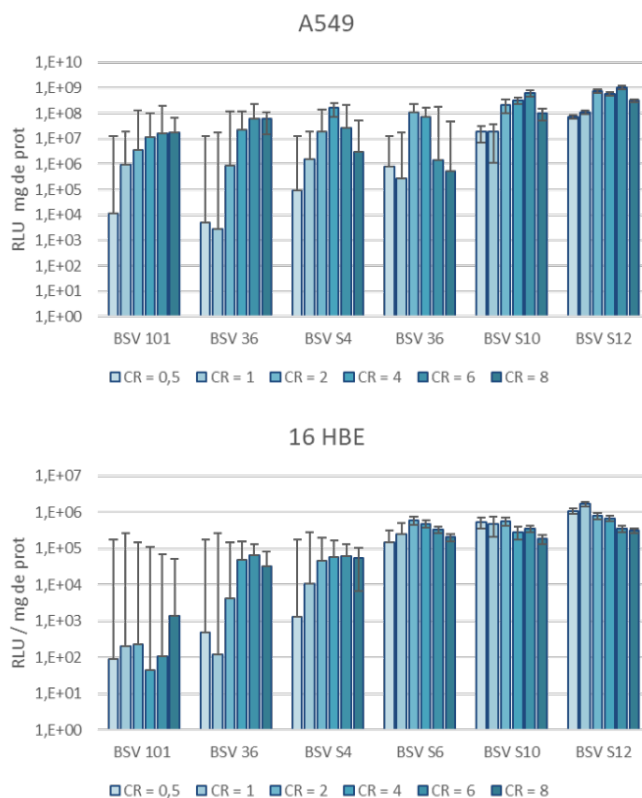


Figure 97: Résultats de l'efficacité de transfection sur les deux lignées A549 et 16HBE

Suite aux expériences réalisées deux vecteurs sortent clairement du lot : le **BSV S10** et le **BSV S12** dont les résultats en transfection sont nettement meilleurs que les autres vecteurs et ce sur tous les CR testés.

D'autre part les efficacités de transfection des composés contenant un motif thioéther dépendent de la position de l'atome de soufre dans la chaîne hydrophobe. On remarque ainsi que plus le soufre est proche du milieu de la chaîne plus l'efficacité du vecteur augmente (**BSV S10** et **BSV S12** apparaissant comme les plus efficaces).

Les nouveaux lipides cationiques sont par ailleurs nettement plus efficaces que le composé **BSV 101**. Cette différence est d'autant plus visible sur la lignée 16HBE. Ces constatations peuvent s'expliquer par l'augmentation du caractère fusogène des molécules suite à l'introduction de la fonction thioéther comme démontré par les tests physico-chimiques réalisés.

Le composé **BSV 36** formé par deux chaînes oléyles $C_{18:1}$ est quant à lui moins efficace que les deux composés **BSV S10** et **BSV S12** et ce sur les deux lignées testées. A contrario, la

comparaison entre l'efficacité du composé **BSV 36** et les deux composés **BSV S4** et **BSV S6** dépend des lignées et des charges ratio. En effet sur la lignée 16HBE, les deux composés mono-soufré affichent une efficacité de transfection supérieure au composé **BSV 36**. Cependant sur la lignée A549, **BSV 36** s'est avéré plus efficace pour les CR 6 et CR 8.

En conclusion cette étude de transfection montre que l'introduction d'une fonction thioéther, en particulier proche du milieu de chaîne lipidique, permet d'obtenir des composés amphiphiles plus efficace que le composé analogue possédant des chaînes oléyles (**BSV 36**). L'apport des fonctions thioéther est aussi remarquable en comparant les efficacités de transfection des nouveaux composés avec celles du composé **BSV 101**. Les propriétés apportées par les fonctions thioéthers (fluidité des assemblages, adaptabilité des assemblages à la pression latérale) ont donc un effet très positif sur l'efficacité de transfection. Enfin, dans cette série de nouveaux composés, la position de la fonction thioéther a un effet sur l'efficacité de transfection comme dans le cas des propriétés physico-chimiques faisant apparaître une certaine corrélation entre ces deux types d'études.

10. Évaluation de la Viabilité cellulaire

Dans le but d'évaluer la toxicité des mélanges lipides cationiques / ADN formés, un dosage par bioluminescence est utilisé. La méthode consiste à quantifier l'adénylate kinase relarguée dans le milieu extracellulaire suite à l'altération de la membrane plasmique.

Les tests sont réalisés sur les mêmes formulations utilisées pour déterminer l'efficacité de transfection des lipides cationiques. Les résultats de viabilité cellulaire sont résumés dans les figures ci-dessous

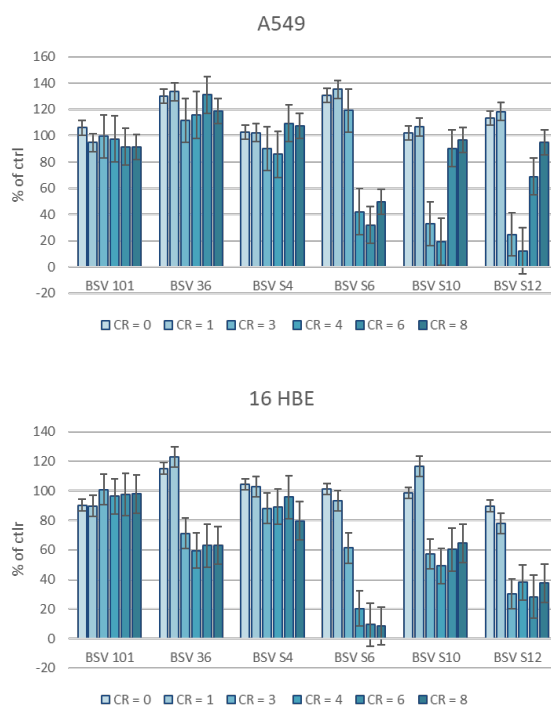


Figure 98: Viabilité cellulaire sur les lignées A549 et 18HBE

Globalement les phosphoramides contenant une fonction thioéther dans leurs domaines hydrophobes sont plus toxique que les deux références **BSV 36** et **BSV 101**.

Néanmoins, dans certains cas une augmentation de la viabilité cellulaire en augmentant le rapport de charge peut être observée. Ces résultats ne sont pas en concordance avec les données de la littérature^{156 157} et aussi avec les résultats précédemment obtenus par notre équipe^{158 159} où la viabilité cellulaire doit logiquement diminuer en augmentant le CR.

Compte tenu de cette inconsistance, Il nous est apparu judicieux de refaire les tests de viabilité en changeant la méthode d'analyse et en passant par un test MTT afin de confirmer ces résultats.

10.1 Principe de mesure de la Viabilité cellulaire par le test MTT

La viabilité cellulaire est mise en évidence dans ce cas grâce à un dosage colorimétrique. Ce test repose sur la capacité des cellules vivantes à réduire le bromure de (3-(4,5-

¹⁵⁶ S. Le Corre, « Nouveaux lipides cationiques phosphorés pour la délivrance d'acides nucléiques », Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, **2014**.

¹⁵⁷ D. Afonso, « Synthèse et étude de nouveaux amphiphiles pour la délivrance d'acides nucléiques », Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, **2015**.

¹⁵⁸ M. Brgles, M. Šantak, B. Halassy, D. Forcic, *Int J Nanomedicine*, **2012**; 7, 393–401.

¹⁵⁹ J. L. Betker, T. J. Anchordoquy, *Mol. Pharm.* **2015**, 12, 264–273.

dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium (MTT) en cristaux de formazan bleus par les succinate déshydrogénase mitochondriale.

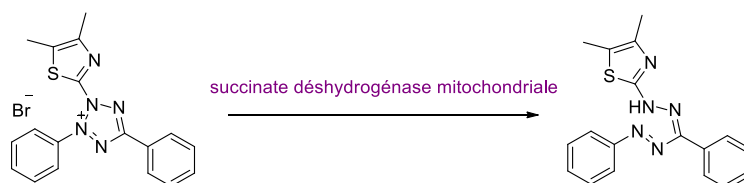


Figure 99: Réaction mise en jeu pour la détermination de la viabilité cellulaire par le test MTT

9.1 10.2 Résultats de Viabilité cellulaire par le test MTT

Les résultats des tests de viabilité cellulaire par le dosage de formazan sont présentés sur la *Figure 100*. Les nouvelles molécules synthétisées sont comparées au composé **BSV 36** pris comme référence pour cette étude.

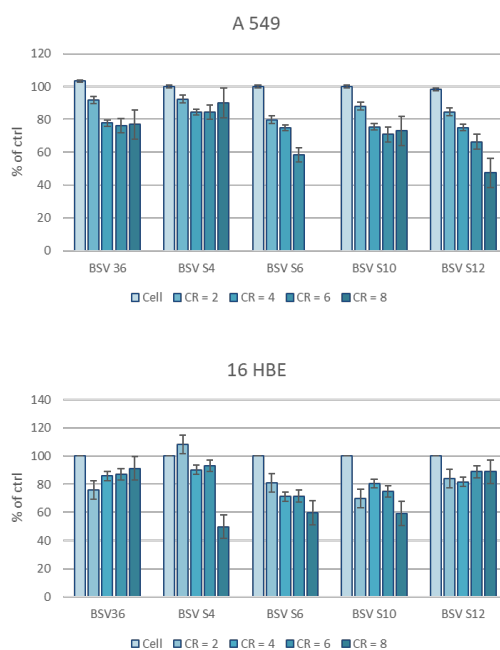


Figure 100: Résultats de viabilité cellulaire par le test MTT sur les deux lignées A549 et 16HBE

Les nouvelles formulations apportent peu de toxicité supplémentaire par rapport au composé de référence. Notons aussi que pour un CR = 4 la viabilité cellulaire pour les deux composés **BSV S10** et **BSV S12** est supérieur à 70% sur les deux lignées testées.

V. Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude une nouvelle famille d'amphiphiles cationiques contenant une fonction thioether dans chaque chaine lipidique a été synthétisée. En termes de synthèse, l'étape clé est l'utilisation d'une réaction click thiol-ène.

Les tests biologiques ont montré que la présence d'une fonction thioéther au milieu de la partie hydrophobe des molécules donne des vecteurs plus efficaces pour la transfection que le **BSV 36** composé de référence pour cette étude.

Les propriétés physico-chimiques des vecteurs ont été étudiées par anisotropie de fluorescence et par étude de leur comportement à l'interface eau/air (isotherme de compression et ellipsométrie). Ces techniques ont permis de montrer que les composés **BSV S10** et **BSV S12** possèdent un domaine hydrophobe moins rigide que celui du composé **BSV 101** formé par des chaines octadecyl saturées. Les fonctions thioéthers, en particulier lorsqu'elles sont positionnées proche du milieu de la chaine lipidique, permettent d'accroître la fluidité des assemblages supramoléculaires. Ces chaines lipidiques font aussi apparaitre une adaptabilité à la pression latérale plus importante que ce qui est observée pour les chaines oléyles. De façon intéressante, ces propriétés sont globalement corrélées aux résultats de transfection de ces nouveaux amphiphiles.

L'auto-assemblage supramoléculaire du composé **BSV S12** a été par la suite étudié par la RMN ^{31}P en milieu hydraté grâce à la séquence écho de Hahn. Le spectre obtenu montre la formation d'une phase lamellaire similaire à celle obtenue pour le composé **BSV 36**.

Les principaux résultats de ce chapitre ont conduit à une publication dont les références sont les suivantes :

Thiol-ene click reaction to construct the lipid chains of cationic amphiphiles: physico-chemical behaviour and application for gene delivery

A. Bouraoui, M. Berchel, R. Ghanem, V. Vié, G. Paboeuf, L. Deschamps, O. Lozach, T. Le Gall, T. Montier, P.A. Jaffrès

Org. Biomol. Chem, **2019**, 17, 3609-3616

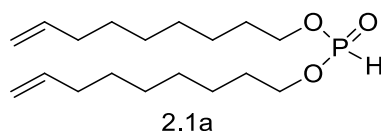
Au-delà de ces résultats, cette étude ouvre une autre perspective. L'utilisation de chaines lipidiques comportant une fonction thioéther permet de s'affranchir de l'utilisation de chaine

lipidique mono-insaturée de type oléyle qui est très utilisée pour la conception de composés amphiphiles. Cela ouvre donc d'autres possibilités en synthèse puisque les fonctions thioéthers sont compatibles avec des réactions d'hydrogénation catalytique ce qui n'est pas le cas des chaînes oléyles. Ainsi des modifications de la partie polaire qui nécessiteraient l'utilisation de groupes protecteurs de type benzylique serait possible avec ce nouveau type de chaînes lipidiques.

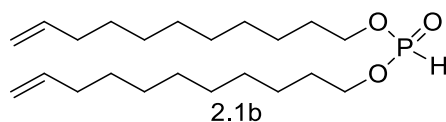
Enfin, pour compléter cette étude, il serait intéressant de regarder les propriétés de fusion de ces composés amphiphiles. Ce type d'étude pourrait être mis en œuvre en regardant la fusion de liposomes comportant des sondes fluorescentes permettant de regarder la cinétique de fusion par FRET.

VI. Partie expérimentale

Synthesis of compound 2.1a-b: non-8-en-1-ol (undecen-1-ol) (2 eq) and diphenyl phosphite (1 eq.) were combined and treated by Kugelroch distillation under reduced pressure ($4 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h at 130°C to remove phenol. The expected product, that doesn't distill, was obtained as colorless oil.

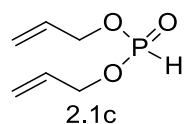


2.1a (Yield 91%; 5.2g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.39-1.48 (m, 16H), 1.75-1.79 (m, 4H), 2.01-2.13 (m, 4H), 4.12-4.18 (m, 4H), 4.99-5.10 (m, 4H), 5.83-5.93 (m-2H), 6.02 (d, $^1J_{\text{HP}}$ 692 Hz); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 8.4.

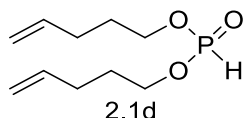


2.1b (Yield 96%; 5g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.24-1.33 (m, 24H), 1.62-1.66 (m, 4H), 1.96-2.02 (m, 4H), 4.01-4.05 (m, 4H), 4.86-4.97 (m, 4H), 5.71-5.81 (m-2H), 5.89 (d, J_{HP} 695 Hz); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 8.4.

Synthesis of compounds 2.1c and 2.1d: (the protocol was adapted from T. W. Kassa et al). In a 500 mL two necks round bottom flask fitted with an addition funnel, phosphorus trichloride (1 equivalent) was dissolved in 150 mL of dry toluene and cooled at 10°C. A mixture containing two equivalents of either allyl alcohol (for the synthesis of 2.1c) or pent-4-en-1-ol (for the synthesis of 2.1d (2 eq.) and triethylamine (2 eq.) was added slowly over a period of 1 h under vigorous stirring. The resulting mixture was allowed to warm to room temperature (rt) and one additional equivalent of either allyl alcohol or pent-4-en-1-ol was added. Then the reaction was stirred overnight at rt. Triethylamine hydrochloride precipitate was removed by filtration over celite and washed several times with toluene. The organic layer was washed with water (100 mL) and then dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a colorless oil.

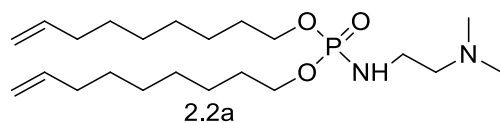


2.1c (Yield 97 % ; 3.4 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.48-4.51 (m, 4H), 5.17-5.32 (m, 4H), 5.81-5.85 (m-2H), 5.92 (d, $^1J_{\text{HP}}$ 703 Hz, 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 8.3; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 65.2, 117.5, 130.4.

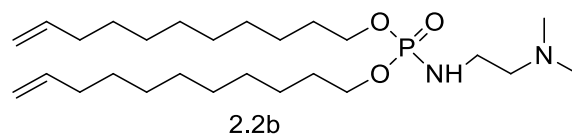


2.1d (Yield 98% ; 2.8 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.71-1.75 (m, 4H), 2.05-2.11 (m, 4H), 3.97-4.03 (m-4H), 4.91-4.99 (dd, 4H), 5.67-5.74 (m, 2H), 5.86 (d, $^1J_{\text{HP}}$ 692 Hz, 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ = 8.4; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 28.29-29.07, 66.47, 115.16, 136.53.

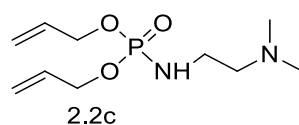
General protocol for the synthesis of compounds 2.2a-d: To a solution of compound **2.1** (1 eq) in 20 mL CH_2Cl_2 was added *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 eq), DIPEA (1.1 eq) and BrCCl_3 (1.1 eq) at 0°C . The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 4 h. at rt. The solvent was evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 10 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 , washed with water, dried over MgSO_4 filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10 (v/v) as eluant to produce a colorless oil.



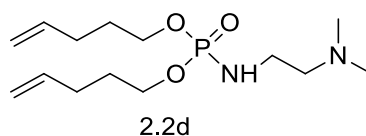
2.2a (Yield 60% 1,2 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =1.24-1.31(m, 16H), 1.58-1.61 (m, 4H), 1.94-1.98 (m, 4H) 2.16 (s, 6H), 2.32 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.87-2.95 (m, 2H) 3.27-3.31 (m, 1H), 3.89-3.98 (m, 4H), 4.84-4.94 (m, 4H), 5.68-5.76 (m, 2H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz; CDCl_3) δ = 9.9.



2.2b (Yield 72%; 1,4 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.11-1.20 (m, 24H), 1.45-1.51 (m, 4H), 1.83-1.88 (m, 4H), 2.04 (s, 6H), 2.21 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.75-2.82 (m, 2H), 3.31-3.37 (m, 1H), 3.78-3.81 (m, 4H), 4.72-4.83 (m, 4H), 5.56-5.62 (m, 2H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ = 10.2.

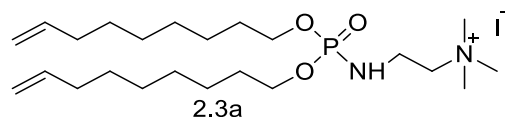


2.2c (Yield 40% ; 0,8 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.46 (s, 6H), 2.73 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.09-3.12 (m, 2H), 4.04-4.07 (m, 1H), 4.46-4.50 (m, 4H), 5.87-5.95 (m, 2H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ = 10.1.

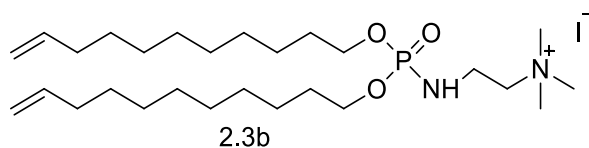


2.2d (Yield 52% ; 1,2 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.63-1.67 (m, 4H), 1.99-2.04 (m, 4H), 2.09 (s, 6H), 2.59 (t, $J=6$ Hz, 2H), 2.81-2.85 (m, 2H), 3.34-3.37 (m, 1H), 3.84-3.87 (m, 4H), 4.83-4.92 (dd, 4H), 5.61-5.71 (m, 2H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz; CDCl_3) δ = 10.2.

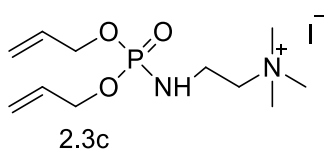
General synthesis of compound 2.3a-d: to a solution of **2.2** (1 eq.; 2×10^{-3} mol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added methyl iodide (4 eq.) and the reaction was stirred overnight at rt. The solvent and the excess of methyl iodide were evaporated to give a clear yellow salt.



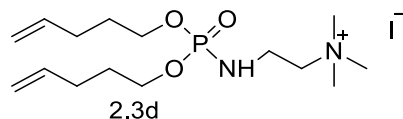
2.3a (Yield 96%; 1,5 g): ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3): δ = 1.27-1.35 (m, 16H), 1.60-1.64 (m, 4H), 1,97-2.02 (m, 4H), 3.34 (s, 9H), 3.44-3.50 (m, 2H), 3.81 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.91-3.96 (m, 4H), 4.42-4.45 (m, 1H), 4.87-4.97 (m, 4H), 5.72-5.79 (m, 2H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3) δ = 8.8.



2.3b (Yield 95%; 1,7 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.26-1.35 (m, 24H), 1.61-1.68 (m, 4H), 1.89-2.05 (m, 4H), 3.46 (s, 9H), 3.52-3.56 (m, 2H), 3.84 (t, J =6.0 Hz, 2H), 3.94-3.99 (m, 4H), 4.39-4.41 (m, 1H), 4.90-5.01 (m, 4H), 5.74-5.84 (m, 2H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ = 8.9.

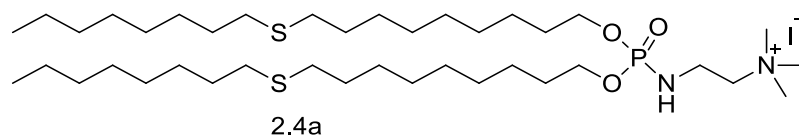


2.3c (Yield 92%; 1,1 g); : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.42 (s, 9H), 3.44-3.52 (m, 2H), 3.79 (t, J =6.0 Hz, 2H), 4.46-4.49 (m, 4H), 4.81-4.95 (m, 1H), 5.19-5.35 (m, 4H), 5.85-5.95 (m, 2H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ = 9.0.

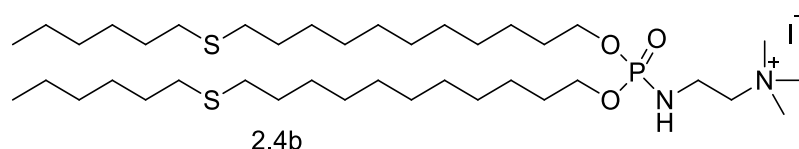


2.3d (Yield 92%; 1,6 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.63-1.67 (m, 4H), 1.99-2.04 (m, 4H), 3.46 (s, 9H), 3.54-3.55 (m, 2H), 3.85 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.84-3.87 (m, 4H), 4.47-4.50 (m, 1H), 4.83-4.92 (m, 4H), 5.61-5.71 (m, 2H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz ; CDCl_3) δ = 9.1.

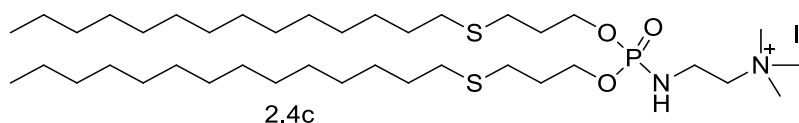
General protocol for the synthesis of compound 2.4a-d : compound **2.3** (1 eq, 1.6×10^{-3} mol) alkane thiol (4 eq.) and 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (0.4 eq.) were placed in a schlenk tube and degassed under argon for 10 min. The mixture was then placed under UV lights at rt for at least 4 h. The product was purified with silica gel chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10 (v/v) as eluent phase to give the desired compounds as a yellow salt.



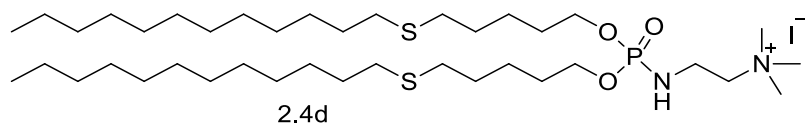
2.4a (BSV S10; yield 48% ; 0,6 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.85 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 6H), 1.36 (m, 40H), 1.45-1.49 (m, 4H), 1.51-1.53(m, 4H), 1.55-1.60 (m, 4H), 1.62-1.69 (m, 4H), 2.46-2.52 (m, 8H), 3.46 (s, 9H), 3.54-3.55 (m, 2H), 3.85 (t, 5.6 Hz, 2H), 3.96-4.01 (m, 4H), 4.47-4.50 (m, 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) $\delta=8.8$; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta=13.6$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 22.1- 31.7 (CH_2 fatty chain, S-CH_2) 35.6 ($\text{CH}_2\text{-NH-P}$), 54.4 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$), 66.2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 66.7 (d, $\text{CH}_2\text{-O-P}$); MALDI-TOF (matrix: DHB): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{84}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}_2 = 723.566$; observed $[\text{M}]^+ = 723.703$.



2.4b (BSV S12; yield 55 %; 1,3 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.86$ (t. $J=7\text{Hz}$, 6H). 1.26-1.35 (m, 4H), 1.52-1.59 (m, 8H). 1.63-1.66 (m, 4H), 2.48 (t, $J=7.4$ Hz, 8H). 3.46 (s, 9H), 3.56 (m, 2H), 3.94-3.98 (m, 2H), 4.37-4.40 (m, 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) $\delta=8.9$; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta=13.6$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 22.18- 31.7 (CH_2 fatty chain, S-CH_2) 35.6 ($\text{CH}_2\text{-NH-P}$), 54.4 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$), 66.2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 66.76 (d, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), ; Maldi TOF (matrix: DHB): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{84}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}_2 = 723.566$; observed $[\text{M}]^+ = 723.723$.



2.4c (BSV S4; yield 58% ; 0,6 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.85$ (t; $J=6.8$ Hz, 6H), 1.23-1.34 (m, 48H), 1.50-1.56 (m, 4H), 1.91-1.94 (m, 4H), 2.48 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 4H), 2.58 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.44 (s, 9H), 3.54-3.55 (m, 2H), 3.83 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 4.07-4.11(m, 4H), 4.62-4.64 (m, 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) $\delta=8.9$; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta=13.6$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 22.1-31.6 (CH_2 fatty chain, S-CH_2) 35.6 ($\text{CH}_2\text{-NH-P}$), 54.3 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$), 65.0 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 66.2 (d, $\text{CH}_2\text{-O-P}$); MALDI-TOF (matrix: DHB): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{84}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}_2 = 723.566$; observed $[\text{M}]^+ = 723.667$.



2.4d (BSV S6; yield 62%; 0,9 g) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.86$ (t, $J=7\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, 6H). 1.26-1.35 (m, CH_2 , 40H), 1.52-1.59 (m, 8H). 1.63-1.66 (m, 4H), 2.48 (t, $J= 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$, 8H). 3.46 (s, 9H), 3.56 (m, 2H), 3.94-3.98 (m, 2H), 4.37-4.40 (m. 1H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 162 MHz) $\delta= 8.9$; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta=13.6$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 22.18- 31.7 (CH_2 fatty chain, S-CH_2), 35.6 ($\text{CH}_2\text{-NH-P}$), 54.3 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$), 66.2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 66.4 (d, $\text{CH}_2\text{-O-P}$); MALDI-TOF (matrix: DHB): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{84}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}_2 = 723.566$; observed $[\text{M}]^+ = 723.708$.

Chapitre 3 : Synthèse et étude des
propriétés physico-chimiques de
nouveaux lipides cationiques
contenant deux fonctions
thioéthers par chaîne lipidique

I. Introduction et étude bibliographique

Au cours du chapitre précédent, il a été démontré que les lipides cationiques contenant une fonction thioether dans chaque chaîne alkyle peuvent être considérés comme de bons candidats pour le transfert de gènes. La présence d'un atome de soufre accroît la fluidité des chaînes lipidiques et permet aux amphiphiles de modifier leur conformation pour s'adapter à l'effet de la pression latérale. La présence d'une fonction thioéther dans une chaîne lipidique peut donc être vue comme un élément de structure qui génère du désordre dans le domaine hydrophobe, permettant ainsi d'éviter un assemblage supramoléculaire trop compact des molécules. Cet élément de structure pourrait être bénéfique lors de l'étape d'échappement endosomale des lipoplexes et expliquer ainsi les bons résultats de transfection.

Un autre moyen très largement utilisé pour générer de la fluidité dans le domaine hydrophobe est l'utilisation des chaînes lipidiques contenant une ou plusieurs insaturations de configuration Z¹⁶⁰. Les chaînes lipidiques poly-insaturées sont d'ailleurs des éléments structuraux importants des phosphoglycéro-lipides présents dans les membranes plasmiques. Leur présence contribue à l'équilibre fluidité *versus* rigidité de ces membranes¹⁶¹.

Avant de décrire dans ce chapitre la conception de nouveaux composés amphiphiles comportant deux fonctions thioéther dans chacune des chaînes lipidiques, il nous est paru intéressant de décrire au préalable quelques travaux de la littérature rapportant l'utilisation de chaînes grasses poly-insaturées et tout particulièrement de chaînes linoléyles (C₁₈:2) pour des applications à la vectorisation d'acides nucléiques.

En 2006, Ahmed et al¹⁶² ont étudié l'effet de la variation du nombre d'insaturation dans les chaînes grasses des N⁴, N⁹-dioctadecanoyl spermines sur les propriétés de transfection de ces molécules. Ainsi 3 nouveaux composés ont été synthétisés à partir de : i) chaînes saturées stéaryles (C₁₈:0), ii) chaînes mono-insaturées oléyles (C₁₈:1) et iii) chaînes polyinsaturées linoléyles (C₁₈:2). Les tests biologiques ont montré une meilleure efficacité de transfection pour le composé formé par les deux chaînes linoléyles. Ces résultats peuvent être expliqués par le caractère fusogène accru de ces chaînes par rapport à leurs analogues saturés (chaîne stéaryle) ou mono-insaturés (chaîne oléyle).

¹⁶⁰ D. F. Zhi, S. B. Zhang, B. Wang, Y. N. Zhao, B. L. Yang, S. J. Yu, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 563–577.

¹⁶¹ A. A. Farooqui, L. A. Horrocks, T. Farooqui, *Chem. Phys. Lipids.*, **2000**, 106, 1-29.

¹⁶² A. O. Ahmed, C. Pourzand, I. S. Blagbrough, *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 31–40.

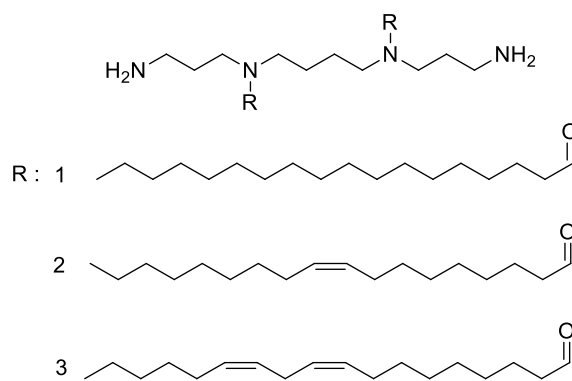


Figure 101 : Structure de composés synthétisé par Ahmed et *al*¹⁶²

En 2017 Dharmalingham et *al*¹⁶³ ont synthétisé des lipides cationiques contenant une chaîne hydrophobe mono ou polyinsaturée pour la vectorisation de l'ADN (*Figure 102*). Les résultats obtenus montrent que ce type de molécule permet d'avoir des résultats de transfection bien meilleurs qu'avec leurs analogues saturés (*Figure 102*). D'autre part, l'étude par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) montre une amélioration du caractère fusogène des nouveaux lipides cationiques par rapport à la molécule de référence formée par des chaînes saturées.

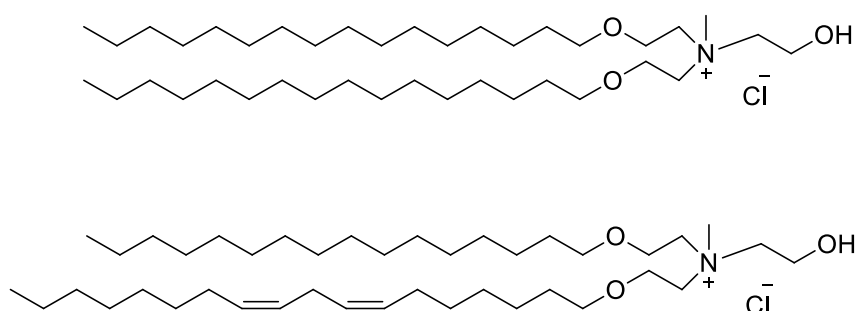


Figure 102: Lipide cationiques synthétisée par Dharmalingham et *al*

Dans un autre contexte Bo Yu et *al* ont publié un article en 2012¹⁶⁴ où ils décrivent la synthèse de nanoparticules lipidiques formées par des chaînes linoléyles (comportant 2 insaturations). Ils ont montré que l'utilisation du TREN3 (*Figure 103*) formé par 3 chaînes linoléyles permet d'avoir des résultats de transfection de siARN nettement supérieurs à ceux obtenus avec la référence commerciale lipofectamine.

¹⁶³ P. Dharmalingam, H. K. R. Rachamalla, B. Lohchania, B. Bandlamudi, S. Thangavel, M. K. Murugesan, R. Banerjee, A. Chaudhuri, C. Voshavar, S. Marepally, ACS Omega, **2017**, 2, 7892-7903.

¹⁶⁴ B. Yu, S. Hsu, C. Zhou, X. Wang, M. Cavanaugh Terp, Y. Wu, L. Teng, Y. Mao, F. Wang, W. Xue, S. T. Jacob, K. Ghoshal, R. J. Lee, L. J. Lee, Biomaterials, **2012**, 33, 5924–593.

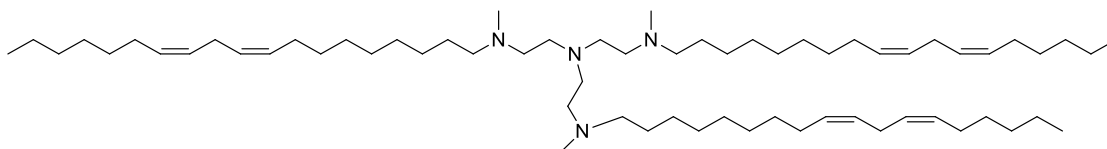


Figure 103: Structure du TREN L3

L'ensemble de ces études montre l'intérêt que peut avoir l'utilisation de chaînes lipidiques polyinsaturées dans la structure des molécules amphiphiles. En effet, la présence de plusieurs doubles liaisons de configuration Z améliore le caractère fusogène des lipoplexes et facilite la libération des acides nucléiques de l'endosome. Cependant, l'instabilité de ces molécules due à l'oxydation des chaînes polyinsaturées¹⁶⁵ peut constituer un obstacle à leur utilisation. Par ailleurs, l'utilisation de réactions d'hydrogénation catalytique lors de la synthèse est incompatible avec la présence de chaînes lipidiques mono ou polyinsaturées. L'utilisation de fonctions thioéthers pour influencer la fluidité des chaînes lipidiques apparaît donc comme une alternative à l'utilisation de chaînes grasses mono ou poly-insaturées. Comme indiqué dans le chapitre précédent, la fonction thioéther est peu polaire, permettant alors de les incorporer dans des chaînes lipidiques sans modifier leur caractère hydrophobe.

Le but de ce chapitre est de concevoir une nouvelle famille de lipophosphoramides contenant deux fonctions thioéthers dans chacune des chaînes lipidiques des amphiphiles cationiques. Dans la même logique que lors du chapitre précédent, différents positionnements de ces fonctions thioéthers ont été envisagés. L'un des objectifs de ce chapitre est aussi de pouvoir conclure si la présence de deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique se traduit au niveau des propriétés physico-chimiques et des efficacités de transfection par un effet cumulatif en comparaison avec les amphiphiles cationiques ne comportant qu'une seule fonction thioether par chaîne. Une autre caractéristique de cette étude est de préparer une famille homogène de composés amphiphiles permettant d'identifier le plus clairement possible les contributions apportées par les fonctions thioéthers aux propriétés physico-chimiques et aux efficacités de transfection. Dans ce but, nous avons également inclus dans l'étude trois composés de références : **BSV 36** formé par deux chaînes oléyles (chaîne mono-insaturée ; C18 :1). **BSV 101** formé par deux chaînes stéaryles saturées (C18 :0) et **BSV S12** formé par deux chaînes contenant chacune une fonction thioether en position 12. Ce composé est l'un des composés

¹⁶⁵ E. N. Frankel, *Pro. Lipid. Res.*, **1980**, 19, 1-22.

les plus efficaces de la série de composés décrite dans le précédent chapitre. A noter que dans cette série de composés, tous les amphiphiles se caractérisent par la présence d'un groupe cationique identique qui est un cation alkyl-triméthylammonium. Par ailleurs le nombre d'atomes présents dans le squelette de la chaîne lipidique est dans tous les cas identique (18 atomes).

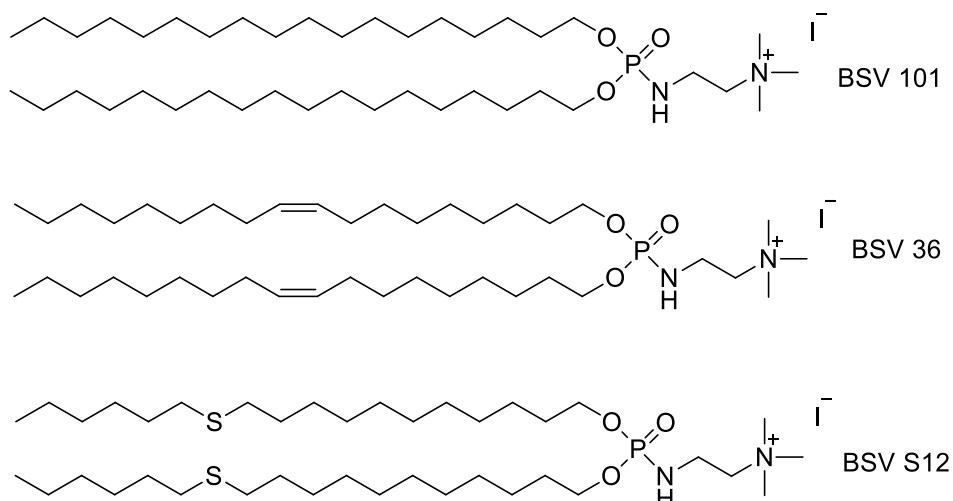


Figure 104 : Structure des trois composés de références pour cette étude

II. Synthèse des lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique.

L'objectif de ce chapitre est de synthétiser des amphiphiles cationiques caractérisés par la présence de deux fonctions thioéthers dans chaque chaîne lipidique. Pour cela, nous avons souhaité conserver le schéma de synthèse utilisé lors du chapitre précédent et rappelé ci-dessous.

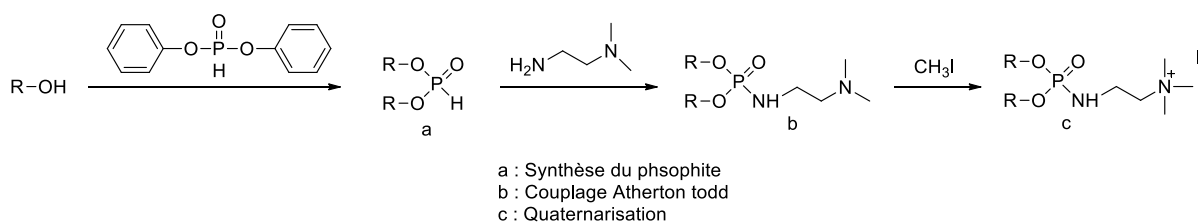


Figure 105 : Différentes étapes permettant d'accéder au phosphoramides avec R les chaînes lipidiques comportant deux fonctions thioéther.

Cependant, les alcools gras comportant deux fonctions thioéther ne sont pas commerciaux. La première étape consiste donc à mettre en place une stratégie de synthèse de ces composés.

1. Préparation des chaînes lipidiques comportant deux fonctions thioéthers.

Nous souhaitons disposer de trois composés amphiphiles possédant deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique en différentes positions. Pour leur synthèse nous avons utilisé la réaction thiol-ène comme indiqué sur la Figure 106.

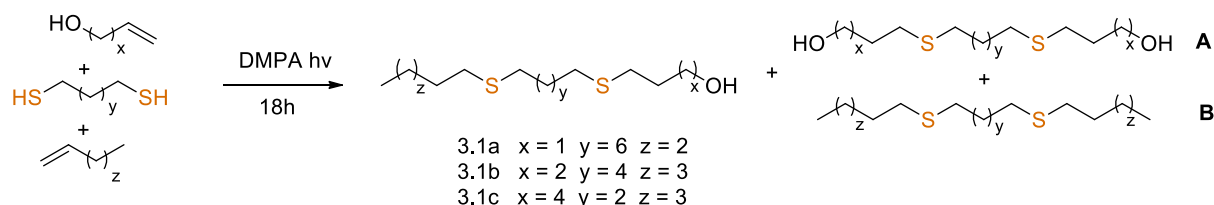


Figure 106 : Synthèse d'alcool contenant deux fonctions thioéthers

Il s'agit de réaliser une double réaction thiol-ène croisée engageant un alcane- ω -dithiol et deux alcènes dont l'un fonctionnalisé en ω par une fonction alcool. Le choix de la longueur du thiol et de l'alcool est fait dans le but d'avoir les atomes de soufre dans des positions différentes de la chaîne hydrophobe tandis que le choix de l'alcène est fait afin d'avoir une longueur totale de 18 atomes pour chaque chaîne grasse (*Tableau 12*).

Thiol	Alcool	Alcène	Position du soufre	Longueur totale
Octane dithiol	Alcool allylique	1-Pentène	4 et 13	18 atomes
Hexane dithiol	3-Buten-1-ol	1-hexène	5 et 12	18 atomes
Butane dithiol	5-Hexen-1-ol	1-hexène	7 et 12	18 atomes

Tableau 12: Choix des produits commerciaux pour la synthèse de l'alcool

L'alcool (1 équivalent), le thiol (1 équivalent) et l'alcène (1 équivalent) sont placés dans un tube de Schlenk avec une quantité catalytique de DMPA puis désoxygéné sous azote. Le mélange est par la suite irradié en utilisant des lampes UV (365 nm) pendant 1 nuit.

La réaction étant statistique, trois produits différents sont obtenus. Le premier ne contient aucune fonction alcool (composé B), le deuxième qui correspond au produit voulu contient une fonction alcool (**3.1a-c**) et le troisième contient deux fonctions alcool (composé A). La polarité différente des 3 composés a permis leur séparation grâce à une chromatographie sur gel de silice. L'alcool souhaité est obtenu finalement avec des rendements faibles comme le montre le *Tableau 13*.

Composé	Rendement
3.1a-c	10-20 %
A	60-70 %
B	15-25 %

Tableau 13 : Rendement obtenu suite à la réaction thiol-ène

Le tableau précédent montre que le composé le plus abondant est le composé A. Afin d'optimiser la quantité des composés **3.1** formés, un changement de la stœchiométrie est réalisé. Ainsi, 4 équivalents d'alcène non-fonctionnalisés, et 1 équivalent d'alcène-alcool sont ajoutés à 1 équivalent de di-thiol. Le mélange est placé sous lampe UV pendant la nuit.

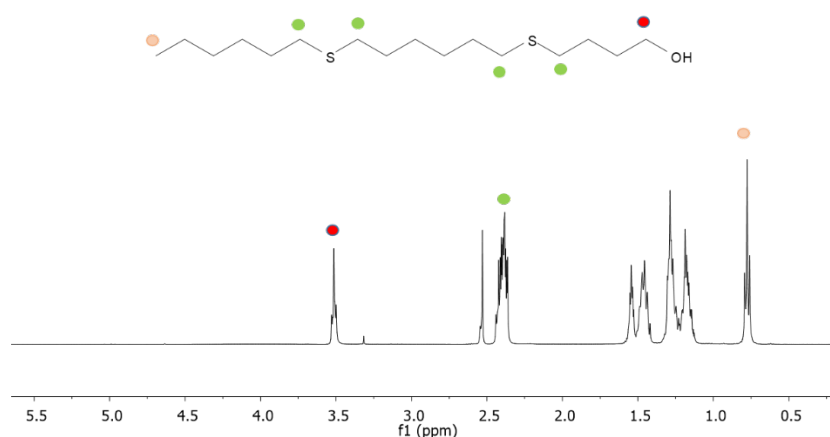


Figure 107 : Spectre RMN ^1H du composé **3.1b**

L'alcool attendu **3.1** est obtenu après chromatographie sur gel de silice, comme le montre le spectre RMN ^1H (Figure 107). Les rendements de la réaction sont compris entre 43 et 53 %.

Alcool attendu	Rendement`	Masse (g)
3.1a	53 %	2,7
3.1b	49 %	2,0
3.1c	45 %	1,2

Tableau 14: Rendements obtenus après changement de la stœchiométrie de la réaction thiol-ène

2. Préparation du phosphite

Une réaction de transestérification entre l'alcool obtenu et le diphenyle phosphite permet l'obtention du phosphite correspondant. La réaction se déroule à 130°C sous pression réduite ($4,2 \cdot 10^{-2}$ mbar) dans un système boule-à-boule (Kugelrohr). Le produit est obtenu quantitativement et sans purification.

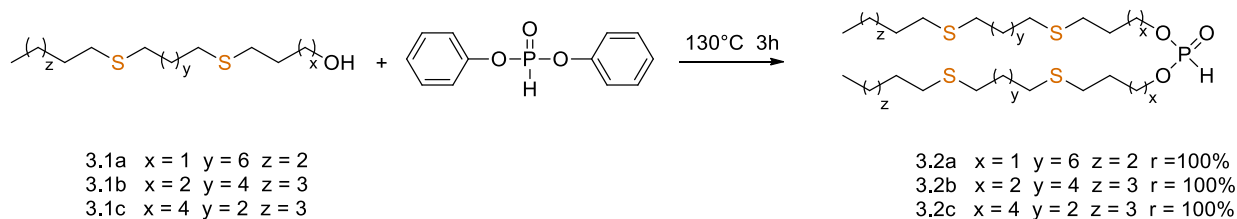


Figure 108 : Synthèse du phosphite

La formation du produit peut être vérifiée grâce à la présence d'un seul pic à 8.6 ppm sur le spectre RMN ^{31}P .

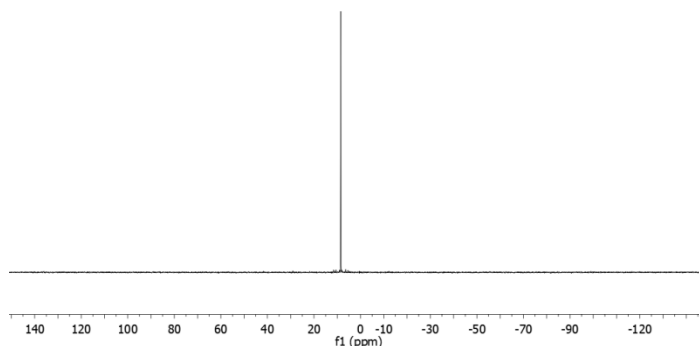


Figure 109 : Spectre RMN ^{31}P (CDCl_3) du composé **3.2b**

3. Synthèse des phosphoramides

L'étape suivante est un couplage Atherton-Todd mettant en jeu le diméthyle éthylène diamine et le phosphite en présence de DIPEA et du bromure de trichlorométhane (BrCCl_3) dans le dichlorométhane. Le produit est purifié par chromatographie flash pour donner le phosphoramide correspondant avec des rendements supérieurs à 65%.

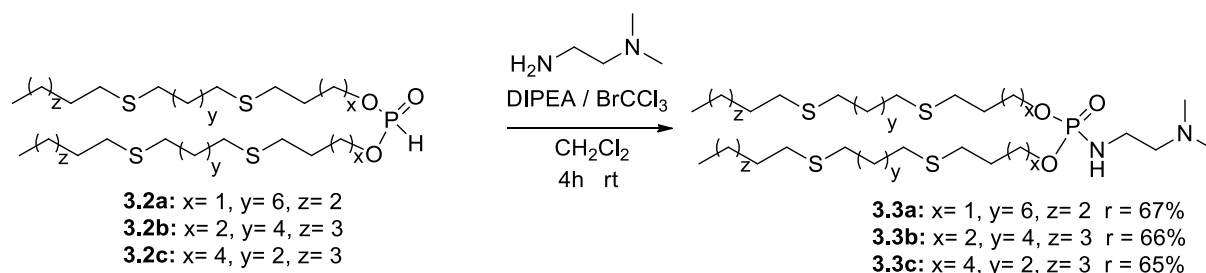


Figure 110 : Couplage Atherton Todd

4. Obtention des sels d'ammonium

La dernière étape de synthèse est une réaction de quaternarisation de l'amine tertiaire du phosphoramidate par ajout d'iodométhane. Comme pour le chapitre précédent la réaction est suivie par RMN ^{31}P . Une conversion totale du produit est observée après 3h. Le solvant est par la suite évaporé pour donner le produit final avec des rendements globaux compris entre 28 et 35% et des composés **3.4a-c** isolés avec des masses comprises entre 0.6 et 1.1 g.

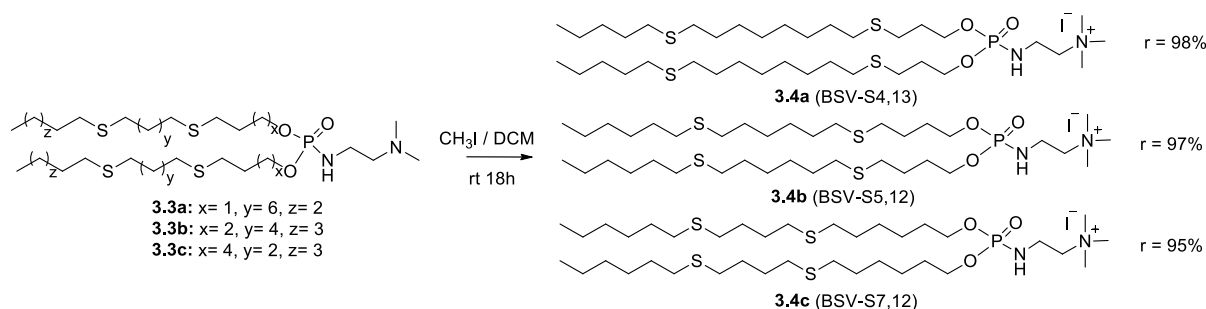


Figure 111 : Réaction de quaternarisation et structures des molécules finales

III. Détermination des propriétés physico-chimiques des lipides cationiques

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

Ayant à disposition les nouveaux amphiphiles cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne alkyle nous avons procédé à l'étude des propriétés physico-chimiques de ces composés. Ainsi, nous avons commencé par la détermination de la concentration d'agrégation critique. La méthode consiste à préparer une vingtaine d'échantillon à des concentrations allant de 1×10^{-6} à 1×10^{-4} . La concentration du rouge du Nil dans chaque échantillon est égale à 3×10^{-7} . La valeur de la CAC est déterminée en traçant la variation de la fluorescence en fonction de $\log(C)$.

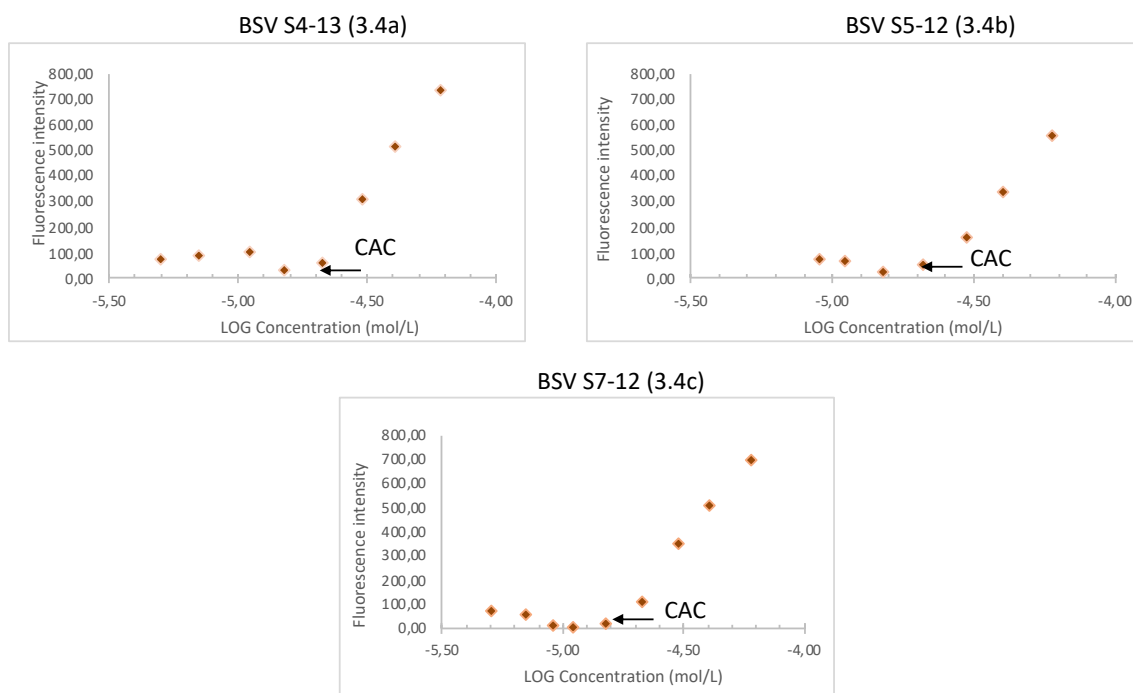


Figure 112: Courbes de Variation de la fluorescence en fonction de Log (C) pour la détermination des CAC des lipides cationiques

La CAC correspond au début de l'augmentation de la fluorescence comme indiqué sur la figure ci-dessus. Pour les 3 phosphoramides comportant deux fonctions thioéthers les valeurs de la concentration d'agrégation critique sont inférieures à 2.0×10^{-5} mol/L. Ces valeurs sont du même ordre que celles obtenues lors du chapitre précédent avec les lipides cationiques contenant une seule fonction thioéther par chaîne lipidique. Ceci indique que l'ajout d'une deuxième fonction thioéther au niveau de la partie hydrophobe des phosphoramides n'a pas d'effet significatif sur les valeurs de concentration d'agrégation critique.

2. Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par les tests d'anisotropie de fluorescence

La fluidité des phosphoramides **3.4a-c** synthétisés est déterminée en mesurant l'anisotropie de fluorescence de la sonde DPH en fonction de la température. Les courbes présentées sur la Figure 113 ci-dessous indiquent que le comportement de la sonde est similaire pour les 3 composés **3.4a-c**. Ceci indique que contrairement à ce qui était observé dans le chapitre précédent, où la position de l'atome du soufre avait une incidence majeure sur les températures de transition de phase des amphiphiles cationiques contenant une seule fonction thioéther par chaîne grasse (38°C pour **BSV S4** et 16°C pour **BSV S12**), la position des

2 atomes de soufres dans les lipides cationiques disoufrés ne semble pas avoir un effet majeur sur l'anisotropie, dans la gamme de température étudiée (entre 5 et 40°C).

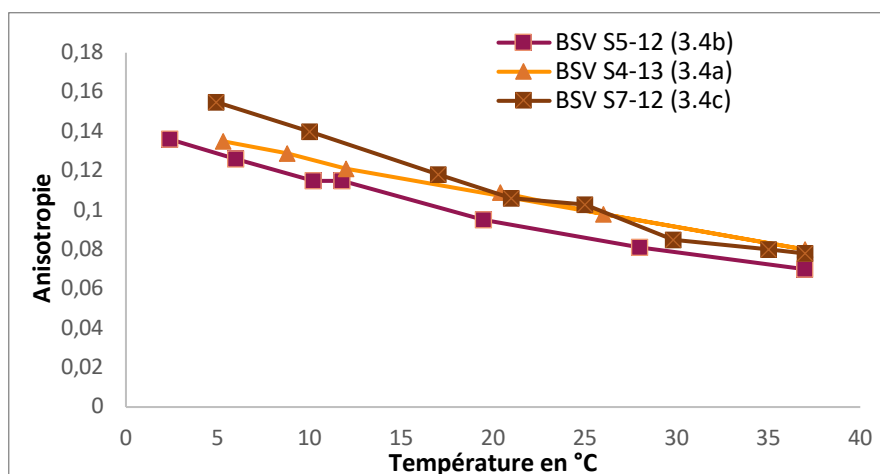


Figure 113: Anisotropie de fluorescence des nouveaux lipides cationiques

D'autre part, Il est possible de noter que les valeurs d'anisotropie augmentent légèrement en diminuant la température. Cependant l'absence d'une variation nette de la valeur d'anisotropie indique que les mesures sont réalisées à des températures supérieures à la (T_m). Nous pouvons conclure donc que les températures de transition de phase de ces nouveaux composés sont inférieures à 5°C (Température minimale des mesures réalisées).

Composé	Valeur de T_m
BSV S4-13 (3.4a)	<5°C
BSV S5-12 (3.4b)	<2°C
BSV S7-12 (3.4c)	<5°C
BSV S4 (2.4c)	38°C
BSV S12 (2.4b)	16°C
BSV 36 (C₁₈₋₁)	<0°C
BSV 101 (C₁₈₋₀)	54°C

Tableau 15: Valeurs de la température de transition de phase des lipides cationiques

L'absence de transition de phase au-delà de 5°C fait aussi apparaître un effet cumulatif. En effet, comme indiqué dans le premier chapitre, l'incorporation d'un atome de soufre dans une chaîne alkyle saturée entraîne la diminution de la valeur de (T_m) des phosphoramides. Ainsi, contrairement au composé **BSV 101** formé par des chaînes stéaryles saturées ayant une $T_m = 54^\circ\text{C}$, le composé **BSV S12** dont la chaîne alkyle contient une fonction thioéther a une $T_m =$

16°C. L'addition d'une deuxième fonction thioéther dans la chaîne hydrophobe diminue davantage les valeurs de la température de transition de phase des molécules (< 5°C).

A noter que la présence de deux fonctions thioéthers dans la structure des composés **3.4a-c** se traduit, comme pour le composé **BSV 36** (chaînes oléyles), par une transition de phase à une température < 5°C (*Tableau 15*). Nous pouvons donc conclure que la fluidité des chaînes lipidiques (observée par anisotropie de fluorescence) est assez comparable dès lors que ces chaînes comportent soit deux fonctions thioéthers soit une insaturation de configuration Z (chaîne oléyles).

3. Isothermes de compression

Le comportement des lipides cationiques à l'interface air/eau est étudié par la technique d'isothermes de compression. Les mesures sont réalisées comme suit : un volume de 25 µL d'une solution de lipide cationique (1mM) est déposé à l'interface de la cuve de Langmuir contenant 400 mL d'eau distillé. Après évaporation du solvant, les molécules sont comprimées à l'aide de barrières mobiles réglées à une vitesse de 5 cm²/min. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante.

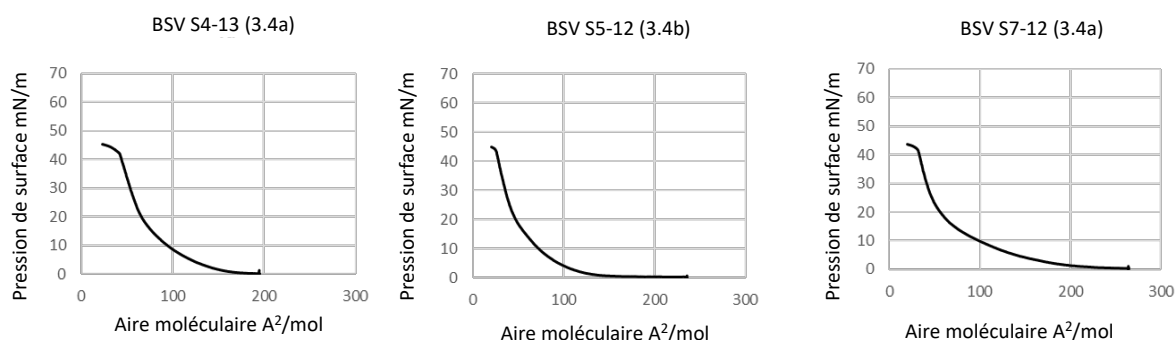


Figure 114: Isothermes de compression des composés contenant deux fonctions thioéthers

Trois informations importantes peuvent être tirées des isothermes obtenus :

- L'aire moléculaire au lift-off indiquant l'aire occupée par la molécule quand la pression commence à augmenter.
- L'aire moléculaire au collapse correspondant à l'aire minimale que la molécule occupe dans l'état le plus dense de la monocouche.
- La pression au collapse c'est la pression pour laquelle les molécules de la monocouche ne peuvent plus se réarranger pour absorber l'excès de la pression. Ce qui entraîne la destruction de la monocouche.

Les résultats obtenus sont présentés dans le *Tableau 16*

Composé	Aire moléculaire au lift off ($\text{\AA}^2/\text{molécule}$)	Aire moléculaire au collapse ($\text{\AA}^2/\text{molécule}$)	Pression de surface au collapse (mN/m)
BSV S4-13 (3.4a)	165 ± 2	41 ± 2	42 ± 0.25
BSV S5-12 (3.4b)	154 ± 2	25 ± 2	45 ± 0.25
BSV S7-12 (3.4c)	227 ± 2	30 ± 2	42 ± 0.25
BSV S12 (2.4b)	180 ± 2	45 ± 2	47 ± 0.25
BSV 36	160 ± 2	75 ± 2	47 ± 0.25
BSV 101	80 ± 2	45 ± 2	58 ± 0.25

Tableau 16: Principales valeurs extraites des isothermes de compression

L'aire moléculaire au lift off des nouveaux lipides cationiques est comprise entre 154 et 227 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. Ces valeurs sont nettement supérieures à l'aire moléculaire occupée par le composé **BSV 101** formée par des chaînes saturées (80 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$). Cependant, les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur que le composé comportant des chaînes lipidiques mono-soufrées (**BSV S12**).

D'autre part, les différences observées entre les composés disoufrés nous semblent assez difficiles à rationaliser. Néanmoins, ces résultats confirment que les composés comportant une ou plusieurs fonctions thioéthers ont tendance à s'étaler à la surface. Cette propriété d'étalement pourrait s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène faibles entre les fonctions thioéthers et la surface aqueuse.

En comprimant les molécules, la pression de surface des composés disoufrés augmente progressivement indiquant que les chaînes réarrangent leur conformation pour s'adapter à la compression latérale. Cette forte capacité de réarrangement se traduit par une faible surface moléculaire au collapse (25 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour le composé **BSV S5-12**). Ces valeurs restent très proches de la surface au collapse du composé **BSV 101**.

Cette étude confirme que les composés soufrés (mono ou di) peuvent se réarranger pour réduire très fortement leur surface moléculaire. Ce comportement contraste avec le composé comportant une mono-insaturation (**BSV36**) dont la surface moléculaire au collapse est de 75 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. Dans ce cas l'insaturation apparaît comme un frein à l'obtention d'un assemblage compact.

D'autre part, les phosphoramides contenant deux fonctions thioéthers affichent les pressions de surface les plus faibles au collapse (42 à 45 mN/m²) indiquant que les monocouches sont moins stables face à la compression que les composés de références. Ainsi la destruction de la monocouche intervient à des pressions plus basses. Il est à noter qu'un effet additif est observé pour cette pression au collapse, puisque la pression évolue comme suit : **BSV 101** (C18 :0) 58 mN/m >> Composé mono-soufré (**BSV S12**) ≈ mono-insaturation (**BSV 36**) 47 mN/m > Composé disoufrés 42-45 mN/m.

4. Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique d'analyse optique qui permet de renseigner, par comparaison, l'épaisseur de la monocouche lipidique. En effet, il existe une relation linéaire entre l'angle ellipsométrique Δ et la concentration surfacique Γ . Ainsi, plus la valeur de Δ augmente plus la monocouche formée est épaisse et inversement. Les mesures d'ellipsométrie sont réalisées au même moment que les isothermes de compression. Deux valeurs de l'angle ellipsométrique sont intéressantes :

- Delta min : qui correspond à la valeur de l'angle Δ au lift-off
- Delta max : qui correspond à la valeur de Δ juste avant le collapse

Les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau ci-dessous

	Delta min Δ min °	Delta max Δ max °	Delta Δ (Delta max - Delta min) °
BSV S4-13 (3.4a)	3.6 ±0.1	10.1 ±0.2	6.5 ±0.2
BSV S5-12 (3.4b)	2.0 ±0.1	9.8 ±0.1	7.8 ±0.1
BSV S7-12 (3.4c)	3.3 ±0.1	10.6 ±0.1	7.3 ±0.1
BSV S12 (2.4b)	1.5 ±0.1	7.7 ±0.1	6.2 ±0.1
BSV 36	3.5 ±0.1	5.8 ±0.1	2.3 ±0.1
BSV 101	6.1 ±0.1	9.3 ±0.1	3.2 ±0.1

Tableau 17: valeurs de l'angle ellipsométrique Δ

Aux faibles pressions (lift-off), les valeurs de Δ min des lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers sont comprises entre 2 et 3,6°. Le composé **BSV 36** avec les chaînes

oléyles affiche un comportement semblable ($\Delta \text{ min} = 3.5^\circ$). Ces valeurs sont en cohérence avec la surface moléculaire au lift off (Tableau 16) qui étaient bien plus importantes (160-227 Å²/molécule) pour les composés disoufrés et le composé **BSV 36** que pour le composé **BSV 101** (80 Å²/molécule). Donc logiquement, plus la surface moléculaire est grande plus l'épaisseur du film est faible.

Au collapse, la valeur de $\Delta \text{ max}$ du **BSV 36** est la plus faible. Cette observation est attribuée à la présence de la double liaison qui empêchent un assemblage compact des chaînes lipidiques. Ainsi les monocouches formées sont les moins épaisses ($\Delta \text{ max}^\circ = 5.8 \pm 0.1^\circ$). L'utilisation de chaînes saturées comme pour le composé **BSV 101** entraîne une augmentation de la valeur de $\Delta \text{ max}$ ($\Delta \text{ max} = 9.3 \pm 0.1^\circ$). Ceci est due à la formation d'un arrangement « all-trans » de la chaîne lipidique et probablement à l'orientation de celle-ci perpendiculairement à la surface. Au collapse, les valeurs de $\Delta \text{ max}$ des nouvelles molécules varient entre 9.8 et 10.6°. Ceci indique que sous l'effet de la compression latérale les amphiphiles cationiques disoufrés adoptent une conformation compacte des chaînes lipidiques et probablement une orientation perpendiculaire à la surface de l'eau. L'épaisseur du film formé est alors comparable à celle du composé avec les chaînes saturées présentes dans le composé **BSV 101**.

La dernière colonne du *Tableau 17* indique la différence entre les valeurs de $\Delta \text{ min}$ et $\Delta \text{ max}$. Plus la valeur de $\delta\Delta$ est importante plus les chaînes lipidiques sont capables d'adapter leur conformation en fonction de la pression latérale (faible ou forte). Cette adaptabilité est beaucoup plus faible pour les chaînes oléyles présentes dans le composé **BSV 36** ($\delta\Delta = 2.3^\circ$) ou pour les chaînes stéaryles présentes dans le composé **BSV 101** ($\delta\Delta = 2.3^\circ$). A noter également que la présence de deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique augmente la valeur de $\delta\Delta$ par rapport au composé monosoufré **BSV S12** faisant apparaître un effet additif lié à la présence de plusieurs fonctions thioéthers.

Pris dans son ensemble, ces résultats montrent que la présence d'une fonction thioéther par chaîne lipidique ou plus encore de deux fonctions thioéthers permet aux chaînes lipidiques d'adapter leur conformation à la pression latérale.

IV. Études des propriétés de transfection des nouveaux phosphoramides contenant deux fonctions thioéthers par chaîne alkyle.

1. Détermination de la taille et du potentiel zêta des amphiphiles cationiques

Les nouveaux amphiphiles cationiques contenant deux fonctions thioéthers ainsi que les 3 composés de références sont formulés par la méthode d'hydratation du film lipidique. Après hydratation du film à 4°C pendant une nuit. Les formulations sont placées dans un bain à ultrasons à 60°C pendant 30 minutes puis caractérisées par DLS afin de déterminer la taille et le potentiel zêta des liposomes formés.

	Taille (nm)	Pdl	Zeta (mV)
BSV S4-13 (3.4a)	89 ± 2	0.34	+ 69 ± 3
BSV S5-12 (3.4b)	83 ± 1	0.28	+ 44 ± 2
BSV S7-12 (3.4c)	82 ± 3	0.38	+ 71 ± 4
BSV S12 (2.4b)	94 ± 1	0.34	+ 69 ± 1
BSV 36	200 ± 4	0.35	+ 48 ± 2
BSV 101	198 ± 3	0.31	+ 59 ± 1

Tableau 18: Mesure de la taille et du potentiel zêta des lipides cationiques

Les lipides cationiques possédant deux fonctions thioéthers forment des liposomes de tailles comprises entre 82 et 89 nm. Ces observations semblent confirmer les résultats du premier chapitre indiquant que l'introduction d'une fonction thioéther dans le domaine hydrophobe des phosphoramides permet la formation de liposomes avec un rayon de courbure supérieur à celui obtenu avec des chaînes saturées ou insaturées. L'utilisation de chaînes hydrophobes contenant une ou plusieurs fonctions thioéthers peut alors être une stratégie pour produire des liposomes s'auto-organisant avec des tailles inférieures à 100 nm.

Il est décrit dans la littérature que l'augmentation d'un rayon de courbure pour une bicouche lipidique se traduit par une augmentation de la pression latérale du feuillet interne et une diminution de la pression latérale du feuillet externe.¹⁶⁶ Compte tenu de la capacité d'adaptation à la pression latérale des composés amphiphiles comportant des fonctions thioéthers dans le domaine lipidique, l'obtention de liposomes de taille plus petite pour ces composés que pour les composés **BSV36** ou **BSV 101** semble donc assez logique.

¹⁶⁶ B. J. Larsen, C. Kennard, S. L. Pedersen, K. J. Jensen, M. J. Uline, N. S. Hatzakis, D. Stamou, *Biophys. J.*, **2017**, 113, 1269–1279.

L'indice de polydispersité (Pdl) est compris entre 0.2 et 0.35 pour toutes les formulations testées. Ces valeurs indiquent que les populations formées ne sont pas homogènes (Pdl > 0.1) Le potentiel zêta est fortement positif quel que soit le composé étudié ceci est concordant avec la nature cationique des molécules synthétisées.

Afin d'évaluer la stabilité de ces formulations face à l'oxydation, les solutions liposomales précédemment préparées ont été stockées à 4°C. Une nouvelle mesure de taille et de potentiel zêta est effectuée au bout de 3 mois. Les résultats obtenus présentés dans le tableau suivant montrent une très faible variation de la taille et de l'indice de polydispersité des liposomes. Les potentiels zêta ont cependant tous diminué les valeurs obtenues restent néanmoins positives. Ces résultats affirment donc une bonne stabilité de ces formulations face à l'oxydation.

	Taille (nm)	Pdl	Zeta (mV)
BSV S4-13 (3.4a)	102 ± 1.9	0.38	24 ± 3
BSV S5-12 (3.4b)	85 ± 2.24	0.34	42 ± 2
BSV S7-12 (3.4c)	82 ± 2.9	0.38	49 ± 1

Tableau 19: Stabilité des solutions liposomales après 3 mois

2. Détermination de la taille et du potentiel zêta des lipoplexes

Si l'étude des liposomes permet de mettre en évidence l'impact de l'introduction des fonctions thioéthers sur la taille et le potentiel zêta des formulations, il est aussi intéressant d'évaluer l'impact que peut avoir cette substitution sur les complexes ADN/amphiphile cationique. D'autant plus que ce sont les lipoplexes qui seront déposés sur les cellules pour réaliser les tests de transfection.

	CR=2	CR=4	CR=6
BSV S4-13 (3.4a)	452 ± 4	291 ± 7	263 ± 4
BSV S5-12 (3.4b)	410 ± 5	223 ± 2	216 ± 5

BSV S7-12 (3.4c)	456 ± 4	195 ± 5	184 ± 2
BSV S12 (2.4b)	203 ± 6	150 ± 8	157 ± 7
BSV 36	545 ± 10	219 ± 2	209 ± 2
BSV 101	440 ± 8	200 ± 10	181 ± 9

Tableau 20 : Mesure de la taille des lipoplexes à différents rapports de charge

Les lipoplexes sont préparés à différents rapports de charge (CR= 2, 4 et 6) suivant le protocole détaillé au cours du chapitre précédent. Les résultats obtenus montrent la formation d'objets de tailles supérieures à 400 nm au rapport de charge 2 pour toutes les formulations sauf pour le **BSV S12** dont la taille est égale à 203 nm (*Tableau 20*). L'augmentation de la quantité de lipide cationique entraîne la diminution de la taille des lipoplexes qui passe à 200 nm pour les CR 4 et 6.

	CR=2	CR=4	CR=6
BSV S4-13 (3.4a)	37 ± 2	45 ± 5.5	58. ± 2.1
BSV S5-12 (3.4b)	31 ± 3	45 ± 4.7	58 ± 4.5
BSV S7-12 (3.4c)	29 ± 2	42 ± 3.6	54 ± 3.6
BSV S12 (2.4b)	30 ± 2	49 ± 3.7	51 ± 6.4
BSV 36	36 ± 3	42 ± 8.3	54 ± 7.0
BSV 101	45 ± 1	53 ± 4.3	54 ± 8.4

Tableau 21: Variation du potentiel zêta des lipoplexes en fonction du CR

D'une manière générale toutes les formulations testées présentent des potentiels zêtas positifs. Il est aussi à noter que les valeurs du potentiel zêta augmentent logiquement en augmentant la quantité du lipide cationique dans les formulations.

3. Test de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Avant d'effectuer les transfections sur les cellules, il est important d'évaluer la capacité des vecteurs à complexer l'ADN, et de déterminer le rapport de charge pour lequel la totalité d'ADN est complexé. Pour ceci des tests de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose sont effectués. Les résultats obtenus indiquent une complexation totale de l'ADN pour les 3 nouveaux lipides cationiques à partir d'un CR = 2 (*Figure 115 A*).

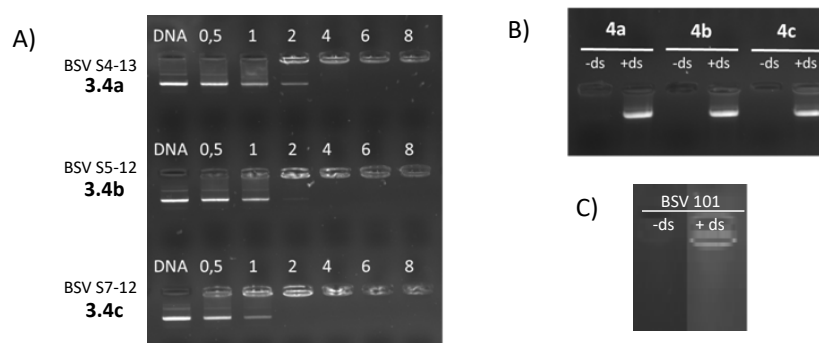


Figure 115: A) complexation d'ADN (PGM144) pour des charges ratio entre 0.5 et 8, l'ADN nu est utilisé comme contrôle négatif. B) décomplexation d'ADN par ajout de dextran sulfate (ds), C) décomplexation de l'ADN par ajout de dextran sulfate pour le composé BSV 101. Afin d'étudier la stabilité des lipoplexes, le polymère polyanionique sulfate de dextran est ajouté aux formulations. Le sulfate de dextran établit des interactions électrostatiques avec les lipides cationiques entraînant la déstabilisation du lipoplexe et la libération de l'ADN. Les résultats obtenus indiquent la libération totale de l'ADN des complexes formés par les phosphoramides contenant deux fonctions thioéthers (*Figure 115-B*). Cependant, aucune décomplexation n'est observé pour le composé **BSV 101** formé de chaîne stéaryle indiquant la formation de complexes très stables (*Figure 115-C*).

4. Évaluation des propriétés de transfection *in vitro*

L'efficacité de transfection des lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers est évaluée à différents rapports de charge (0.5 à 8) et sur 3 lignées cellulaires. La lignée A549 issue de l'adénocarcinome pulmonaire humain. La lignée 16HBE est non cancéreuse provenant de l'épithélium bronchique immortalisés et la lignée C2C12 provenant du myoblaste musculaire.

Les composés **BSV S12**, **BSV 101** et **BSV 36** sont choisis comme référence et les cellules seules sont utilisées comme contrôle négatif.

Les 3 nouveaux phosphoramides transfectent efficacement les 3 lignées cellulaires testées. Il est aussi intéressant de noter que les meilleurs résultats sont observés pour un rapport de charge égal à 4 (*Figure 116*).

Globalement, peu de différence est observée entre les 3 phosphoramides contenant les deux fonctions thioéthers. Ces résultats corroborent les observations faites lors de l'étude des propriétés physicochimiques de ces molécules. En effet, les tests d'anisotropie de fluorescence et les isothermes de compression montrent un comportement similaire de ces composées. Ceci indique que la position des deux atomes de soufre dans la chaîne grasse à

peu d'influence sur les propriétés physico-chimiques et les propriétés de transfection de ces molécules.

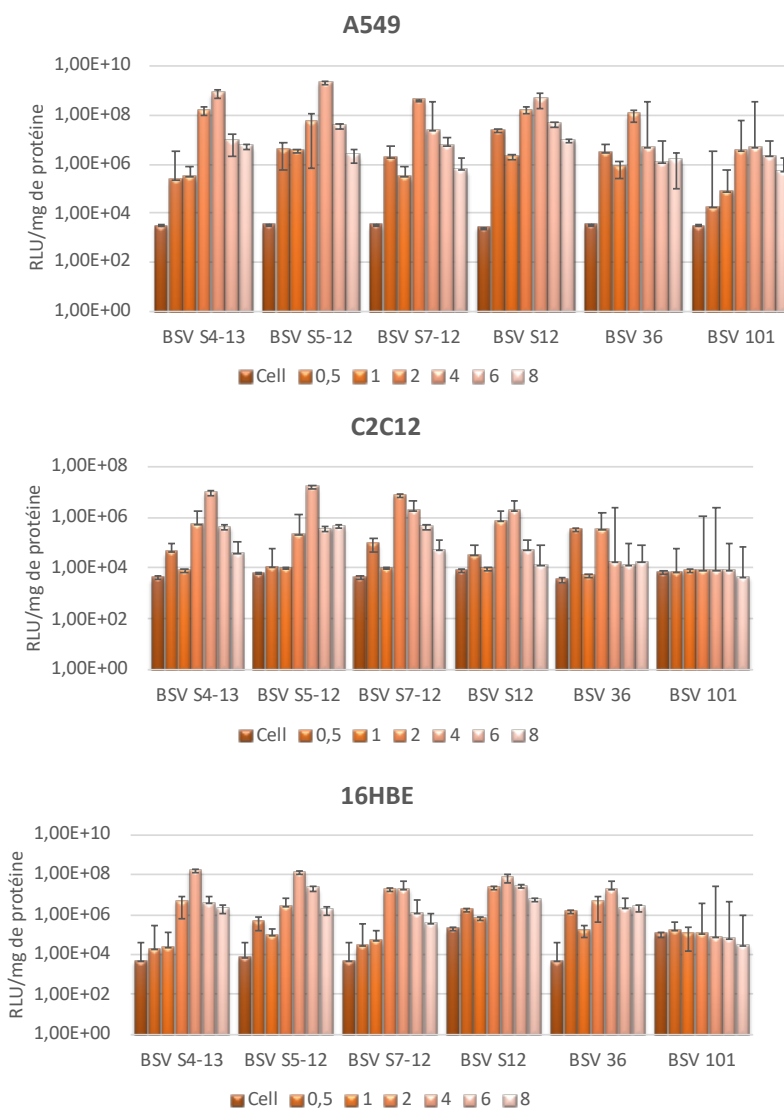


Figure 116: Évaluation de propriétés de transfection *in vitro* des lipides cationiques sur 3 lignées cellulaire

D'autre part, les résultats de transfection des lipides cationiques contenant deux fonctions thioéthers sont sensiblement meilleurs que ceux obtenus avec le composé **BSV S12** (le meilleur composé de la série des phosphoramides contenant une seule fonction thioéther). L'efficacité de transfection du composé **BSV 101** est la plus faible parmi les composés testés. Ceci peut être expliqué par la formation de complexes très stable avec l'ADN. Ainsi, un complexe ADN/lipide cationique trop stable défavorise l'étape de l'échappement endosomal et entraîne probablement la dégradation de l'ADN suite à l'acidification de l'endosome.

5. Évaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par un test de bioluminescence basé sur la quantification de l'adénylate kinase libérée par les cellules endommagées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous. (Les résultats sont normalisés avec les résultats obtenus avec les cellules non traitées).

Sur la lignée 16HBE toutes les formulations testées maintiennent un taux de viabilité cellulaire supérieure à 80% y compris pour des rapports de charges élevés (CR > 4). Contrairement sur la lignée C2C12, la viabilité cellulaire décroît en augmentant le charge ratio pour les composés contenant deux fonctions thioéthers. Le composé **BSV S5-12** semble être le plus toxique ; la viabilité cellulaire ne dépasse pas 40% pour les rapports de charges 4 et 6.

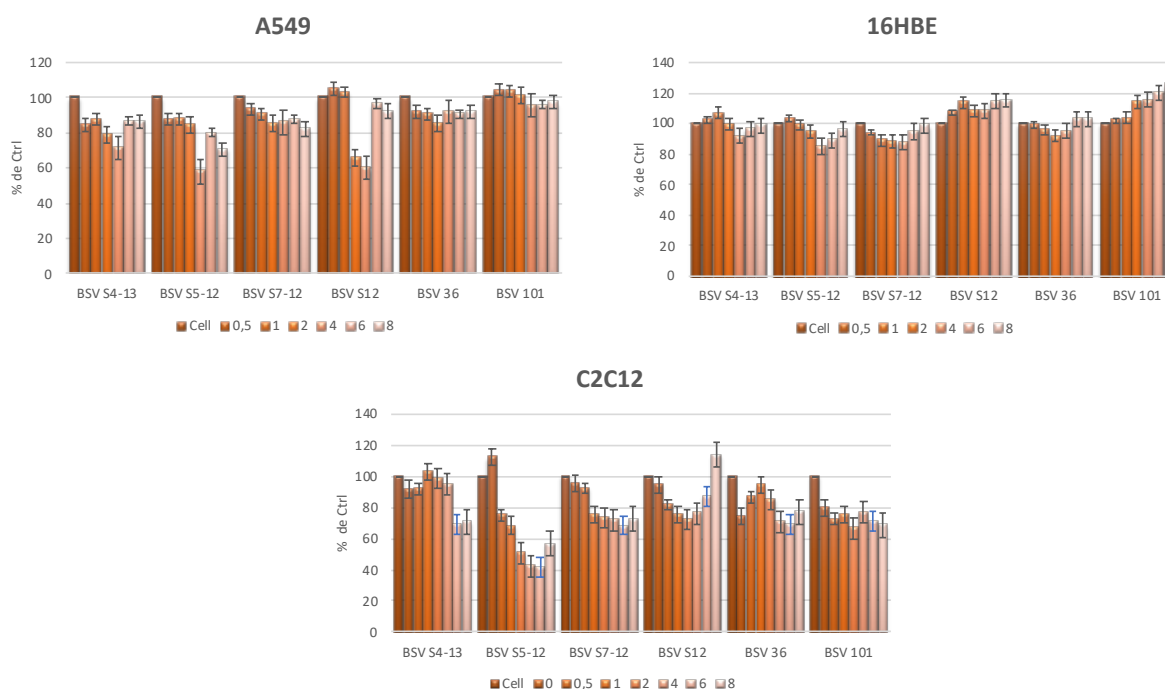


Figure 117 : Étude de la viabilité cellulaire des lipides cationiques

Sur la lignée A549, parmi les nouveaux phosphoramides contenant deux atomes de soufre, seul le composé **BSV S7-12** maintient un taux de viabilité cellulaire supérieure à 80% pour tous les rapports de charges. Il est aussi important de noter que ce composé est le plus efficace en transfection sur cette lignée.

Globalement, la toxicité des nouveaux phosphoramides est lignée dépendante et comparable aux 3 composés de référence **BSV S12**, **BSV 101** et **BSV 36**.

V. Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre nous avons décrit une stratégie pour la synthèse d'amphiphiles cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne alkyle. Cette méthode comporte 4 étapes. En premier lieu, une réaction thiol-ène croisées entre un alcool contenant une double liaison en position ω , un alcène, et un alcane dithiol. Bien qu'il s'agisse d'une réaction statistique qui conduit à la formation de trois composés différents. La différence de polarité des produits obtenus et l'optimisation de la réaction permet d'isoler l'alcool souhaité avec des rendements acceptables et des quantités de matière supérieures au gramme.

Suite à cette première étape, la synthèse des nouveaux phosphoramides se poursuit en suivant les mêmes étapes citées lors du chapitre précédent à savoir : une réaction de transestérification avec le diphénylphosphite pour former le phosphite, suivi d'un couplage Atherthon-Todd qui permet d'accéder au phosphoramide et finalement une réaction de quaternarisation avec l'iodométhane permet l'obtention des molécules finales avec des rendements globaux de 28 à 35%.

L'étude de la fluidité des molécules par anisotropie de fluorescence indique un effet cumulatif des fonctions thioéthers. En effet si pour les phosphoramides contenant un seul atome de soufre par chaîne grasse, il est possible d'observer une transition de phases (*gel versus fluide*) à des températures entre (38 et 16°C) selon la position de l'atome du soufre. Dans le cas des phosphoramides synthétisés au cours de ce chapitre, nous avons observé une absence de transition dans la gamme de température testée. Ceci indique que la présence de deux fonctions thioéthers par chaîne grasses des phosphoramides conduit à l'augmentation de la fluidité des assemblages formés.

Dans un autre contexte, l'étude du comportement des nouveaux amphiphiles cationiques à l'interface air/eau montre qu'en absence de pression latérale, ces molécules occupent une large surface suggérant l'établissement de liaisons hydrogènes faibles entre les fonctions thioéthers et la surface aqueuse. Aux fortes pressions latérales, il est possible de noter la capacité de ces molécules à réduire leur surface moléculaire par l'adoption de conformations « all trans ».

Une fois formulés en liposomes, la mesure de tailles des agrégats obtenus par DLS montre l'obtention de liposomes de petites tailles. Ces valeurs peuvent s'expliquer par la capacité d'adaptation de ces composés aux pressions latérales variables.

Finalement, l'étude des propriétés de transfection des phosphoramides cationiques synthétisés montre qu'ils peuvent être considérés comme de bons candidats pour la vectorisation d'acide nucléique avec une efficacité de transfection nettement supérieure au composé **BSV 36** (choisi comme référence pour cette étude).

La toxicité de ces molécules sur certaines lignées cellulaires est cependant un obstacle pouvant empêcher leurs utilisations pour la réalisation de test *in vivo*.

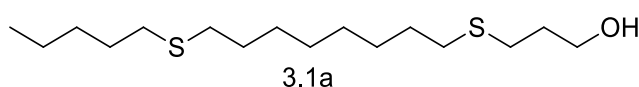
Ces travaux ont fait l'objet d'un deuxième article publié en 2019 dans le journal ChemPhysChem et dont les références sont les suivantes :

A. Bouraoui, R. Ghanem, M. Berchel, V. Vié, Y. Le Guen, G. Paboeuf, L. Deschamps, T. Le Gall, T. Montier, P.A. Jaffrès, **Bis-thioether containing lipid chains in cationic amphiphiles: physicochemical properties and application for gene delivery**, ChemPhysChem, 2019, 20, 2187-2194.

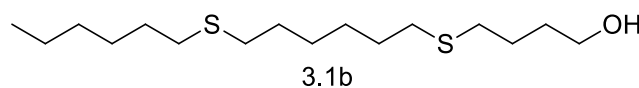
En termes de perspective il serait intéressant de déterminer la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire produit par ces molécules. Pour une telle étude, des expériences de RMN ^{31}P en milieu organisé pourraient être envisagées.

VI. Partie expérimentale

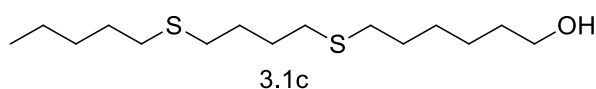
Synthesis of compound 3.4a-c: Alkenol (1 equivalent), alkene (4 equivalents) and alkanedithiol (1 equivalent) were placed in a Schlenk tube with 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone DMPA (0.4 equivalent) and degassed under argon for 10 min. The mixture was then placed under UV light at 18-20°C for 18h. The crude product was purified using flash chromatography Hexane/AcOEt to give the desired product.



3.1a (2.7 g ; Yield 53%): starting materials : allyl alcohol (1 g, 17.2mmol), octan-1,8-dithiol, pent-1-ene ; $R_f = 0.16$ (Hex/AcOEt 9/1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.86$ (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.26-1.32 (m, 14H), 1.51-1.54 (m, 6H), 1.75-1.79 (m, 2H), 2.23 (m, 1H); 2.42-2.48 (m, 6H), 2.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 7.4$ Hz); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.5, 22.1, 27.3-31.4, 35.6, 62.1$.

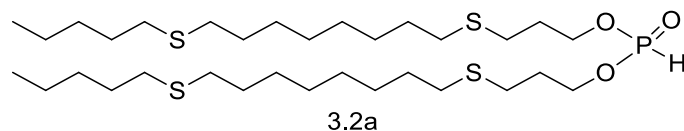


3.1b (2 g ; Yield 49%): starting materials : but-3-en-1-ol (1 g, 13.8 mmol), hexan-1,6-dithiol, hex-1-ene ; $R_f = 0.13$ (Hex/AcOEt 9/1) ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.79$ (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.17-1.21 (m, 6H), 1.28-1.32 (m, 6H), 1.47-1.49 (m, 6H), 1.56-1.58 (m, 4H), 2.28-2.49 (m, 8H), 3.51-3.54 (m, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.4, 20.8, 25.3, 27.0-31.5, 61.3$.

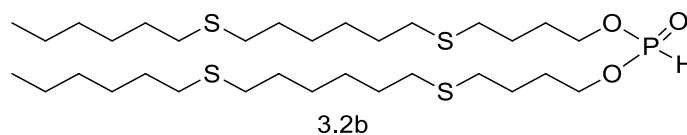


3.1c (1.3 g; Yield 45%): starting materials : hex-5-en-1-ol (1 g, 10.0 mmol), butan-1,4-dithiol, hex-1-ene ; $R_f = 0.12$ (Hex/AcOEt 9/1) ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 1.22-1.27 (m, 6H), 1.30-1.32 (m, 6H), 1.44-1.49 (m, 6H), 1.54-1.63 (m, 4H), 2.19 (m, 1H), 2.40-2.45 (m, 8H), 3.53 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.5, 22.0, 24.8, 28.0-32.1, 62.1$.

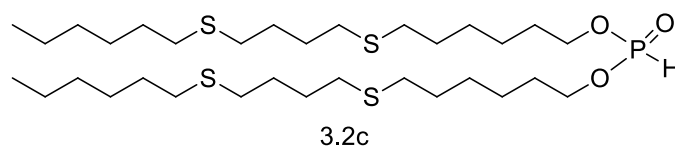
Synthesis of compound 3.2a-c: Compound **3.1** (2.2 equivalents) and diphenyl phosphite (1 equivalent) were mixed and heated at 130 °C in a Kugelrohr distillation under reduced pressure ($4.2 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h. Phenol is removed by distillation. The undistilled compound correspond to the desired product.



3.2a (1.0 g; Yield 100%): starting materials: diphenylphosphite (0.35 g, 1.5mmol), compound **1a** (2.2 equivalents); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.84$ (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.24-1.32 (m, 24H), 1.50-1.52 (m, 12H), 1.89-1.92 (m, 4H), 2.44 (t; $J = 7.4$ Hz, 12 H), 2.55 (t, $J = 7$ Hz, 4H), 4.110-4.17 (m, 4H), 5.91-7.68 (d, $^1J_{\text{HP}} = 700.3$ Hz, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.6$.

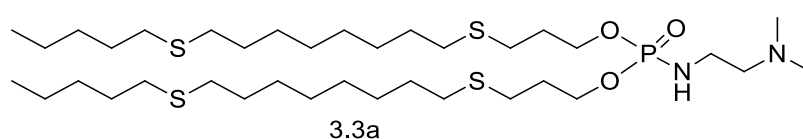


3.2b (1.5 g; Yield 100%): starting materials : diphenylphosphite (0.52 g, 2.2 mmol), compound **1b** (2.2 equivalents); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.85$ (t ; $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.28-1.38. (m, 12H), 1.49-1.56 (m, 12H), 1.63-1.69 (m, 12H), 1.74-1.76 (m, 4H), 1.77-1.79 (m, 4H) 2.43-2.52 (m, 16H), 4.02-4.09 (m, 4H), 5.91-7.65 (d, $^1J_{\text{HP}} = 695.6$ Hz, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.4$.

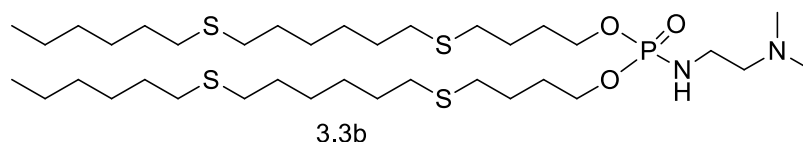


3.2c (2.0 g; Yield 100%): starting materials : diphenylphosphite (0.73 g, 3.1 mmol), compound **1b** (2.2 equivalents); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.86$ (t ; $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.26-1.28 (m, 12H), 1.31-1.38 (m, 12H), 1.52-1.58 (m, 12H), 1.63-1.68 (m, 12H), 2.47-2.49 (m, 16H), 3.99-4.04 (m, 4H), 5.91-7.64 (d, $^1J_{\text{HP}} = 693.6$ Hz);). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.8$.

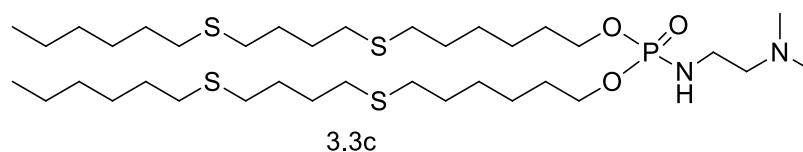
General protocol for the synthesis of compounds 3.3a-c: To a solution of compound **3.2** (1 equivalent) in 20 mL CH₂Cl₂ was added *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 equivalent), DIPEA (1.1 equivalent) and BrCCl₃ (1.1 equivalent) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 4 h. at rt. The solvent was evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 10 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was then dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂, washed with water, dried over MgSO₄ filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using CH₂Cl₂/MeOH: 90/10 (v/v) as eluant to produce a colorless oil.



3.3a (0.7 g; Yield 67%): starting materials: compound **2a** (1 g; 1.5 mmol); **Rf = 0.2** (DCM/MeOH 9/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.86 (t, J=7.1 Hz, 6H), 1.26-1.33 (m, 24H), 1.51-1.54 (m, 12H), 1.86-1.92 (m, 4H), 2.19 (s, 6H), 2.36 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 2.45 (t, J= 7.4 Hz, 12H), 2.55 (t, J= 7.2 Hz, 4H), 2.92-2.96 (m, 1H), 4.01-4.06 (m, 4H); ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃, 162 MHz) δ= 10.1, ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 13.5, 22.3, 27.3-31.4, 35.6, 44.6, 59.0, 65.5.

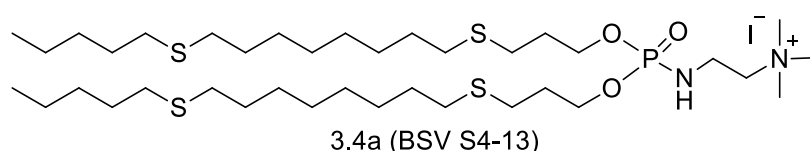


3.3b (1.1 g; Yield 66 %): starting materials: compound **2b** (1.5 g ; 2.3mmol); **Rf = 0.17** (DCM/MeOH 9/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.85 (t, J= 6.8 Hz, 6H); 1.22-1.25 (m, 12 H), 1.30-1.35 (m, 12H), 1.50-1.56 (m, 12H), 1.61-1.64 (m, 4H), 1.64-1.73 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 2.38 (t, J= 5.8 Hz, 2H), 2.44-2.50 (m, 16H), 2.89-2.97 (m, 2H), 3.30-3.35 (m, 1H), 3.95-3.98 (m, 4H) ; ³¹P{¹H} NMR (162 MHz; CDCl₃) δ= 10.1; ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 13.5, 22.0, 25.1, 28.1-31.7, 37.9, 44.4, 59.2, 65.6.

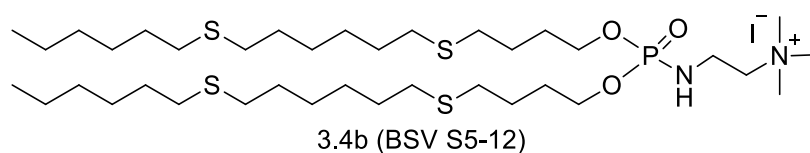


3.3c (1.5 g; Yield 65%): starting materials : compound **2c** (2.1 g ; 3.2 mmol); **Rf** = **0.15** (DCM/MeOH 9/1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ=0.86 (t, J= 7.1 Hz, 6H), 1.25-1.28 (m, 12H), 1.35-1.40 (m, 12H), 1.54-1.60 (m, 4H), 1.65-1.69 (m, 12H), 2.23 (s, 6H), 2.4 (t, J=5.8 Hz, 2H), 2.48-2.53 (m, 16H), 2.95-2.98 (m, 2H), 3.31-3.35 (m, 1H), 3.95-3.99 (m, 4H): **³¹P{¹H} NMR** (162 MHz; CDCl₃) δ= 10.2; **¹³C{¹H} NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 13.5, 22.1, 24.8, 28.0-38.4, 38.0, 44.5, 59.1, 65.7.

General synthesis of compound 4a-c: to a solution of compound **3.3** (1 equivalent) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added methyl iodide (4 equivalent) and the reaction was stirred overnight at rt. The solvent and the excess of methyl iodide were evaporated to give a yellow salt.

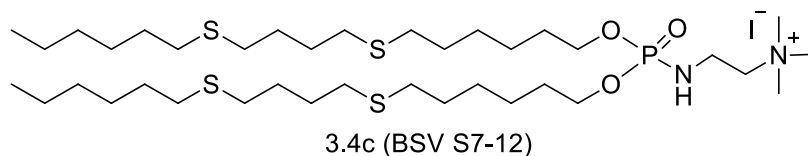


3.4a (0.6 g; Yield 98%): starting materials : compound **3a** (0.5 g; 0.67mmol); **Rf** = **0.05** (DCM /MeOH 9/1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.85 (t, J= 7.0 Hz, 6H), 1.24-1.37 (m, 24H), 1.54-1.58 (m, 12H), 1.92-1.96 (m, 4H), 2.49 (t, J= 6.8 Hz, 12H), 2.60 (t, J= 7.0 Hz, 4H), 3.44 (s, 9H), 3.57-3.61 (m, 2H), 3.56 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 4.09-4.14 (m, 4H), 4.51-4.57 (m, 1H); **³¹P{¹H} NMR** (CDCl₃, 162 MHz) δ= 8.9; **¹³C{¹H} NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ=13.5, 22.3, 27.3-31.4, 35.6, 54.4, 65.1-66.1 ; **Maldi TOF** (matrix: UTL HCCA): [M]⁺ calculated for C₃₇H₈₀N₂O₃PS₄ = 759.478; observed [M]⁺=759.559.



3.4b (0.6 g; Yield 97%): starting materials: compound **3b** (0.5 g; 0.67 mmol); **Rf** = **0.07** (DCM/MeOH 9/1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.84 (t, J=68 Hz, 6H), 1.21-1.35 (m, 24H), 1.48-1.53 (m, 12H), 1.60-1.64 (m, 4H), 1.72-1.75 (m, 4H), 2.43-2.52, (m, 16H), 3.42 (s, 9H), 3.50-3.52 (m, 2H), 3.80 (t, J= 5.6 Hz, 2H), 3.95-4.00 (m, 4H), 4.47-4.53 (m, 1H); **³¹P{¹H} NMR** (162 MHz ; CDCl₃) δ= 8.9; **¹³C{¹H} NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ= 13.5, 22.0, 25.1, 28.0-31.7, 35.4,

54.4, 65.2-66.2; **Maldi TOF** (matrix: UTL HCCA): $[M]^+$ calculated for $C_{37}H_{80}N_2O_3PS_4$ = 759.478; observed $[M]^+$ = 759.549.



3.4c (1.1 g; Yield 95%): starting materials : compound **3c** (1 g; 1.3mmol); **Rf**= **0.05** (DCM / MeOH 9/1): **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.2-1.4 (m, 24H), 1.55-1.60 (m, 12H), 1.67-1.70 (m, 12H), 2.48-2.52 (m, 16H), 3.46 (s, 9H), 3.58-3.59 (m, 2H), 3.88 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.96-4.01 (m, 4H), 4.40-4.45 (m, H); **$^{31}P\{^1H\}$ NMR** (162 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.8; **$^{13}C\{^1H\}$ NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 13.5, 22.0, 24.7, 27.9-31.6, 35.7, 54.4, 66.4-66.5; **Maldi TOF** (matrix: UTL HCCA): $[M]^+$ calculated for $C_{37}H_{80}N_2O_3PS_4$ = 759.478; observed $[M]^+$ = 759.569.

**Chapitre 4 : Synthèse d'amphiphiles
cationiques comportant des chaînes
lipidiques ramifiées. Études des
propriétés physico-chimiques et
application pour la transfection.**

I. Introduction

Nous avons, au cours des deux précédents chapitres, montré la pertinence d'explorer la conception de nouvelles chaînes lipidiques pour construire des amphiphiles cationiques utilisés comme agent de transfection et montré leur efficacité *in vitro*. En effet, l'incorporation d'une ou de deux fonctions thioéthers dans les chaînes lipidiques permet, par exemple, de transformer un amphiphile cationique quasiment inefficace pour la transfection (**BSV 101** : chaînes lipidiques C18 :0) en un composé efficace. Cette amélioration des performances en transfection a été corrélée à des modifications des propriétés physico-chimiques révélées par l'étude de l'anisotropie de fluorescence, des isothermes de compression et l'ellipsométrie. Ces modifications de structure des amphiphiles cationiques n'impactent pas le type d'assemblage supramoléculaire formé. En effet, dans les conditions de préparation des échantillons, nous avons observé par RMN ³¹P que les amphiphiles cationiques comportant des fonctions thioéthers adoptent des assemblages lamellaires comme cela est également observé lorsque de mêmes amphiphiles cationiques comportent des chaînes mono-insaturées (chaînes oléyles, C18 :1 ; **BSV 36**). Or, comme cela sera détaillé dans cette introduction, le type d'assemblage supramoléculaire formé par des amphiphiles cationiques est un paramètre qui peut grandement influencer l'efficacité de transfection.

Dans ce chapitre nous avons choisi d'apporter des modifications de structure au niveau de la partie lipidique d'amphiphiles cationiques avec pour objectif de développer des composés dont la structure moléculaire pourrait contrôler, ou tout au moins favoriser, la formation d'assemblages supramoléculaires non-lamellaires. Au préalable, l'étude bibliographique qui suit présente de façon non-exhaustive les principales stratégies qui permettent d'influencer le type d'assemblage supramoléculaire et présente également les travaux antérieurs de l'équipe dans ce domaine. Nous présenterons alors les objectifs détaillés de ce chapitre avant de montrer les résultats de synthèse, de caractérisation physico-chimique et de transfection.

II. Étude bibliographique

L'étude de la nature des assemblages supramoléculaires des amphiphiles cationiques utilisés pour de la vectorisation d'acides nucléiques a longtemps intéressée la communauté

scientifique, d'autant plus que des études précédentes ont montré que l'efficacité de transfection de ces molécules peut dépendre de la nature de l'auto-assemblage formé ¹⁶⁷

Ainsi il existe dans la littérature plusieurs exemples montrant que les lipides cationiques formant des phases hexagonales inverse ont des propriétés de transfection supérieures aux amphiphiles cationiques qui s'auto-assemblent en phase lamellaire ^{168,169}.

En 1998 par exemple Ilya Koltover ¹⁷⁰ et *al* ont montré que les lipoplexes formant des phases hexagonales inverses (H_{II}) et les lipoplexes formant des phases lamellaires (L_{α}) interagissent différemment avec la membrane cellulaire. En effet les complexes H_{II} fusionnent rapidement avec la membrane cellulaire entraînant la déstabilisation du lipoplexe et la libération de l'ADN. Cependant la fusion entre les complexes L_{α} et les lipides anioniques de la membrane cellulaire ne peut être observée qu'après plusieurs heures. Ainsi la présence d'une phase hexagonale inverse améliore le caractère fusogène des lipoplexes facilitant très probablement l'étape de l'échappement endosomale considérée comme l'un des obstacles lors de la transfection.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la nature de l'auto-assemblage adoptée par les composés amphiphiles tel que la température ^{171,172} ou la concentration ¹⁷³. Par ailleurs, deux stratégies peuvent être envisagées pour favoriser l'obtention de phases hexagonales. L'une se situe au niveau de l'étape de formulation et consiste à associer à un amphiphile cationique un autre amphiphile aussi appelé co-lipide qui favorise l'obtention d'assemblages supramoléculaires non-lamellaires. La seconde est une approche moléculaire qui vise à modifier la structure des amphiphiles cationiques pour qu'ils puissent s'auto-organiser en phase hexagonale.

- Approche supramoléculaire :

La stratégie la plus utilisée pour favoriser la formation d'une phase hexagonale inverse est l'ajout du co-lipide 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (**DOPE**) (Figure 118) dans

¹⁶⁷ I. S. Zuhom, U. Bakowsky, E. Polushkin, W. H. Visser, M. C. Stuart, J. B. Engberts, D. Hoekstra, *Mol Ther.*, **2005**, *11*, 801-810.

¹⁶⁸ J. Jouhet, *Front. Plant Sci.*, **2013**, *4*, 494.

¹⁶⁹ A. Ortiz, J. A. Killian, A. J. Verkleij, J. Wilschut, *Biophys. J.*, **1999**, *77*, 2003-2014.

¹⁷⁰ I. Koltover, T. Salditt, J. O. Radler, C. R. Safinya, *Science*, **1998**, *281*, 78-81.

¹⁷¹ D. P. Siegel, W. J. Green, Y. Talmon, *Biophys. J.*, **1994**, *66*, 402-414.

¹⁷² R. M. Eppard, *Chem. Phys. Lipids*, **1985**, *36*, 387-393.

¹⁷³ R. M. Eppard, C. T. Lemay, *Chem. Phys. Lipids*, **1993**, *66*, 181-187.

la formulation ^{174,175}. En effet ce co-lipide est capable d'induire une déstabilisation de la membrane endosomale lorsque l'endosome s'acidifie, ce qui facilite la libération de l'acide nucléique hors de l'endosome. Ce phénomène est lié au changement d'une phase lamellaire à une phase hexagonale inverse initiée par la DOPE.

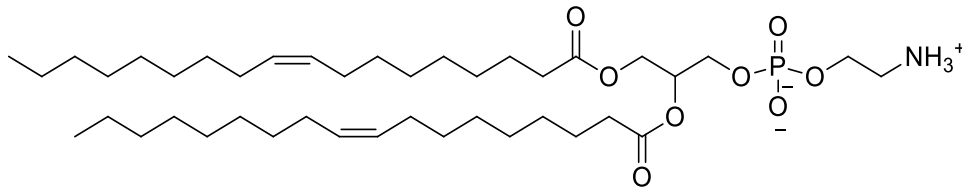


Figure 118 : Structure du co-lipide DOPE

Dans un article publié en 2012, Muller et *al* ont étudié l'effet de l'ajout de la DOPE sur les propriétés d'auto-assemblage supramoléculaire du bromure de bis (11-ferrocenylundecyl) diméthylammonium (BFDMA) (Figure 119) par diffusion de rayons X à petits angles (SAXS) ¹⁷⁶. Les résultats obtenus montrent qu'en absence de co-lipide les lipoplexes formés à base de BFDMA s'auto-assemblent en phase lamellaire. Alors que, l'ajout du DOPE dans la formulation entraîne la formation de lipoplexes qui s'auto-assemblent en phase hexagonale inverse.

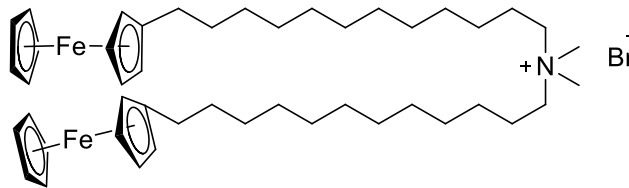


Figure 119: Structure de BFDMA.

Cependant, l'utilisation de co-lipides dans les formulations peut présenter quelques inconvénients liés généralement à la nature neutre de ces molécules qui peut perturber les interactions avec les molécules d'acides nucléiques et par conséquent la stabilité des lipoplexes. D'autre part, l'effet de l'ajout d'un co-lipide sur l'efficacité de transfection est souvent dose dépendant. Il est donc difficile d'estimer les proportions de co-lipide nécessaire pour obtenir une efficacité de transfection maximale.

- Approche moléculaire :

¹⁷⁴ D. Simberg, D. Danino, Y. Talmon, A. Minsky, M. E. Ferrari, C. J. Wheeler, Y. Barenholz, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 47453-47459

¹⁷⁵ I. M. Hafez, N. Maurer, P. R. Cullis, *Gene Ther.*, **2001**, 8, 1188-1196.

¹⁷⁶ J. P. E. Muller, B. S. Aytar, Y. Kondo, D. M. Lynn, N. L. Abbotta, *Soft Matter*. **2012**, 8, 2608–2619.

La deuxième stratégie consiste à modifier directement la structure de l'amphiphile cationique afin de favoriser l'auto-assemblage en phase hexagonale. Cette approche a été théorisée par Israelachvili et al.¹⁷⁷ qui propose que les caractéristiques géométriques des molécules amphiphiles sont à l'origine de la formation de différents types d'assemblages supramoléculaires. En effet, l'amphiphile est l'unité constitutive de la monocouche ou de la bicouche lipidique, l'empilement de ces molécules dépend de deux paramètres importants :

- Le volume occupé par la partie hydrophobe (V_c) : celui-ci dépend du nombre et de la longueur des chaînes alkyles ainsi que la présence de ramification.
- Le volume occupé par la partie polaire noté a

En prenant en compte ces variables, il est possible de définir un paramètre d'empilement (P) dont la valeur est indicative de la nature de l'assemblage supramoléculaire susceptible d'être formée.

$$P = \frac{V_c}{a \times l_c}$$

Équation 1 : Expression du paramètre d'empilement P où V_c est le volume occupé par la partie hydrophobe, a est le volume occupé par la tête polaire et l_c la longueur de la molécule

Ainsi, une molécule amphiphile, dont la partie polaire occupe un volume plus important que la queue hydrophobe ($P < 1$), peut être modélisée par un cône inversé. L'empilement de ces cônes entraîne la formation d'une phase hexagonale dite directe où les amphiphiles sont empilés sous forme de cylindres de longueur infinie avec une localisation de la partie hydrophile volumineuse orientée vers l'extérieur de ces cylindres et la partie lipidique est orientée vers le centre des cylindres. La disposition de ces cylindres entre eux génère une structure hexagonale (*Figure 120-A*).

Si le rapport V_c/l_c est proche de a (donc P proche de 1) alors la molécule peut s'apparenter à un cylindre. Ceci aboutit à la formation d'auto-assemblages sous forme de bicouches ou phase multi-lamellaire (*Figure 120-B*).

Finalement, les molécules amphiphiles dont la partie hydrophobe (V_c/l_c) occupe un volume plus important que la tête polaire (a) adoptent une géométrie en cône inversé. Ceci entraîne

¹⁷⁷ J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **1976**, 72, 1525-1568

la formation d'auto-assemblage en phase hexagonale inverse. Il s'agit d'auto-assemblages formant des cylindres infinis. Ces cylindres sont alors disposés entre eux en structures hexagonales. Au sein de chaque cylindre, les chaînes hydrophobes sont orientées vers l'extérieur tandis que les têtes polaires sont orientées vers l'intérieur des cylindres qui peuvent aussi comporter des molécules d'eau (Figure 120-C).

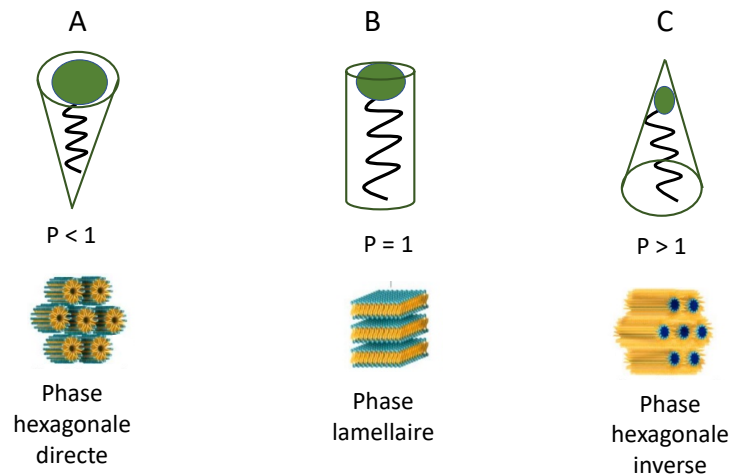


Figure 120 : Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire des molécules amphiphiles en fonction du paramètre d'empilement.

Il est aussi important de noter que l'ajout de l'acide nucléiques (ADN ou ARN) dans les formulations semble ne pas affecter la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire de ces molécules comme l'a démontré Koynova et *al* en 2009¹⁷⁸. Ainsi plusieurs équipes se sont basées sur les travaux d'Israelachvili pour synthétiser des amphiphiles cationiques qui s'auto-assemblent en phase non-lamellaire. Une stratégie consiste à augmenter le volume occupé par les chaînes hydrophobes sans augmenter la longueur de chaîne (l_c). Pour cela, il est possible d'utiliser des chaînes lipidiques ramifiées. Deux stratégies ont été alors adoptées : i) l'utilisation de chaînes lipidiques naturelles ramifiées et ii) la construction de chaînes ramifiées.

- Utilisation de chaînes naturelles ramifiées.

Wang et al ont décrit la synthèse de nouveaux amphiphiles cationiques bicaténaires dissymétrique contenant une chaîne ramifiée de type phytanyle. Les calculs du paramètre

¹⁷⁸ R. Koynova, B. Tenchov, *Soft Matter*, **2009**, 5, 3187-3200.

d'empilement P ont montré une valeur inférieure à 0.5 favorable à la formation d'une phase non-lamellaire. D'autre part ces molécules se caractérisent par une efficacité de transfection supérieure à des analogues formés par des chaînes linéaires saturées qui se caractérisent par la formation de phases lamellaires ¹⁷⁹.

Dans ce même contexte notre équipe a synthétisé le composé **BSV 18** formé de deux chaînes phytanyles (*Figure 121*) ¹⁸⁰. Ce composé s'est révélé être plus efficace pour la transfection *in vivo* que le composé polyinsaturé **BSV 4**. Des études de RMN ³¹P en milieu organisé ont démontré que le lipide cationiques **BSV 18** s'auto-assemble en phase hexagonale (probablement hexagonale inverse due au volume important de la chaîne hydrophobe) contrairement au **BSV 4** qui forme quant à lui une phase lamellaire. Cependant, la formulation en solution liposomale de ce composé s'est avérée très ardue. En effet, le volume important de la partie hydrophobe de la molécule augmente considérablement son temps d'hydratation (environ 9 jours contrairement à une nuit d'hydratation pour le composé **BSV 4**).

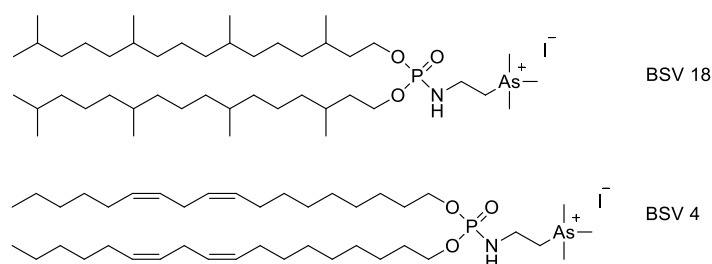


Figure 121: Structure des deux phosphoramides **BSV 4** et **BSV 18**

➤ Construction de chaînes lipidiques ramifiées

La seconde approche, développée lors de la thèse de Damien Afonso a été de construire de nouvelles chaînes lipidiques ramifiées. L'objectif étant d'utiliser l'insaturation présente dans les chaînes oléyles du composé **BSV 36** pour y introduire une ramification tout en évitant de modifier le caractère apolaire de la partie lipidique. La méthode adoptée consiste donc à utiliser une réaction de type thiol-ène photo-activée entre le composé **BSV 36** comportant des chaînes oléyles (mono-insaturée) et différents types de thiol commerciaux (*Figure 122*). Une fonction thioéther, apolaire, est alors formée pour conduire à des chaînes ramifiées.

¹⁷⁹ H. Wang, S. D. Wettig, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, 637–642.

¹⁸⁰ M. F. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *Biomaterials*, **2012**, 33, 6240-6253.

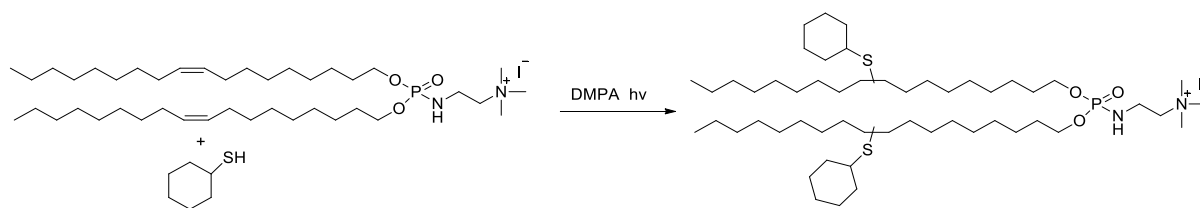


Figure 122: Synthèse de lipides cationiques à chaînes ramifiées selon les travaux de D.

Afonso

Des expériences de RMN ^{31}P et/ou ^2H en milieu organisé ont montré que le composé de départ **BSV 36** s'organisait en phase lamellaire tandis que tous les composés ramifiés en milieu de chaîne adoptaient une phase hexagonale inverse. De plus ces composés amphiphiles ont montré des efficacités de transfection jusqu'à 10 fois meilleures que pour le composé **BSV 36**.

➤ Objectif du chapitre

Comme nous l'avons décrit dans cette partie bibliographique le contrôle du type d'assemblage supramoléculaire d'amphiphiles cationiques est un paramètre susceptible d'impacter le processus de transfection. Nous avons donc souhaité explorer de nouvelles structures d'amphiphiles cationiques qui pourraient avoir tendance à s'auto-organiser en phase non-lamellaire. Parallèlement à cet objectif, nous souhaitons accéder à de telles structures par des synthèses simples et modulables qui puissent en 3 étapes produire les amphiphiles cationiques et cela, idéalement, à l'échelle du gramme. Ces deux derniers paramètres nous semblent importants car si nous avons accès à des amphiphiles performant pour la transfection *in vitro*, alors les développements pour l'*in vivo* seraient facilités (production en quantité suffisante, optimisation de la structure grâce à des schémas de synthèse modulables).

Pour atteindre le premier objectif qui est de produire des amphiphiles cationiques susceptibles de s'auto-organiser en phase non-lamellaire, nous avons eu l'idée d'utiliser des alcools lipidiques ramifiés commerciaux ce qui permettrait d'accéder aux phosphoramides finaux en trois étapes de synthèse. De façon intéressante, comme le montre la Figure 123, plusieurs alcools ramifiés sont commercialement disponibles ce qui permet de moduler la balance hydrophobe/hydrophile des amphiphiles envisagées. A noter que ces composés de départ sont relativement bon marché (90 euros / 100 mL). D'autre part, ce type d'alcool

lipidiques est présent dans certaines huiles essentielles extraites des racines de *Adiantum Flabellulatum*¹⁸¹. Ces alcools peuvent aussi être synthétisés à grande échelle en suivant divers processus expérimentaux^{182,183}. Il est aussi important de noter que les alcools commerciaux sont vendus sous forme de mélange racémique ainsi les amphiphiles cationiques obtenus sont sous forme de mélanges diastéréoisomériques.

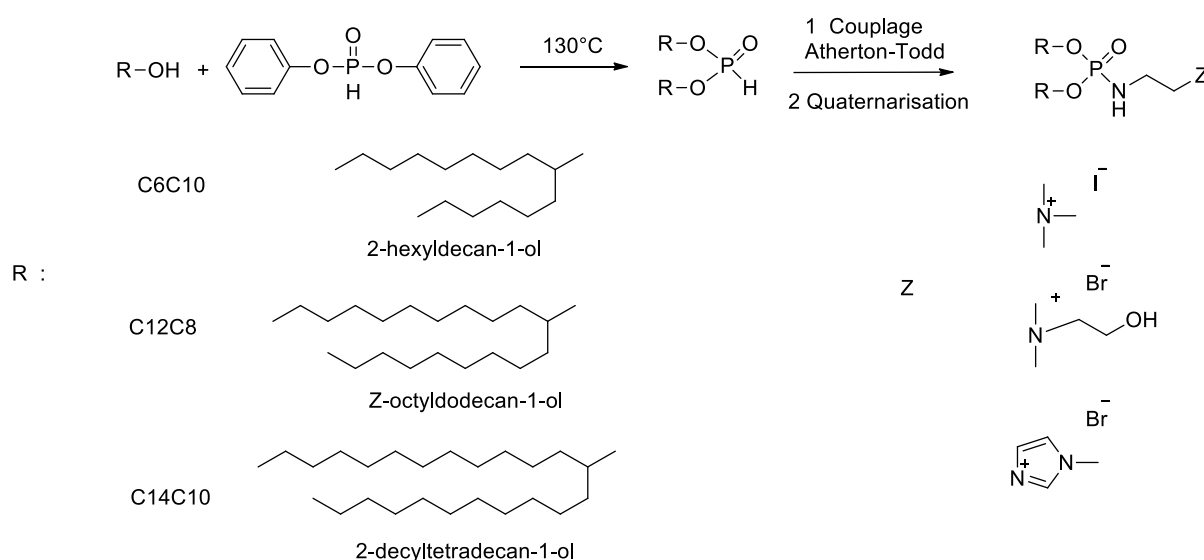


Figure 123 : Plan de synthèse des nouveaux amphiphiles cationiques à chaînes ramifiées et nature de la tête polaire envisagée

De plus, afin d'éviter les difficultés de formulation des lipides cationiques contenant des chaînes ramifiées, et de réduire la toxicité souvent liée à la tête triméthylammonium nous avons envisagé de modifier la nature de la tête polaire. En effet la petite taille de la tête triméthylammonium entraîne une importante densité de charge par unité de volume. Ceci se manifeste par de fortes interactions avec les lipides anioniques formant la membrane cellulaire induisant la déstabilisation de la membrane plasmidique et par conséquent la mort cellulaire.

¹⁸¹ W. Y. Kang, Z. Q. Ji, J. M. Wang, *Chem Nat Compd*, **2009**, 45, 575-577.

¹⁸² T. Matsu-ura, S. Sakaguchi, Y. Obora, Y. Ishii, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 8306-8308.

¹⁸³ Y. Zhang, Y. Li, Y. Song, J. Li, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 105952–105960.

Notre équipe a montré précédemment que l'utilisation d'une tête polaire diméthyl-éthoxy ammonium¹⁸⁴ ou la tête méthylimadazolium¹⁸⁵ ont permis d'obtenir de très bons résultats de transfection et de réduire la toxicité des phosphoramides. D'autre part ces deux têtes présentent l'avantage d'être facile d'accès et peu coûteuses.

Ainsi au cours de ce chapitre nous allons procéder en deux temps : En premier lieu nous allons décrire la synthèse d'une série de 3 composés amphiphiles caractérisés par le même domaine hydrophobe ramifié à partir de l'alcool 2-hexyldecan-1-ol et une variation de la tête polaire. En deuxième partie nous allons présenter la synthèse d'une deuxième série de 2 composés amphiphiles comportant tous une tête polaire N-méthylimidazolium mais en variant la longueur de la chaîne hydrophobe ramifiée.

III. Synthèse et étude d'amphiphiles cationiques ramifiées à têtes polaires différentes

Comme indiqué précédemment l'objectif de la première partie de ce chapitre est la synthèse de nouveaux phosphoramides cationiques à partir de l'alcool ramifié 2-hexyldecan-1-ol. Pour atteindre cet objectif 3 étapes de synthèse sont nécessaires :

- La préparation du phosphite comportant deux chaînes lipidiques ramifiées
- La préparation du phosphoramide par une réaction d'Atherton Todd
- Une réaction de quaternarisation permettant d'introduire la tête polaire cationique.

1. Synthèse du phosphite

La préparation du phosphite se déroule comme détaillée lors des deux chapitres précédents. Le 2-hexyldecan-1-ol et le diphenyle phosphite sont placés dans un montage adapté pour le Kugelrohr (*Figure 124*). Le mélange est chauffé à 130°C pendant 3h sous pression réduite. Le phénol formé au cours de cette réaction est éliminé au fur et à mesure par sublimation.

¹⁸⁴ M. Berchel, T. Le Gall, J. P. Haelters, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Mol. Pharmaceutics*, **2015**, 12, 1902-1910.

¹⁸⁵ M. Mével, G. Breuzard, J. J. Yaouanc, J.C. Clément, P. Lehn, C. Pichon, P. A. Jaffrès, P. Midoux, *Chem. Bio. Chem* **2008**, 9, 1462 – 1471.

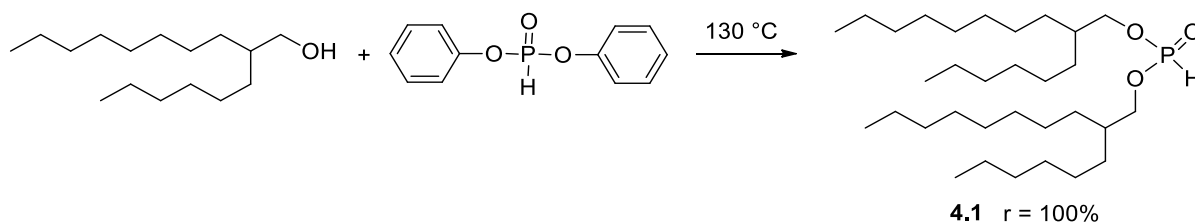


Figure 124 : Synthèse de phosphite par distillation au Kugelrohr

La présence d'un seul pic à 8,7 ppm sur le spectre RMN ^{31}P et l'apparition du doublet caractéristique de la liaisons P-H confirme la présence du produit comme l'indique les spectres RMN ^1H et ^{31}P présentés sur la *Figure 125*.

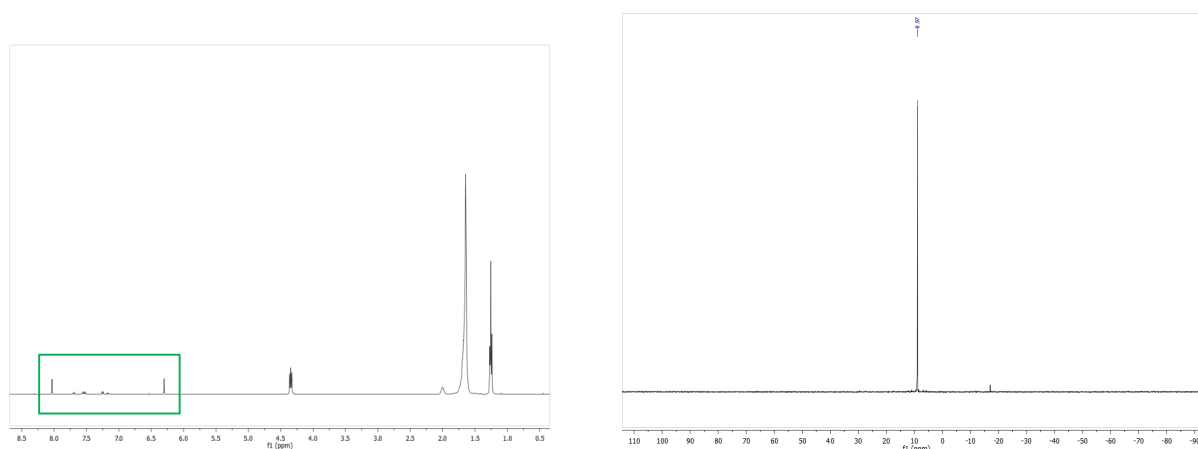


Figure 125: Spectres RMN ^1H et ^{31}P du phosphite synthétisé

Cette méthode permet d'obtenir le phosphite désiré quantitativement et sans aucune étape de purification.

2. Couplage Atherton-Todd

La deuxième étape de synthèse consiste à réaliser un couplage de type Atherton-Todd permettant d'accéder au phosphoramide. Comme les lipides cationiques synthétisés au cours de ce chapitre diffèrent par la nature de la partie polaire, les conditions de réaction nécessaires pour réaliser ce couplage sont différentes.

Afin de synthétiser les phosphoramides ayant une tête polaire de type triméthyl-ammonium et diméthyléthoxy-ammonium, le phosphite (**4.1**) obtenu au cours de l'étape précédente est mis en présence du bromure de trichlorométhane (BrCCl_3), de *N,N* diisopropyléthylamine (DIPEA) et de la *N,N* diméthyléthylènediamine (*Figure 126*).

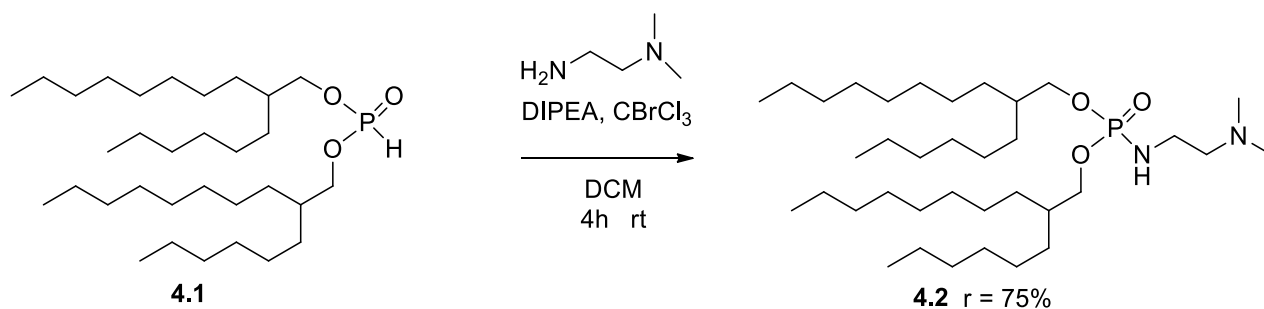


Figure 126 : Synthèse de phosphoramide par couplage Atherton -Todd

L'avancement de la réaction peut être suivi par RMN de phosphore où il est possible d'observer la disparition du pic à 8,7 ppm correspondant au phosphite et l'apparition d'un pic à 9.8 ppm correspondant au phosphoramide. D'autre part sur le spectre RMN ^1H il est possible d'observer la disparition du doublet caractéristique du phosphite et l'apparition d'un singlet correspondant au groupement diméthylamine (*Figure 127*). Le phosphoramide pur est obtenu après chromatographie avec un rendement de 75%.

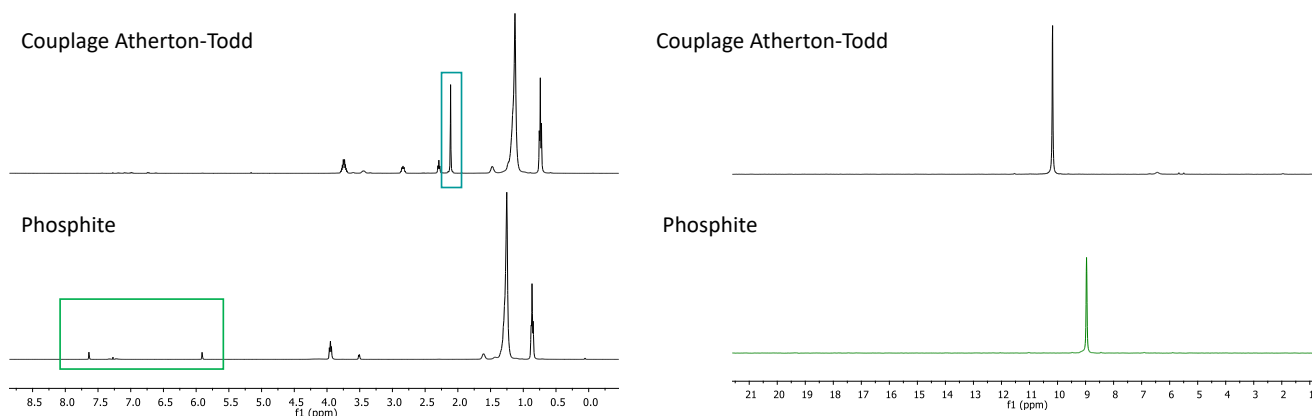


Figure 127: Évolution du spectre RMN après le couplage Atherton-Todd

Afin d'obtenir le lipide cationique contenant une tête méthylimidazolium, la réaction d'Atherton Todd met en jeu dans ce cas le phosphite (**4.1**) avec le bromure de bromoéthyl-ammonium en présence de DIPEA et du BrCCl_3 (*Figure 128*). Comme précédemment la formation du produit est confirmée par la présence d'un seul pic à 9.1 ppm sur le spectre RMN ^{31}P .

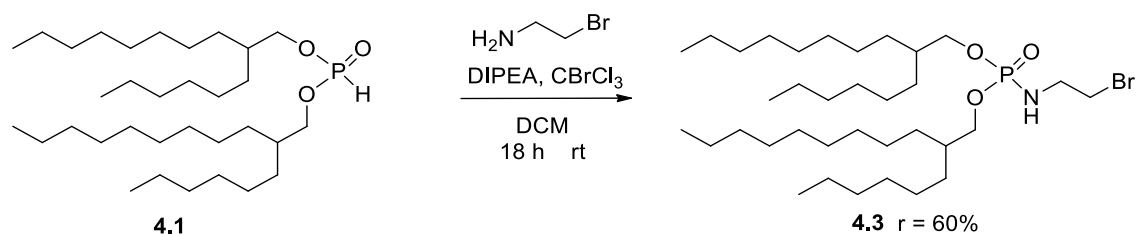


Figure 128 : Couplage Atherton-Todd

Le produit est obtenu avec un rendement de 60% après une chromatographie sur gel de silice.

3. Quaternarisation des phosphoramides

La dernière étape de synthèse est une réaction de quaternarisation permettant d'obtenir une tête polaire cationique assurant l'interaction entre le phosphoramidate et les molécules d'ADN. Trois méthodes sont utilisées afin de synthétiser les nouveaux lipides cationiques formés par les différentes têtes polaires.

- Formation de la tête triméthylammonium

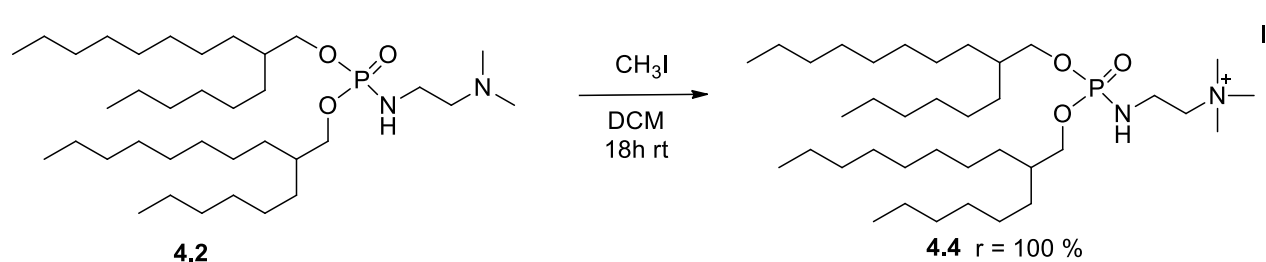


Figure 129 : Formation du phosphoramidate **4.4 (BSV 161)** contenant une tête triméthylammonium

Un excès d'iodométhane est ajouté à une solution du phosphoramidate (**4.2**) obtenu lors de l'étape précédente (*Figure 129*). La formation du produit peut être suivie par RMN ^{31}P avec la disparition du pic à 9.8 ppm et l'apparition d'un pic à 8.9 ppm. Le solvant ainsi que l'excès d'iodométhane sont finalement évaporés et le produit final est obtenu avec un rendement quantitatif et sans aucune étape de purification supplémentaire.

- Formation de la tête diméthyl-éthoxy-ammonium

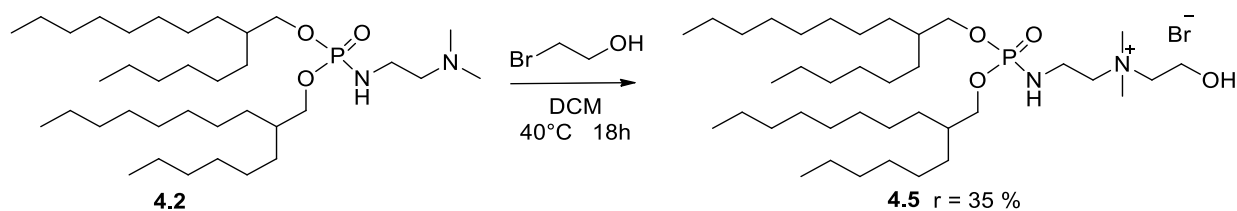


Figure 130 : Formation du phosphoramide **4.5 (BSV 162)** contenant une tête de type diméthyléthoxyammonium

Pour introduire la tête diméthyléthoxy ammonium le phosphoramide (**4.2**) obtenu lors de l'étape de couplage Atherton-Todd est mélangé avec un excès de bromoéthanol dans le dichlorométhane. Le mélange est chauffé à 40°C pendant 18h (*Figure 130*). Une chromatographie sur gel de silice permet d'obtenir le produit final avec un rendement de 35%.

- Formation de la tête méthylimidazolium

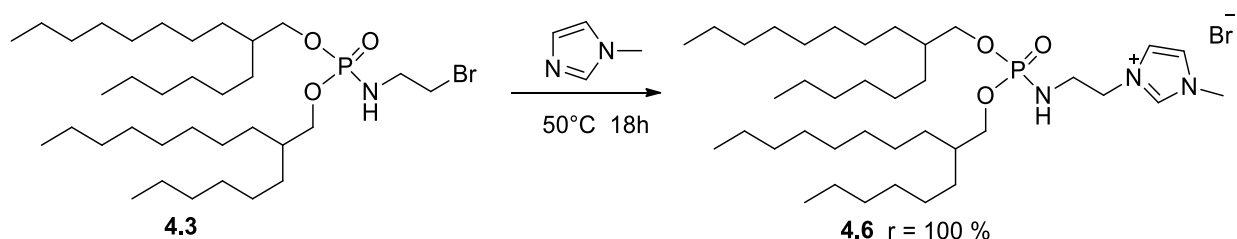


Figure 131 : Synthèse du phosphoramide contenant une tête méthylimidazolium **4.6 (BSV 163)**

Le dernier produit synthétisé pour cette série est un phosphoramide contenant une tête polaire de type méthylimidazolium. La réaction se déroule comme suit : le phosphoramide bromé (**4.3**) obtenu précédemment est mélangé avec un large excès de méthylimidazole (10 équivalents) et le mélange est chauffé pendant la nuit à 50°C (*Figure 131*). Le produit final est obtenu quantitativement après distillation au Kugelrohr de l'excès de méthylimidazole.

Composé	Masse finale obtenu	Rendement globale
4.4 (BSV 161)	0.9 g	75 %

4.5 (BSV 162)	0.8 g	27 %
4.6 (BSV 163)	2.1 g	60 %

Tableau 22: Masse et rendements globaux de la synthèse des trois nouveaux phosphoramides

La synthèse de ces trois nouveaux lipides cationiques est relativement simple et nécessite peu d'étapes de purification. D'autre part ces nouveaux produits sont obtenus à l'échelle du gramme et avec des rendements globaux satisfaisants (*Tableau 22*). Ceci peut être considéré comme un atout majeur pour la production de systèmes de vectorisation pour la thérapie génique.

IV. Étude des propriétés physico chimiques des nouveaux lipides cationiques

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

La concentration d'agrégation critique des 3 nouveaux lipides cationiques est déterminée en utilisant le rouge du Nil comme sonde fluorescente. Ainsi une vingtaine d'échantillons ayant une concentration entre 10^{-7} et 10^{-4} mol/L sont préparés en suivant la méthode d'hydratation du film lipidique. La concentration finale de la sonde fluorescente dans chaque formulation est maintenue constante et égale à 2×10^{-7} mol/L.

La valeur de la CAC est déterminée en traçant l'évolution de $\text{Log}(C)$ en fonction de l'intensité maximale de la fluorescence (I_{max}).

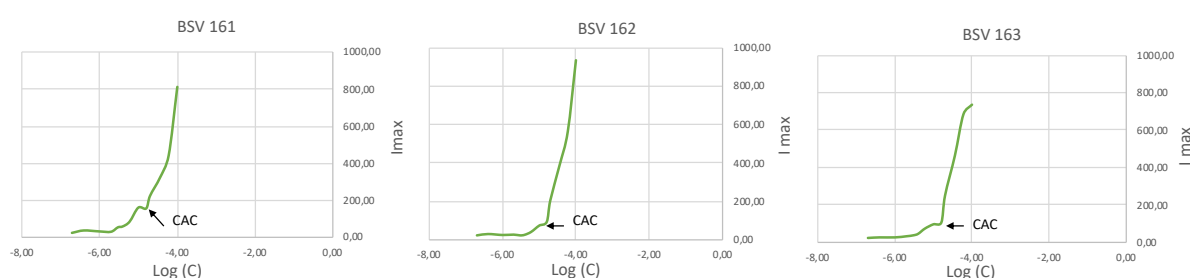


Figure 132: Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

La concentration d'agrégation critique (CAC) correspond au début de l'augmentation de la fluorescence, comme l'illustre la *Figure 132*.

Pour les 3 nouveaux lipides cationiques contenant des chaînes lipidique ramifiées ces valeurs sont de l'ordre de 1×10^{-5} mol/L. Ceci indique que la nature de la tête polaire n'a pas, dans ce cas, d'influence sur la valeur de CAC de ces molécules. D'autre part, ce résultat reste du même

ordre de la valeur du CAC obtenu avec le composé **BSV 36** formé par deux chaînes oléyles et une tête triméthylammonium (1.5×10^{-5} mol/L).

2. Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par anisotropie de fluorescence
Afin d'étudier la fluidité des assemblages moléculaire formés par les trois nouveaux phosphoramides synthétisées, nous avons préparé une solution liposomale de chaque molécule contenant la sonde DPH. La méthode consiste à mesurer l'anisotropie de fluorescence de la sonde en fonction de la température. Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 133*.

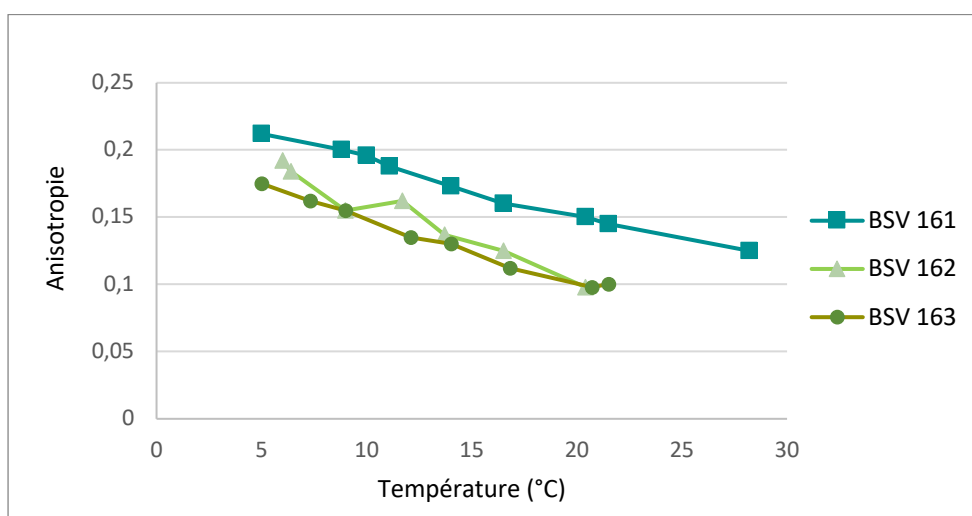


Figure 133: Mesure de l'anisotropie de DPH en fonction de la température

Les résultats obtenus montrent un comportement similaire des trois composés testés. La nature de la tête polaire de ces trois molécules n'a pas alors d'impact, dans ce cas, sur leur fluidité.

D'autre part, les valeurs d'anisotropie affichent une légère augmentation lorsque la température diminue. Cependant l'absence d'une variation nette indique que les mesures sont réalisées à des températures supérieures à la température de transition de phase (T_m) de ces molécules. Ceci indique que l'utilisation de chaîne ramifiées permet d'augmenter la fluidité des assemblages formés par ces nouveaux amphiphiles cationiques. Ce comportement est similaire à celui observé avec le composé **BSV 36** contenant des chaînes oléyles insaturées. Contrairement le composé **BSV 101** formé par des chaînes saturées (stéaryles) présente une transition de phase à 54°C qui se traduit par une forte variation de l'intensité de l'anisotropie.

3. Isothermes de compression

La technique d'isothermes de compression permet d'étudier le comportement des molécules à l'interface air/eau. Plusieurs informations peuvent être déduites à partir de cette technique.

- L'aire moléculaire occupée par les molécules à faible pression de surface appelé aire moléculaire au lift-off,
- L'aire moléculaire minimal occupé par les molécules à leur point de compressibilité maximal noté aire moléculaire au collapse,
- La pression de surface au collapse indiquant la pression qui entraîne la destruction de la monocouche formée à l'interface air/eau.

Pour réaliser ces mesures un volume de 25 μL d'une solution de lipide cationique à 1mg/mL est déposé sur une cuve de Langmuir remplie de 400 mL d'eau distillée. Après évaporation du solvant les molécules sont comprimées à l'aide de barrières mobiles réglées à une vitesse de 5 cm^2/min . L'évolution de l'aire moléculaire en fonction de la pression de surface est représentée sur la *Figure 134*. Il est important de noter que chaque mesure est réalisée deux ou trois fois afin de s'assurer la reproductibilité des résultats.

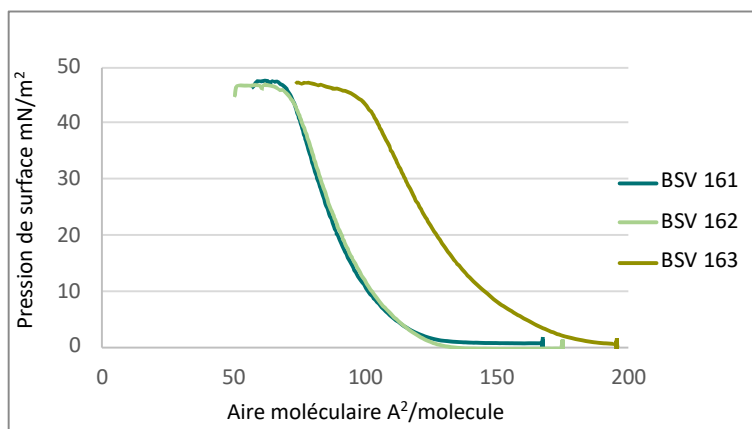


Figure 134: Isothermes de compressions des trois phosphoramides synthétisés

Jusqu'à l'apparition du collapse, les trois isothermes montrent une augmentation régulière de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire. L'absence de point d'inflexion ou d'épaule indique qu'aucun changement d'état n'est observé et que toutes les molécules se trouvent à l'état liquide expansé (LE).

Les isothermes de compression des composés **BSV 161** et **BSV 162** formés par un cation triméthylammonium et diméthyléthoxy -ammonium respectivement sont superposables. Cependant, le composé **BSV 163** contenant une tête méthylimidazolium bien qu'il atteigne le

collapse à la même pression (46 mN/m), les aires moléculaires au lift-off et au collapse sont nettement supérieures à celles obtenues avec les deux autres analogues (**BSV 161** et **BSV 162**). Cette différence peut être expliquée par la taille importante du motif méthylimidazolium et la délocalisation de la charge qui facilite l'hydratation de la tête polaire et entraîne ainsi l'augmentation de l'aire moléculaire occupée par cette molécule.

Les principales informations tirées des isothermes de compressions sont présentées dans le tableau suivant.

- Au lift-off

	Aire moléculaire au lift off $A_0 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$	Aire moléculaire au collapse $\text{\AA}^2/\text{molécule}$	Pression de surface au collapse mN/m
4.4 (BSV 161)	125 ± 2	70 ± 2	46 ± 0.25
4.5 (BSV 162)	124 ± 2	72 ± 2	46 ± 0.25
4.6 (BSV 163)	165 ± 2	100 ± 2	46 ± 0.25
BSV 101	80 ± 2	45 ± 2	58 ± 0.25
BSV 36	160 ± 2	75 ± 2	47 ± 0.25

A faible **Tableau 23:** Principales valeurs extraites des isothermes de compression
pression de

surface les nouveaux phosphoramides occupent des aires moléculaires comprises entre 124 et $165 \text{ \AA}^2 / \text{molécule}$. Le composé **BSV 101** formé de deux chaînes linéaires saturées affiche quant à lui une aire moléculaire au lift-off nettement inférieure ($80 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Deux raisons peuvent expliquer cette différence : d'une part la présence d'une ramification dans la chaîne alkyle des nouveaux composés qui multiplie les interactions entre les chaînes hydrophobes du fait d'une surface moléculaire plus importante. Ces amphiphiles peuvent être apparentés à des amphiphiles comportant 4 chaînes lipidiques. D'autre part, la longueur des chaînes alkyles formant le domaine hydrophobe de ces molécules. En effet les nouveaux phosphoramides sont synthétisés à partir d'un alcool ramifié comportant deux chaînes formées de 6 et 10 atomes de carbones, le composé **BSV 101** est synthétisé quant à lui à partir de chaînes linéaires contenant 18 atomes de carbone. Or plusieurs études ont

montré que la longueur de la chaîne grasse favorise le phénomène d'agrégation des molécules amphiphiles^{186, 187}.

- Au collapse

La pression de surface au collapse des trois nouveaux phosphoramides est égale à 46mN/m. Puisque les valeurs sont identiques, cela suggère que c'est la nature de la chaîne hydrophobe qui gouverne le comportement de la chaîne face à la compression ou que tout au moins, les différentes structures des cations n'entraînent pas de modification de la pression au collapse. Il est entre autres important de noter que l'effet de la ramification sur les valeurs de pression de surface au collapse est semblable à celui observé en utilisant des chaînes comportant une insaturation. En effet, la pression au collapse du composé **BSV 36** formé par des chaînes oléyles est égale à 47mN/m. Ainsi, la présence de ramification ou d'insaturation empêche la formation d'une monocouche compacte entraînant ainsi la diminution des valeurs des pressions de surface au collapse (comparaison avec **BSV 101**).

L'aire moléculaire au collapse confirme cette hypothèse, il est alors possible de noter que les composés formés à partir du 2-hexyldecanol occupent des aires moléculaires entre 70 et 100 Å²/molécule. Cependant le composé **BSV 101** formés par des chaînes saturées de type stéaryle occupe une aire moléculaire égale à 45 Å²/molécule. Ces résultats peuvent être expliqués par l'existence des différentes interactions entre les chaînes alkyles (interaction de Van Der Waals, interaction hydrophobes) qui favorisent la formation d'un film épais. La présence de ramifications ou d'insaturations limite ces interactions et donnent lieu à des assemblages plus fluides et moins résistants face à la compression et occupant des aires moléculaires plus importantes.

4. Ellipsométrie

Un autre moyen pour étudier la monocouche lipidique formée à l'interface air/eau est l'ellipsométrie. En effet il existe une relation linéaire entre l'épaisseur de la monocouche et la valeur de l'angle ellipsométrique Δ . Plus la valeur de Δ est élevée plus la monocouche est épaisse et inversement la diminution de la valeur de Δ signifie que le film formé est relativement plus fin.

¹⁸⁶ H. Yun, Y. W. Choi, N. J. Kim, D. Sohn, Bull. Korean Chem. Soc, **2003**, 24. 377-383.

¹⁸⁷ H. Nyugen, C.E. McNamee, J. Phys. Chem. B., **2014**, 118, 5901-5912.

Les mesures de l'angle ellipsométrique sont faites pendant les expériences d'isothermes de compression. Deux valeurs importantes sont à tirer :

- La valeur de l'angle ellipsométrique à faible pression (au lift-off) notée Δ min
- La valeur de l'angle ellipsométrique au collapse notée Δ max

La différence entre les valeurs de Δ min et Δ max renseigne sur la capacité de la monocouche à se réarranger pour faire face à la compression.

L'ensemble des données obtenues suite à ces expériences est résumé dans le *Tableau 24*

	Δ min (°)	Δ max (°)	$\delta\Delta$: Δ max – Δ min (°)
4.4 (BSV 161)	2.0 ± 0.2	4.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2
4.5 (BSV 162)	2.2 ± 0.2	4.9 ± 0.2	2.7 ± 0.2
4.6 (BSV 163)	2.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2
BSV 101	6.1 ± 0.1	9.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1
BSV 36	3.5 ± 0.1	5.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1

Tableau 24: Résultats des expériences d'ellipsométrie

- Au lift-off

Les valeurs de Δ min des composés **BSV 161**, **162** et **163** sont comprises entre 2 et 2,2°. Ceci indique qu'à faible pression les molécules ont tendance à s'étaler à l'interface air/eau formant ainsi une monocouche fine. Ces valeurs sont considérablement plus faibles que la valeur de Δ min du composé **BSV 101** (6.1°). Cette différence serait due à la nature de la chaîne lipidique de ce composé. En effet le phosphoramidate **BSV 101** est synthétisé à partir du l'octadecanol un alcool linéaire saturé. Les différentes interactions entre les chaînes hydrophobes favorisent alors la formation d'un film compact expliquant la valeur élevée de l'angle ellipsométrique. La présence de ramification sur les chaînes hydrophobes des composés **BSV 161**, **162** et **163** empêche les interactions entre les chaînes hydrophobes ce qui entraîne la diminution des valeurs de l'angle ellipsométrique Δ min.

- Au collapse

Les valeurs de l'angle ellipsométrique enregistrées au collapse sont aussi dépendantes de la nature de la chaîne lipidique. Le composé **BSV 101** forme la monocouche la plus épaisse ($\Delta \text{ max} = 9,3^\circ$). Les nouveaux lipides cationiques **BSV 161**, **162** et **163** forment les monocouches les plus fines ($\Delta \text{ max}$ entre 4,3 et 5,0 °). D'autre part, il semble que la nature de la tête polaire a peu d'incidence sur l'épaisseur film lipidique formé.

Finalement, les faibles valeurs de $\delta\Delta$ indiquent que les composés formés par des chaînes ramifiées n'ont pas la capacité à se réarranger pour faire face à la compression contrairement aux composés comportant des fonctions thioéthers dont les valeurs de $\delta\Delta$ sont supérieures à 6° traduisant ainsi une aptitude à modifier leur conformation en fonction de la pression appliquée.

5. Détermination de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ^{31}P en milieu organisé

Un des objectifs de ce chapitre est la synthèse de lipides cationiques qui s'auto-assemblent en phase hexagonale inverse. Pour atteindre cet objectif l'idée était d'augmenter le volume occupé par la partie hydrophobe en utilisant des chaînes lipidiques ramifiées. Afin de déterminer la nature de l'organisation supramoléculaire une des techniques utilisées est la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du phosphore en milieu organisé aqueux.

La technique consiste à préparer une solution liposomale de concentration 100 mg/mL par la méthode d'hydratation de film lipidique. Cette solution est par la suite lyophilisée pendant la nuit. Ensuite, un volume d'eau est ajouté pour obtenir une solution de concentration totale de 100 mg/mL. Trois cycles froid, chaud, vortex sont appliqués à ces échantillons pour obtenir finalement une solution formée de deux phases :

- Une phase liquide incolore
- Une phase solide

La phase solide est introduite dans un rotor adapté pour les tubes RMN et l'acquisition du spectre se fait selon la séquence écho de Hahn présentée au cours du deuxième chapitre.

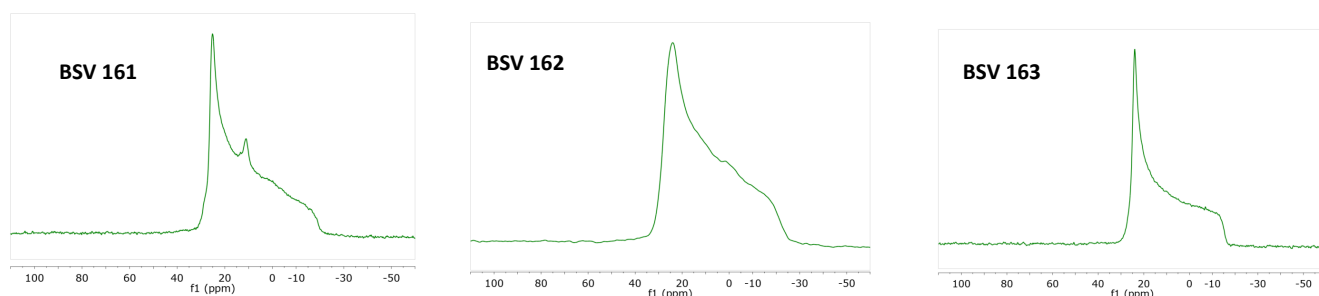


Figure 135: Spectre RMN ^{31}P en milieu organisé des composés **BSV 161**, **162** et **163**

Les spectres obtenus pour les composés **BSV 161**, **162**, **163** présentés sur la *Figure 135* indiquent la présence d'un signal dissymétrique avec un épaulement du côté droit et une anisotropie de déplacement chimique d'environ 40 ppm. Ces caractéristiques spectrales sont indicatrices de la formation d'une phase hexagonale (direct ou indirect).

Compte tenu du volume important occupé par la partie hydrophobe formant ces phosphoramides, l'hypothèse la plus vraisemblable serait que la phase formée dans ce cas précis soit une phase hexagonale inverse. Des expériences de RMN ^2H pourraient confirmer cette hypothèse.

Il est aussi important de souligner que la nature de la tête polaire semble ne pas affecter la nature de l'autoassemblage supramoléculaire de ces composés amphiphiles.

- Récapitulatif

L'étude des propriétés physico-chimiques des phosphoramides synthétisés au cours de ce chapitre a permis de confirmer que l'utilisation de chaîne ramifiée permet d'augmenter la fluidité des assemblages supramoléculaires comme il a été démontré par anisotropie de fluorescence et par la technique d'isotherme de compression. D'autre part, les spectres RMN ^{31}P en milieu organisé des différents produits confirment la formation d'auto-assemblage de type hexagonal.

La nature de la tête polaire semble cependant ne pas impacter fortement les propriétés physico-chimiques de ces molécules. Seule le composé **BSV 163** semble se démarquer par une aire moléculaire plus importante en isotherme de compression due à la taille et la délocalisation de la charge sur le noyau imidazolium.

V. Études des propriétés de transfection des lipides cationiques

1. Mesure de la taille et du potentiel zêta des solutions liposomales

Les trois lipides cationiques **BSV 161**, **162** et **163** sont formulés selon la méthode d'hydratation de film lipidique pour préparer des solutions de concentration égale à 1,5 mM nécessaire pour la réalisation de test de transfection. Cependant, l'obtention des solutions liposomales homogène nécessite trois jours d'hydratation. L'ajout du co-lipide DOPE dans les formulations à différents ratios (1/1 et 1/2) permet de réduire le temps d'hydratation comme le montre le *Tableau 25*.

	Temps d'hydratation	Taille nm	Pdl	Zeta mV
4.4 (BSV 161)	3 jours	151 ± 4	0.3	75 ± 6
4.5 (BSV 162)	3 jours	149 ± 2	0.4	51 ± 4
4.6 (BSV 163)	3 jours	107 ± 5	0.2	54 ± 5
4.4 (BSV 161) / DOPE (1/1)	1 jour	177 ± 2	0.2	76 ± 1
4.5 (BSV 162) / DOPE (1/1)	1 jour	123 ± 1	0.3	62 ± 2
4.6 (BSV 163) / DOPE (1/1)	1 jour	111 ± 2	0.2	58 ± 4
4.4 (BSV 161) / DOPE (1/2)	1 jour	147 ± 9	0.2	63 ± 5
4.5 (BSV 162) / DOPE (1/2)	1 jour	184 ± 1	0.4	62 ± 4
4.6 (BSV 163) / DOPE (1/2)	1 jour	171 ± 12	0.4	69 ± 3

Tableau 25: Détermination de la taille et du potentiel zêta des liposomes

La mesure des tailles et du potentiel zêta des formulations préparées a été réalisée par Dynamic Light Scattering (DLS). Les valeurs obtenues varient entre 108 et 184 nm. Il est cependant difficile d'établir un lien entre la nature de la tête polaire et les tailles mesurées.

D'autre part toutes les formulations présentent un potentiel zêta positif assurant une bonne stabilité colloïdale des solutions.

2. Test de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

La capacité des nouveaux vecteurs à complexer l'ADN a été étudiée par la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'ADN non complexé se manifeste par une bande visible à l'UV. Les neuf formulations préparées précédemment sont alors testées et les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous.

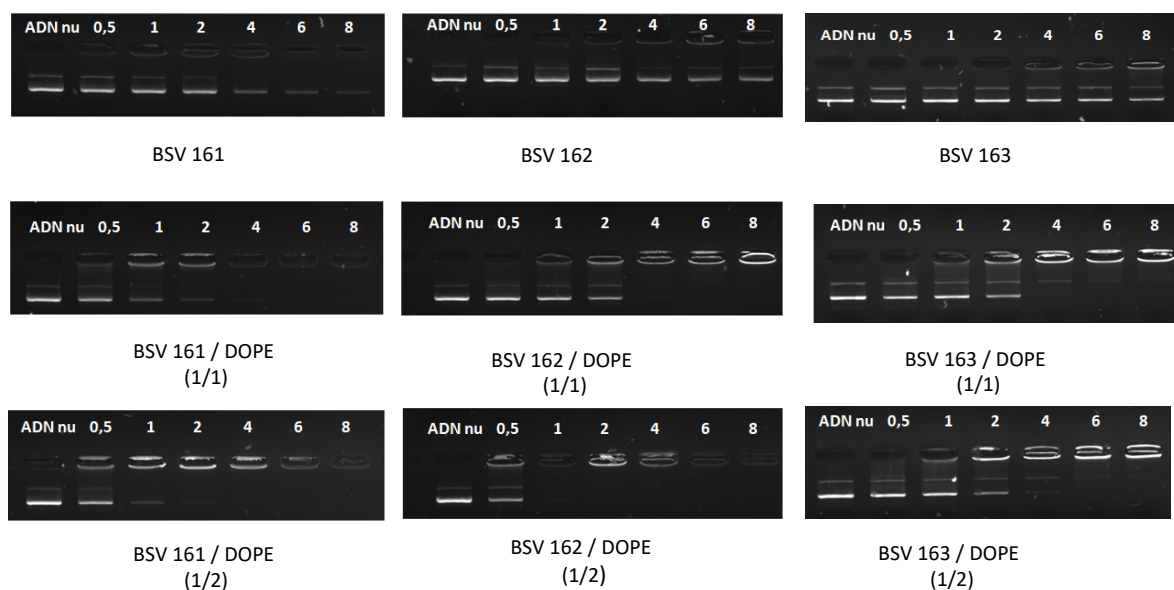


Figure 136: Gel retard des différentes formulations préparées

- Formulations sans le co-lipide DOPE

En absence du co-lipide DOPE seul le lipide cationique **BSV 161** contenant une tête polaire de type triméthyl ammonium est capable de complexer totalement l'ADN à partir d'un rapport de charge égal à 4. Les deux composé **BSV 162** et **BSV 163** formés par des têtes polaires de type diméthyléthoxyammonium et méthylimidazolium respectivement ne sont pas capables de complexer efficacement l'ADN et ce même pour des charges ratio élevés (CR = 8). En effet la petite taille de la tête triméthylammonium entraine une forte densité de charge par unité de volume ce qui favorise les interactions avec les molécules d'ADN et facilite par conséquent sa complexation.

- Formulation avec le co-lipide DOPE.

En présence de la DOPE, une complexation totale de l'ADN est observée à un rapport de charge égal à 1 pour le composé **BSV 161**. Les deux phosphoramides **BSV 162** et **163** sont capables de complexer efficacement l'ADN qu'à partir de CR = 4.

3. Étude de l'efficacité de transfection *in vitro*

L'activité de transfection *in vitro* des vecteurs est déterminée sur trois lignées cellulaires. Deux lignées dérivées de cellules épithéliales de voies respiratoires humaines, la lignée A549 et la lignée 16HBE, et une lignée cellulaire dérivée du cancer de col de l'utérus HeLa.

Le plasmide pGM144 codant pour la luciférase est utilisé pour étudier la capacité des différentes formulations à transfecter les cellules. Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 137*.

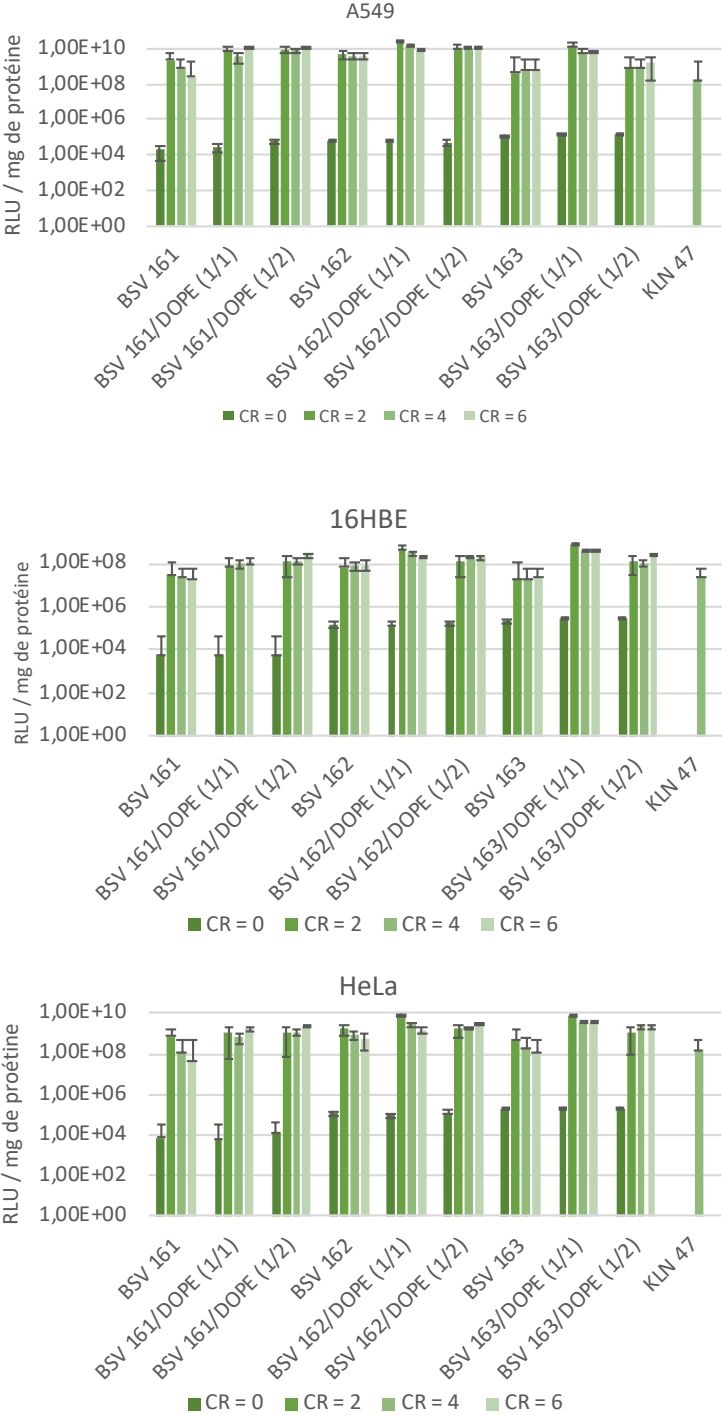


Figure 137 : Évaluation de l'efficacité de transfection des différentes solutions liposomales préparées

Sur les trois lignées cellulaires testées, les formulations contenant les nouveaux phosphoramides ramifiés formulés avec ou sans co-lipide transfectent mieux les cellules que le composé de référence **KLN 47**.

Les formulations préparées à base de lipides cationiques ramifiés seuls, bien qu'ils soient plus efficaces que le composé **KLN 47**, sont moins efficaces que celles préparées en présence de la DOPE. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en absence de co-lipide ces molécules ne sont pas capables de compacter totalement l'ADN comme a pu montrer les expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose.

D'autre part, la quantité de DOPE présente dans les formulations semble avoir un effet sur l'efficacité de transfection. En effet, les meilleurs résultats sont obtenus avec des formulations à base d'un mélange équimolaire de lipide cationique et de DOPE. L'ajout d'un excès de co-lipide (rapport 1/2) dans les solutions liposomales entraîne une légère diminution de l'efficacité de transfection de ces molécules. Des tests de transfection avec des formulations contenant un défaut de DOPE (rapport 2/1) (qui ne sont pas présentés ici) n'ont pas permis d'améliorer les résultats de transfection.

La nature de la tête polaire semble aussi avoir un effet sur les résultats de transfection. Ainsi, le phosphoramide contenant une tête polaire de type triméthylammonium (**BSV 161**) est le moins efficace parmi les trois nouveaux lipides cationiques synthétisés.

Le composé **BSV 163** formulé avec le co-lipide DOPE à un rapport 1/1 affiche les meilleurs résultats de transfection. Ceci peut être attribué à la délocalisation de la charge cationique sur le noyau méthylimidazolium qui empêche la formation de complexes très stables avec l'ADN ce qui facilite la décomplexation de l'ADN et facilite l'accès de l'acide nucléique au cytosol.

4. Étude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est déterminée par quantification de l'adénylate kinase relarguée par les cellules mortes ou endommagées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous

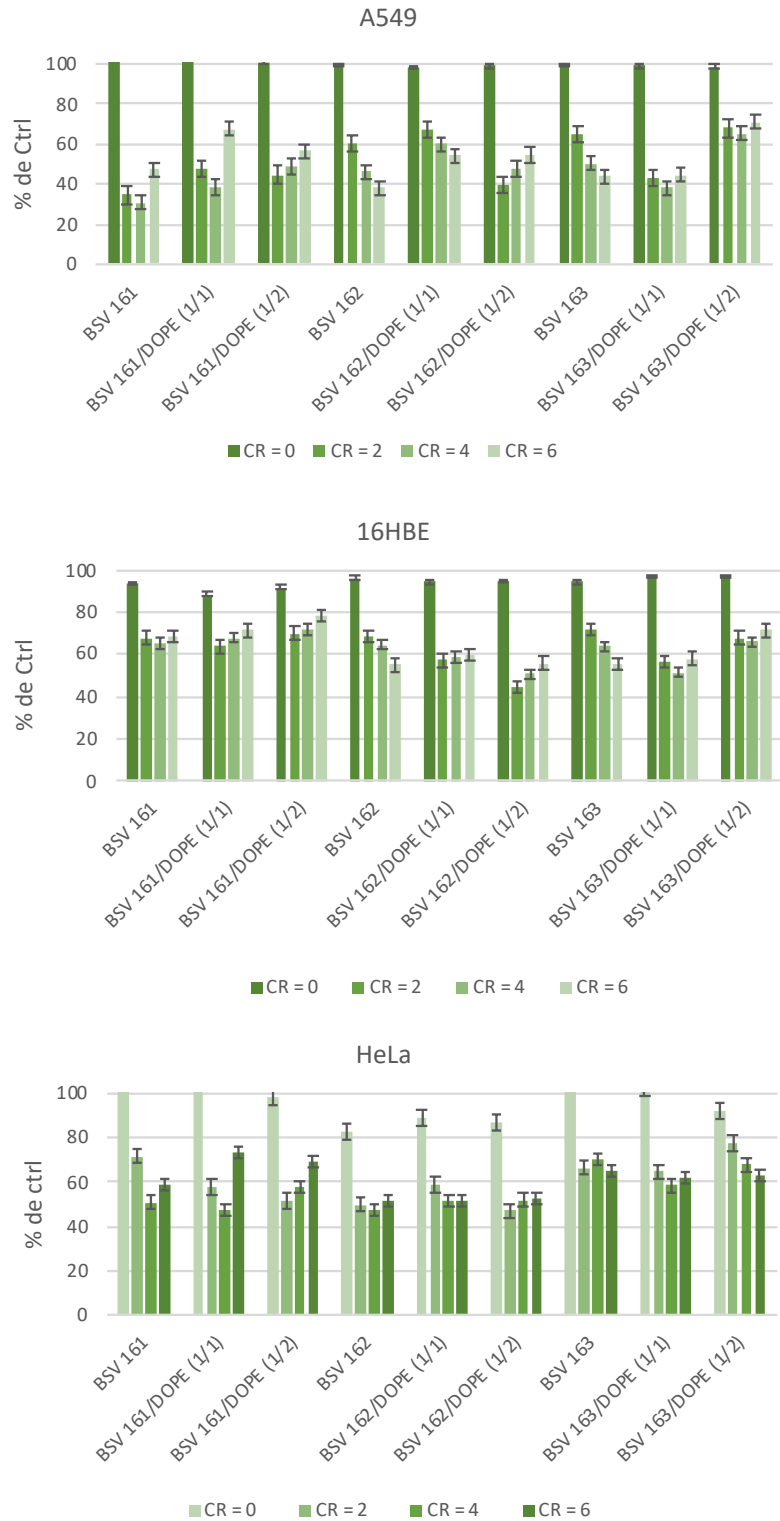


Figure 138: Résultats de la viabilité cellulaire

En examinant les données il est difficile d'établir un lien entre les résultats obtenus et la nature des formulations. En effet, sur les lignées **A549** et **HeLa** c'est le composé **BSV 163** formulé avec un excès de DOPE (rapport 2/1) qui semble être le moins toxique parmi les formulations

testées. Cependant sur la lignée **16HBE**, la formulation à base du phosphoramidate **BSV 161** DOPE (2/1) semble être la moins toxique.

Les résultats obtenus restent néanmoins acceptables puisque pour un rapport de charge de 4 où l'efficacité de transfection est maximale la viabilité cellulaire reste supérieure à 50%.

Finalement, le composé **BSV 163** formulé avec la DOPE (1/1) semble avoir la meilleure balance efficacité de transfection, toxicité parmi toutes les formulations testées

- Récapitulatif

L'étude des propriétés de transfection des composés **BSV 161**, **162** et **163** montre qu'ils peuvent être considérés comme d'excellents candidats pour la vectorisation de l'ADN.

La formulation préparée à partir d'un mélange du composé **BSV 163/DOPE (1/1)** améliore significativement les résultats obtenus avec le composé référence du laboratoire **KLN 47** tout en ayant une faible toxicité.

Ces résultats encourageants ont incité nos collaborateurs biologistes à faire des essais de transfection par aérosolisation *in vitro* et *in vivo* en utilisant cette formulation. Bien que les expériences *in vitro* ont montré que le mélange **BSV 163/DOPE (1/1)** permet d'obtenir une très bonne efficacité de transfection sur les différentes lignées testées. Les tests *in vivo* n'ont cependant pas été concluants.

L'utilisation d'alcools ramifiés commerciaux pour la synthèse de systèmes de vectorisation d'ADN semble être une stratégie avantageuse. En effet, l'accès aux phosphoramidates cationiques nécessite seulement trois étapes de synthèse. D'autre part, ces vecteurs permettent d'améliorer considérablement les résultats de transfection *in vitro* en maintenant un taux de viabilité cellulaire acceptable.

En se basant sur l'ensemble de ces résultats, nous avons alors décidé de continuer à exploiter cette stratégie en synthétisant deux nouveaux lipides cationiques (**BSV 164** et **BSV 165** *Figure 140*) à partir de chaînes hydrophobes ramifiées en gardant la tête méthylimidazolium qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats de transfection avec le composé **BSV 163**. L'objectif étant d'allonger les chaînes alkyles en utilisant des alcools commerciaux contenant des chaînes plus longues. En effet des travaux antérieurs de notre équipe et de la littérature

montrent que la longueur des chaînes alkyles a une influence drastique sur les propriétés physicochimiques et de transfection^{188,189} des molécules amphiphiles.

Ces résultats s'expliquent par la capacité des longues chaînes hydrophobe à améliorer la capacité des lipides cationiques à compacter l'ADN.

Pour atteindre cet objectif deux alcools commerciaux sont choisis, le 2-octyldodecanol formées de deux chaînes de 8 et 12 atomes de carbones et le 2-decyltetradecanol contenant des chaînes de 10 et 14 atomes de carbones présentés sur la figure ci-dessous.

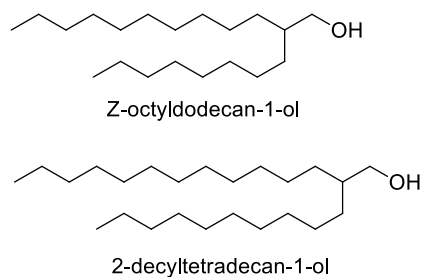


Figure 139 : Structure des alcools utilisés pour la synthèse des lipides cationiques **BSV 164** et **BSV 165**

Afin d'étudier l'effet apporté par la longueur de la chaîne grasse, les propriétés physicochimique et de transfection des phosphoramides présentées sur la **Figure 140** seront comparées à leur analogue **BSV 163**.

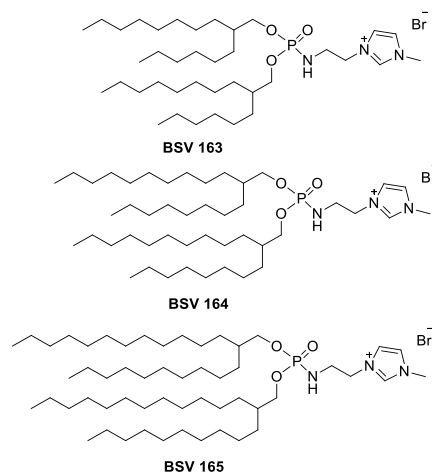


Figure 140: Structures des lipides cationiques **BSV 163**, **164** et **165**

¹⁸⁸ Z. Liu, Z. Zhang, C. Zhou, Y. Jiao, Prog. Polym. Sci, **2010**, 35, 1144–1162.

¹⁸⁹ Y. Zhang, Z. Zhou, M. Chen, Polymers, **2018**, 10, 379-394.

VI. Synthèse de lipides cationiques ramifiés à chaînes plus longues

Comme nous avons indiqué à l'introduction de ce chapitre la deuxième partie de cette étude est consacrée à l'étude de l'effet de longueur de la chaîne hydrophobe sur les propriétés de transfection et les propriétés physico-chimiques de ces molécules. La synthèse de ces nouveaux phosphoramides est la même que celle détaillée plus haut dans ce chapitre.

La première étape consiste en une réaction de transestérification entre le 2-octyldodécanol ou le 2-décyltétradécanol et le diphenyle phosphite pour obtenir les phosphites du dialkyle (**4.7** et **4.8**) respectivement avec des rendements quantitatifs. Un couplage Atherton-Todd entre les phosphites préalablement synthétisés et le bromure de bromoéthyl- ammonium en présence du DIPEA et BrCCl_3 permet l'obtention des phosphoramides (**4.9** et **4.10**) avec des rendements de 65 et 40 %.

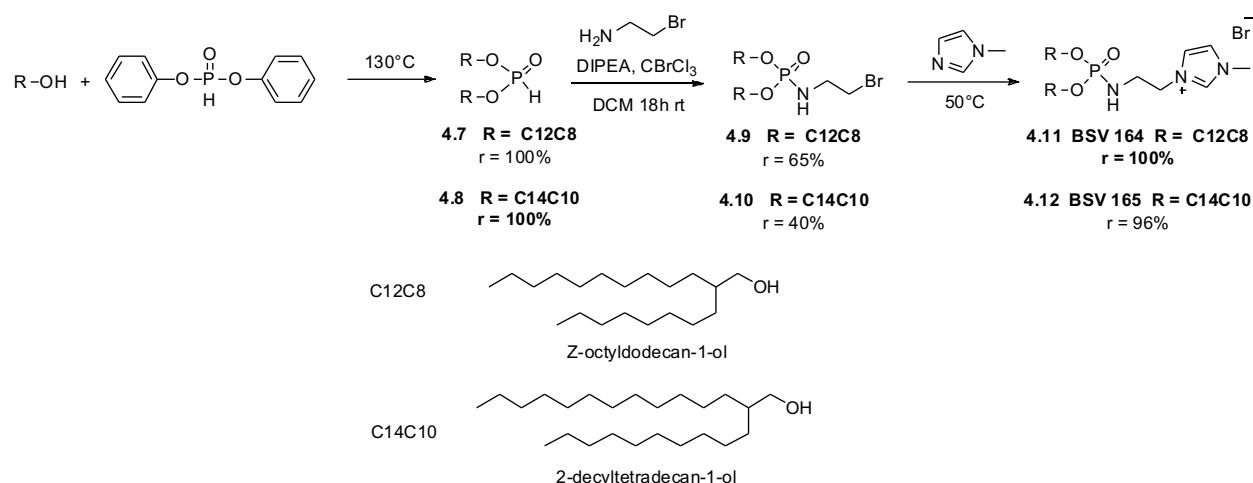


Figure 141 : Synthèse de lipides cationiques ramifiées

La dernière étape de synthèse est l'introduction de la tête polaire en mélangeant le phosphoramide obtenu avec un excès de méthylimidazole. La solution est chauffée pendant la nuit à 40°C puis l'excès du méthylimidazole est enlevé par distillation au kugelrohr. L'ensemble de ces étapes est présenté sur la **Figure 141**

Composé	Alcool utilisé	Masse obtenue	Rendement global
4.11 BSV 164	2-octyldodécanol	1.1 g	64 %
4.12 BSV 165	2-décyltétradécanol	1.0 g	38 %

Tableau 26 : Masses et rendements globaux de la synthèse des composés **BSV 164** et **BSV**

Les deux phosphoramides sont finalement obtenus avec de bons rendements et avec des quantités suffisantes pour réaliser l'étude de leurs propriétés de transfection et physico-chimiques (Tableau 26 : Masses et rendements globaux de la synthèse des composés **BSV 164** et **BSV 165**).

VII. Étude des propriétés physico-chimiques des phosphoramidates synthétisés

1. Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

Les valeurs de la concentration d'agrégation critique ont été déterminées en traçant les courbes de variation de l'intensité de fluorescence du Nile Red (I_{max}) en fonction de $\log(C)$. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 142.

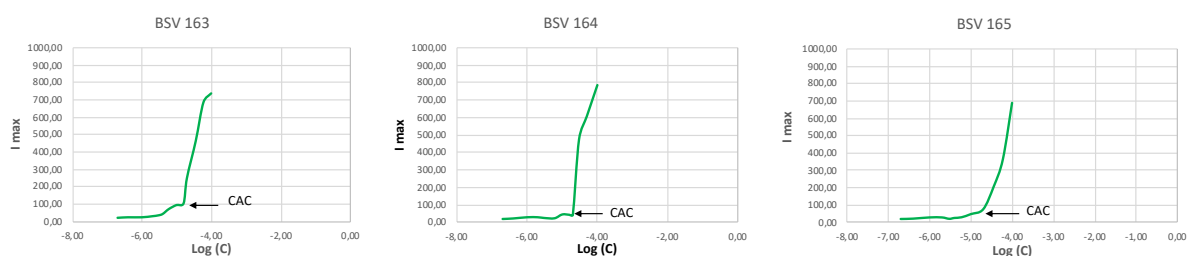


Figure 142: Courbes de variation de l'intensité de fluorescence en fonction de $\log(C)$ pour la détermination de la CAC des composés **BSV 163**, **164** et **165**

Une légère différence peut être observée entre les trois composés. En effet les lipides cationiques **BSV 164** et **BSV 165** semblent s'organiser à une concentration légèrement supérieure au composé **BSV 163** alors que leurs chaînes carbonées sont plus longues. Ces résultats ne semblent pas en accord avec les données de la littérature qui indiquent que la valeur de la CAC diminue en augmentant la longueur de la chaînes hydrophobe ¹⁹⁰.

2. Étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par anisotropie de fluorescence
Afin d'évaluer la fluidité des assemblages supramoléculaires, des tests d'anisotropie de fluorescence ont été réalisés. La technique consiste à mesurer l'anisotropie de la sonde diphenylhexatriene (DPH) en fonction de la température. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 143

¹⁹⁰ B. Peterson, C. J. Marzacco, Chem. Educator, **2007**, 12, 80–84.

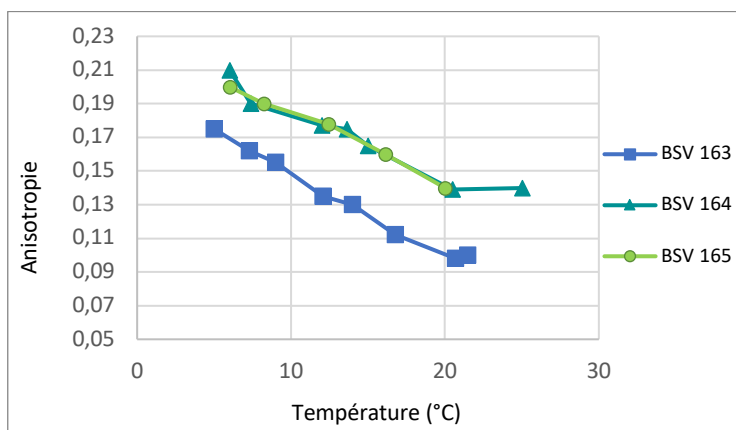


Figure 143 : Variation de l'anisotropie de la sonde DPH en fonction de la température

Comme attendu les valeurs d'anisotropie pour les deux composés **BSV 164** et **BSV 165** sont plus élevées que celles observées pour les composés **BSV 163**. Ceci est due aux interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles qui augmentent avec la longueur de la chaîne alkyle ce qui rigidifie les molécules.

Notons aussi l'absence d'une variation nette de valeur d'anisotropie ce qui indique que ces mesures sont réalisées à des températures supérieures à la température de transition de phase de ces molécules. Nous pouvons alors conclure que le passage de l'état gel à l'état cristallin liquide a lieu à une température inférieure à 5°C.

3. Isothermes de compression

Le comportement des composés **BSV 163**, **BSV 164** et **BSV 165** à l'interface air/liquide est étudiée par la technique d'isotherme de compression. La technique consiste à déposer une solution de lipide cationique sur une cuve de Langmuir remplie d'eau distillée. Les molécules sont par la suite comprimées à l'aide de barrières mobiles réglées à une vitesse de 5 cm²/min.

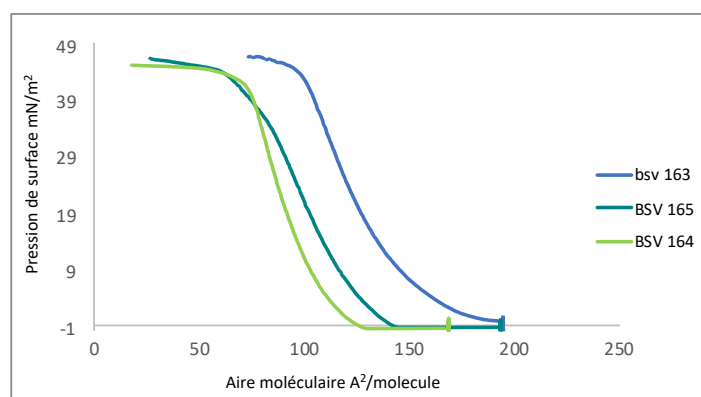


Figure 144: Isothermes de compression des composés **BSV 163**, **164** et **165**

En examinant les isothermes obtenus (*Figure 144*) il est possible de remarquer que la longueur de la chaîne hydrophobe a une influence majeure sur le comportement des phosphoramides à l'interface air / eau et en particulier sur la valeur de l'aire moléculaire au lift-off et au collapse. La valeur de la pression de surface au collapse reste sensiblement la même pour les trois molécules testées.

Composé	Aire moléculaire au lift off A_0^b Å ² /molécule	Aire moléculaire au collapse Å ² /molécule	Pression de surface au collapse mN/m
4.6 BSV 163	165 ± 2	100 ± 2	46 ± 0.25
4.11 BSV 164	147 ± 2	56 ± 2	45 ± 0,25
4.12 BSV 165	133 ± 1	56 ± 1	45 ± 0.1

Tableau 27: Valeurs de l'aire moléculaire et pression de surfaces extraites des isothermes de compressions des composés **BSV 163, 164 et 165**

- Au lift-off

Les aires moléculaires occupées par les trois phosphoramides diminuent en augmentant la longueur de la chaîne. Ceci peut s'expliquer par les interactions de Van Der Waals et les interactions hydrophobes qui deviennent plus importantes en augmentant la longueur des chaînes alkyles. Ce qui favorise la formation de film plus compact et diminue l'aire moléculaire occupée par les phosphoramides.

- Au collapse

Comme nous avons pu le constater au lift-off, les aires moléculaires des phosphoramides diminuent en augmentant la longueur de la chaîne. Le composé **BSV 163** formé par des chaînes de 6 et 10 atomes de carbones occupe l'aire la plus importante (100 Å²/molécule). L'utilisation des chaînes plus longues diminue de moitié la valeur de l'aire moléculaire qui atteint 56 Å²/molécule pour les composés **BSV 164** et **BSV 165**.

4. Ellipsométrie

La détermination de l'angle ellipsométrique Δ permet d'apporter des informations sur l'évolution de l'épaisseur de la monocouche en fonction de la longueur de la chaîne hydrophobe. Les résultats obtenus montrent que les monocouches formées à l'interface

air/ eau sont d'autant plus épaisses que les chaînes hydrophobes sont longues (*Tableau 28*: Valeurs de l'angle éllipsométrique Δ)

En effet, les interactions hydrophobes et de Van Der Waals favorisent la formation de film lipidique compact. Ces interactions deviennent de plus en plus importantes en augmentant la longueur de la chaîne hydrophobe. Ainsi le phosphoramidate **BSV 165** formés par les chaînes les plus longues possède la monocouche la plus épaisse ($\Delta_{\text{max}} = 6.4^\circ$) tandis que le composé **BSV 163** ayant les chaînes alkyles les plus courtes (6 et 10 atomes de carbones) forme le film le plus fins ($\Delta_{\text{max}} = 5.0^\circ$).

	Nombre d'atomes de carbone	$\Delta_{\text{min}} (^\circ)$	$\Delta_{\text{max}} (^\circ)$	$\delta\Delta: \Delta_{\text{max}} - \Delta_{\text{min}} (^\circ)$
4.6 BSV 163	6 et 10	2.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2
4.11 BSV 164	8 et 12	3.0 ± 0.2	5.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2
4.12 BSV 165	10 et 14	3.8 ± 0.1	6.4 ± 0.2	$2;6 \pm 0.2$

Tableau 28: Valeurs de l'angle éllipsométrique Δ

5. Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par ^{31}P en milieu organisé

Les spectres RMN obtenus (Figure 145) confirment que les deux nouveaux phosphoramidates **BSV 164** et **BSV 165** s'auto-assemblent en phase hexagonale. Compte tenu du volume important du domaine hydrophobe de ces lipides cationiques la phase formée est très probablement une phase hexagonale inverse. Des expériences de RMN ^2H en milieu organisé seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

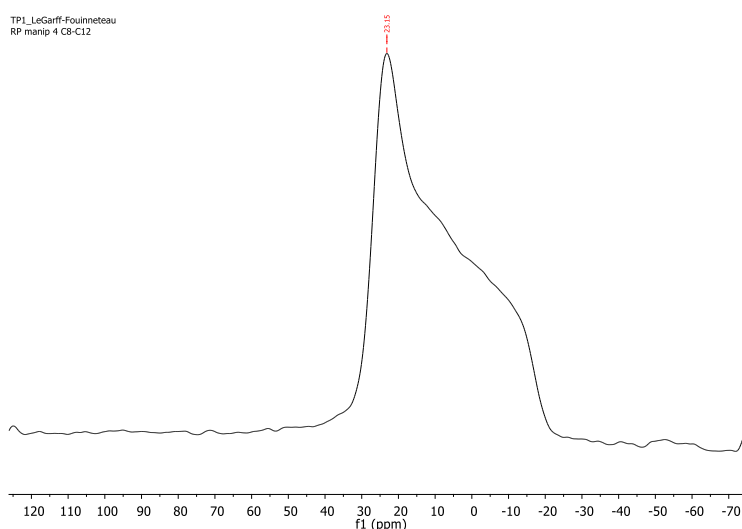


Figure 145 : Spectre RMN ^{31}P en milieu organisé du composé BSV 164

VIII. Étude des propriétés de transfection et de la viabilité cellulaire

1. Préparation de solution liposomales

Les solutions liposomales sont préparées par la méthode d'hydratation de film lipidique. Comme dans le cas précédent deux types de formulations sont préparés : 2 solutions liposomales formées par les amphiphiles cationiques **BSV 164** et **BSV 165** seuls, et deux solutions liposomales sont formées par un mélange équimolaire d'amphiphiles cationiques **BSV 164** ou **BVS 165** co-formulés avec le co-lipide **DOPE**. Les mesures de taille et de potentiel zêta sont présentées sur le tableau ci-dessous.

	Taille (nm)	Pdl	Zeta (mV)
4.11 (BSV 164)	133 ± 8	0.3	42 ± 3
4.12 (BSV 165)	143 ± 12	0.4	45 ± 5
BSV 164/ DOPE (1/1)	173 ± 5	0.2	38 ± 4
BSV 165/ DOPE (1/1)	132 ± 4	0.3	46 ± 1

Tableau 29 : Mesure de la taille et du potentiel zêta des solutions liposomales

Les tailles obtenues sont comprises entre 133 et 173 nm. Ces valeurs sont comprises dans les normes acceptées dans notre laboratoire. Le potentiel zêta de ces molécules est clairement positif assurant une bonne stabilité colloïdale de ces formulations.

2. Étude des propriétés de transfection des nouveaux vecteurs

L'efficacité de transfection des nouveaux phosphoramides est évaluées sur deux lignées cellulaires A549 et SKMel28. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous.

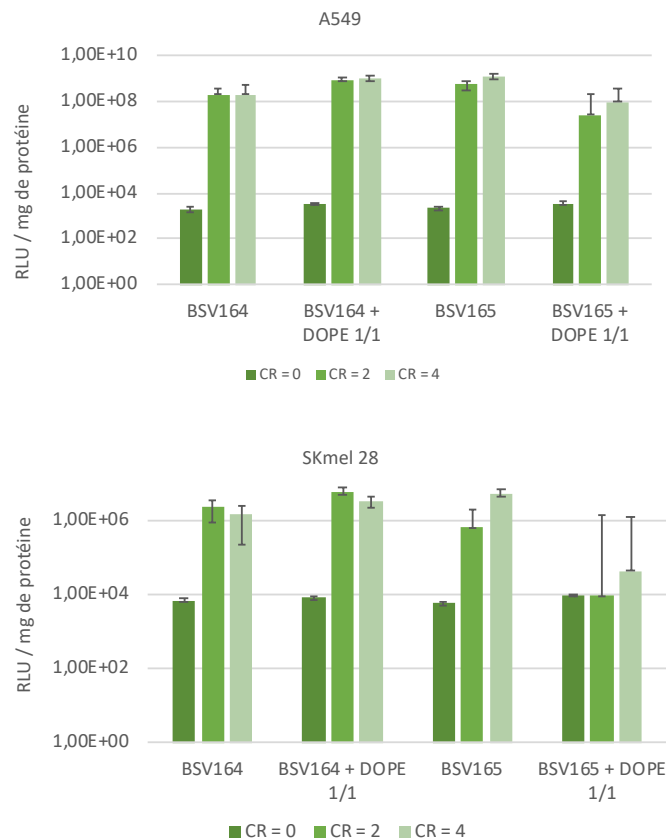


Figure 146 : Évaluation des propriétés de transfection des composés **BSV 164** et **BSV 165**

En examinant ces résultats, il est possible de remarquer que les formulations à base des lipides cationiques **BSV 164**, **BSV 164/DOPE (1/1)** et **BSV 165** affichent une efficacité de transfection similaire sur les deux lignées cellulaires testées. Seule la formulation à base du composé **BSV 165** co-formulé avec le co-lipide DOPE semble avoir une efficacité de transfection inférieure en particulier sur la lignée SKMel 28.

Cependant nous ne nous sommes pas en mesure de comparer les résultats de transfection obtenus pour les deux amphiphiles **BSV 164** et **BSV 165** avec ceux obtenus avec le composé **BSV 163** car les tests de transfection n'ont pas été effectués au même temps.

3. Évaluation de la viabilité cellulaire

Les résultats de la viabilité cellulaire présentés sur la Figure 147 affiche une toxicité importante des formulations à base des nouveaux amphiphiles cationiques **BSV 164** et **BSV 165**. En effet seule la formulation **BSV 165 / DOPE (1/1)** maintient une viabilité cellulaire supérieure à 60% sur les deux charges ratio 2 et 4. En revanche ce composé est aussi le moins efficace pour la transfection parmi les formulations testées.

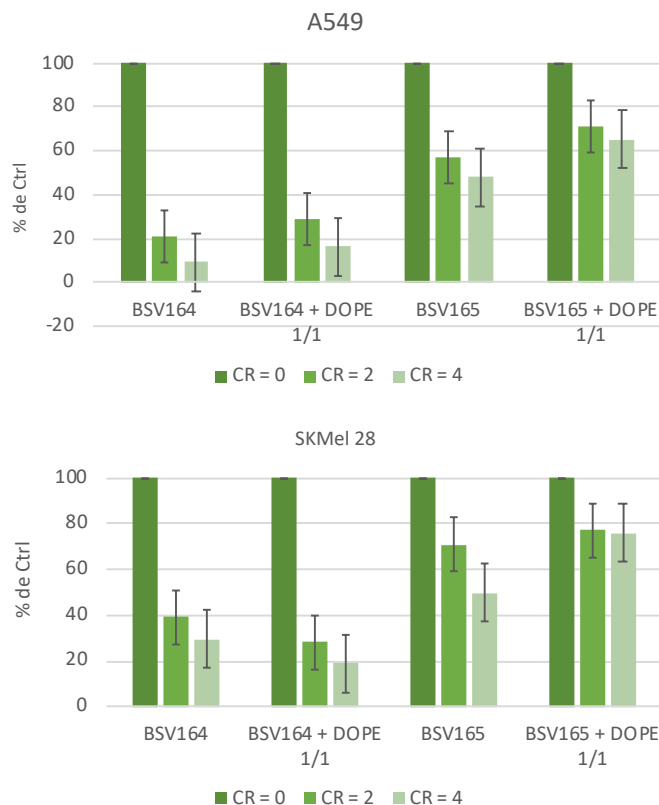


Figure 147 : Évaluation de la viabilité cellulaire sur les lignées A549 et SKMel 28

IX. Conclusion et perspectives

Nous avons décrit au cours de ce chapitre la synthèse de deux nouvelles séries de phosphoramides cationiques formées par des chaînes hydrophobes ramifiées.

Une première série est formée de 3 amphiphiles cationiques synthétisés à partir de l'alcool commercial 2-hexyldecan-1-ol et qui diffèrent par la nature de la tête polaire. La synthèse de ces molécules nécessite uniquement trois étapes et permet l'obtention des produits finaux avec des rendements satisfaisants et à l'échelle du gramme.

L'étude de la fluidité des assemblages supramoléculaires par anisotropie de fluorescence montre l'absence d'une transition de phase sur la gamme de température étudiée. Cela indique qu'à température physiologique tous ses composés se trouvent à l'état cristal liquide. Ces résultats peuvent être attribués à la présence de ramification dans le domaine hydrophobe de ces molécules qui empêchent les interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles et par conséquent empêchent la formation d'un film rigide. D'autre part, nous avons pu conclure que la nature de la tête polaire ne semble pas affecter la fluidité de ces nouveaux vecteurs.

L'un des objectifs de ce chapitre était aussi de favoriser la formation d'auto-assemblage supramoléculaire non lamellaire. L'hypothèse proposée étant d'augmenter le volume de la partie hydrophobe en choisissant des chaînes grasses ramifiées. Des études de RMN ^{31}P en milieu organisé ont permis de vérifier cette hypothèse. En effet, les spectres RMN obtenus montrent la formation d'une phase hexagonale pour les trois composés **BSV 161**, **162** et **163**. Finalement, l'évaluation des propriétés de transfections et de viabilité cellulaire ont montré que l'amphiphile cationique **BVS 163** (formé par une tête polaire de type méthy-imidazolium) formulé avec le co-lipide DOPE affiche d'excellents résultats pour le transfert de gènes pour les différentes lignées cellulaires testées.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à la synthèse de deux nouveaux phosphoramides cationiques formés par des chaînes hydrophobes ramifiées plus longues à partir des alcools commerciaux 2-octyl-dodecanol et le 2-decyltetradecanol. L'objectif de cette étude étant d'étudier l'effet de la longueur de la chaîne hydrophobe sur les propriétés physico-chimiques et de transfection de ces molécules.

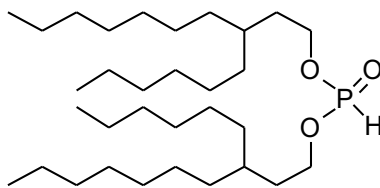
Comme attendu, les résultats d'isothermes de compression montrent que les valeurs d'aires moléculaires diminuent en augmentant la longueur de la chaîne hydrophobe. Ces résultats s'expliquent par les interactions hydrophobes qui sont d'autant plus importantes plus la chaîne alkyle est longue.

D'autre part, les spectres RMN ^{31}P en milieu organisé de ces deux composés montrent la formation d'une phase hexagonale probablement une phase hexagonale inverse en vue du volume important de la partie hydrophobe de ces vecteurs.

En guise de perspective, il serait intéressant de confirmer la formation de phases hexagonale inverse par spectroscopie de rayons X à petits angles. Ces travaux sont en effet en cours grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr Sakurai de l'université de Kitakyushu au Japon.

D'autre part, il serait aussi intéressant de réaliser de nouveaux tests de transfection avec les composés **BSV 163**, **164** et **165** afin de déterminer lequel de ces composés permet d'avoir la meilleure efficacité de transfection.

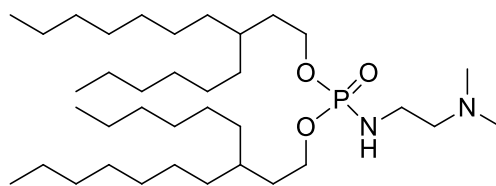
X. Partie expérimentale



4.1

Synthesis of compound 4.1: 2-hexyl-1-decanol (5g, 20.6 mmol) and diphenyl phosphite (2.3 g ; 9.82 mmol) were mixed and heated at 130 °C in a Kugelroch distillation under reduced pressure ($4.2 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h to remove phenol by distillation. The residue product corresponds to compound **4.1**.

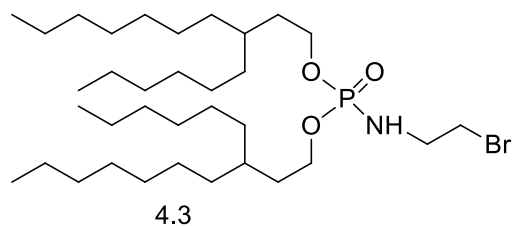
4.1 (5.2 g; Yield 100 %): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.85$ (t, $J = 6.8$ Hz, 12H), 1.24 (m, 50H), 1.6 (m, 2H), 3.25-3.57 (m, 4H), 5.90-7.63 (d, $^1J_{\text{H-P}}=692$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): 13.5 (CH_3). 22.1- 31.5 (CH_2 , fatty chain), 38.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH), 67.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.9$.



4.2

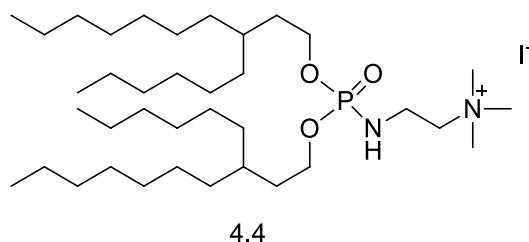
Synthesis of compound 4.2: To a solution of compound **2** (3g, 5.65 mmol) in 20 mL CH_2Cl_2 was added *N,N*-dimethylethylenediamine (6.21mmol), DIPEA (6.21mmol) and BrCCl_3 (6.21mmol) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 4 h. at 20°C. The solvent was evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 10 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was then dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 , washed with water, dried over MgSO_4 filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10 (v/v) as eluent to produce pale yellow oil.

4.2 (2.6 g; Yield 75%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.82$ (t, $J = 6.8$ Hz, 12H), 1.21 (m, 50H), 1.56 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 2.37 (t, $J = 5.8$, 2H), 2.89-2.96 (m, 2H), 3.51-3.54 (m, 1H), 3.79-3.86 (m, 4H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.1$. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta=13.9$ (CH_3), 21.4-31.3 (CH_2 , fatty chain), 38.1 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 38.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH), 44.5 ($^+\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 59.0 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 68.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$).



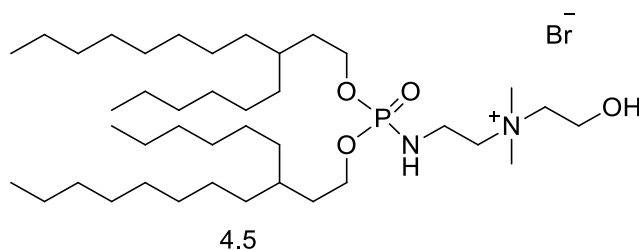
Synthesis of compounds 4.3: To a solution of compound **2** (2g, 3.76 mmol) in 20 mL CH₂Cl₂ was added 2-Bromoethylamine hydrobromide (15 mmol) DIPEA (15 mmol) and BrCCl₃ (15 mmol) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 18 h. at rt. The solvent was evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 10 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was then dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂, washed with water, dried over MgSO₄ filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using CH₂Cl₂/MeOH: 90/10 (v/v) as eluent to produce a colorless oil (1.4 g).

4.3 (1.4 g; Yield 60%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=0.83 (t, J = 6,6 Hz, 12H), 1.21 (m, 50H), 1.56 (m, 2H), 3.22-3.26 (m, 2H), 3.38 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.81-3.87 (m, 4H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 9.1.



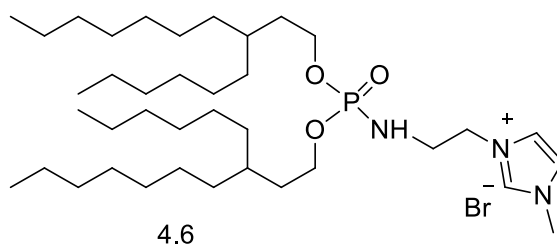
Synthesis of compound 4.4: to a solution of compound **3** (1g, 1.16 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added methyl iodide (4.5 mmol) and the reaction was stirred for 18h at rt. The solvent and the excess of methyl iodide were evaporated to give a yellow salt (0.9 g).

4.4 (0.9 g; Yield 100%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=0.83 (t, J = 8.4 Hz, 12H), 1.21 (m, 50H), 1.44 (m, 2H), 3.20 (s, 9H), 3.33-3.40 (m, 2H), 3.81-3.87 (m, 4H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 8.9. ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=13.5 (CH₃), 22.3-31.4 (CH₂, fatty chain), 35.6 (CH₂-NH), 38.3 (d, ¹J_{P-C} = 6.8 Hz, CH), 54.3 (⁺N(CH₃)₃), 66.2 (CH₂-N⁺), 69.1 (d, ¹J_{P-C} = 5.3 Hz, CH₂-O-P) ; Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): [M]⁺ calculated for C₃₇H₈₀N₂O₃P = 631.590; observed [M]⁺ = 631.757.



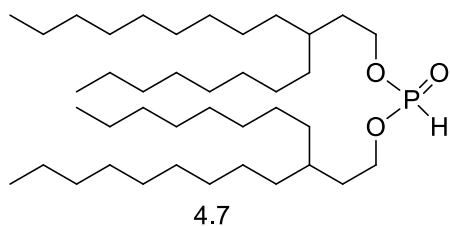
Synthesis of compound 4.5: to a solution of compound **3** (1g, 1.16 mmol) was added bromoethanol (2.9 mmol) and the reaction was stirred overnight at 40°C in DCM. The product was purified with flash chromatography DCM/MeOH (80/20) (v/v) to give a brownish wax.

4.5 (0.86 g; Yield 35%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.86$ (t, $J = 6.6$ Hz, 12H), 1.24 (m, 50H), 1.59 (m, 2H), 3.39 (s, 6H), 3.45-3.49 (m, 2H), 3.79-3.88 (m, 6H), 4.11-4.15 (m, 2H), 4.49-4.52 (m, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta= 9.1$. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta=13.5$ (CH_3), 22.3-31.3 (CH_2 , fatty chain), 35.3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 38.0 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 6.8$ Hz, CH), 52.3 ($^+\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 55.3 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 64.6 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 65.9 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 68.9 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$); Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_4\text{P} = 661.601$; observed $[\text{M}]^+ = 661.758$.



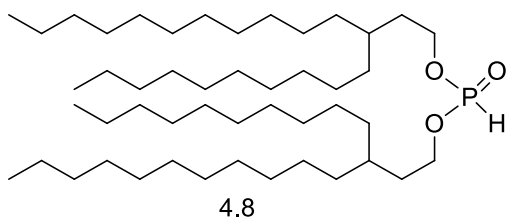
Synthesis of compound 4.6: to a solution of compound **4** (2g, 3.0 mmol) was added 1-methylimidazole (18 mmol) and the reaction was stirred overnight at 50°C. The excess of 1-methylimidazole was distilled in a Kugelroch apparatus at 130°C under reduced pressure (2.1×10^{-2} mbar) to give the final product as a colorless wax.

4.6 (2.1 g; Yield 100%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.81$ (t, $J = 8.6$ Hz, 12H), 1.15 (m, 50H), 1.52 (m, 2H), 3.73-3.80 (m, 4H), 3.98 (s, 3H), 4.26 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.59-4.62 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 9.69 (s, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta= 9.7$. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta=13.5$ (CH_3), 22.1-31.3 (CH_2 , fatty chain), 36.2 (CH), 38.0 (CH_3), 40.6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 50.2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 68.9 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 122.1 (HC=CH), 122.6 (HC=CH), 135.2 (N=CH); Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_3\text{P} = 654.570$; observed $[\text{M}]^+ = 654.702$.



Synthesis of compound 4.7: 2-octyl-1-dodecanol (5g, 16.7 mmol) and diphenyl phosphite (1.9 g; 8.35 mmol) were mixed and heated at 130 °C in a Kugelroch distillation under reduced pressure ($4.2 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h to remove phenol by distillation. to give the compound **4.7**.

4.7 (5.3 g; Yield 100 %) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.86$ (t, $J = 6.8$ Hz, 12H), 1.26 (m, 66H), 1.62(m, 2H), 3.22-3.54 (m, 4H), 5.92-7.66 (d, $^1J_{\text{H-P}}=696$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): 13.5 (CH_3). 22.0- 31.7 (CH_2 , fatty chain), 37.8 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH), 67.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta= 8.9$.

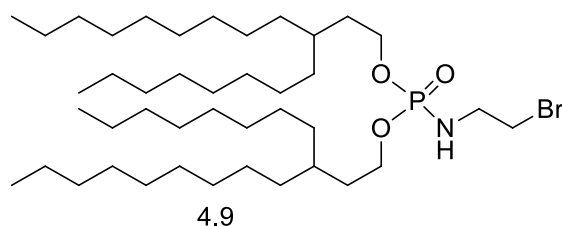


Synthesis of compound 4.8: 2-decyl-1-tetradecanol (5g, 14 mmol) and diphenyl phosphite (1.6 g; 7 mmol) were mixed and heated at 130 °C in a Kugelroch distillation under reduced pressure ($4.2 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h to remove phenol by distillation to give the desired compound as a colorless oil.

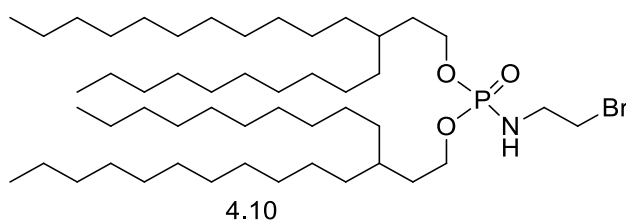
4.8 (5.3 g; Yield 100 %) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta=0.85$ (t, $J = 6.8$ Hz, 12H), 1.21 (m, 82H), 1.62(m, 2H), 3.21-3.52 (m, 4H), 5.90-7.64 (d, $^1J_{\text{H-P}}=696$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): 13.3 (CH_3). 22.0- 32.3 (CH_2 , fatty chain), 37.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH), 66.5 (d, $J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): $\delta= 8.8$.

Synthesis of compounds 4.9 and 4.10: To a solution of compound **7** or **8** (2g, 1 eq) in 20 mL CH_2Cl_2 was added 2-Bromoethylamine hydrobromide (1.1 eq) DIPEA (3 eq) and BrCCl_3 (3 eq mmol) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 18 h. at rt. The solvent was evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 10 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was then dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 , washed with water, dried over MgSO_4 filtered and concentrated. The compound was purified

by silica gel chromatography using CH₂Cl₂/MeOH: 90/10 (v/v) as eluent to produce a colorless oil

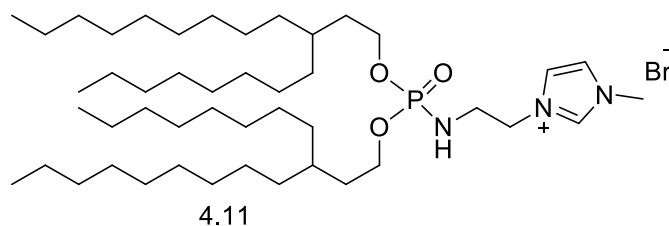


4.9 (1.5 g; yield 65 %) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=0.85 (t, J = 6,6 Hz, 12H), 1.24 (m, 66H), 1.56 (m, 2H), 3.23-3.28 (m, 2H), 3.35 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 3.80-3.85 (m, 4H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 9.1.



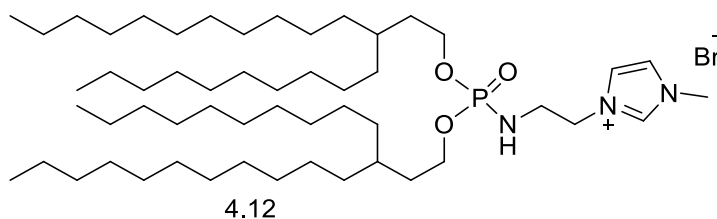
4.10 (0.92 g; yield 40 %) : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=0.85 (t, J = 6,6 Hz, 12H), 1.24 (m, 82H), 1.56 (m, 2H), 3.23-3.28 (m, 2H), 3.32 (t, J= 6.0 Hz, 2H), 3.82-3.87 (m, 4H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 9.2.

Synthesis of compound 4.11 and 4.12: to a solution of compound **9** or **10** (1g, 1 eq) was added 1-methylimidazole (10 eq) and the reaction was stirred overnight at 50°C. The excess of 1-methylimidazole was distilled in a Kugelroch apparatus at 130°C under reduced pressure (2.1 10⁻² mbar) to give the final product as a colorless wax.



Compound 4.11 (1.1 g; Yield 100 %): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=0.85 (t, J = 8.6 Hz, 12H), 1.20 (m, 66H), 1.62 (m, 2H), 3.75-3.84 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 4.24 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 4.59-4.63 (m, 1H), 7.32 (s,1H), 7.52 (s, 1H), 9.72 (s, 1H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 9.7. ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=13.2 (CH₃), 22.1-31.3 (CH₂, fatty chain), 36.5 (CH), 38.0 (CH₃), 40.8 (CH₂-NH), 50.2 (CH₂-N⁺), 68.7 (d, ¹J_{P-C} = 5.3 Hz, CH₂-O-P), 122.1 (HC=CH), 123.9 (HC=CH), 135.2

(N=CH); Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[M]^+$ calculated for $C_{38}H_{77}N_3O_3P$ = 766.690; observed $[M]^+$ = 766.712.



Compound 4.12 (1.0 g; Yield 96%: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ =0.86 (t, J = 8.6 Hz, 12H), 1.22 (m, 82H), 1.61 (m, 2H), 3.75-3.85 (m, 4H), 3.92 (s, 3H), 4.22 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 4.59-4.61 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 9.72 (s, 1H). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.8. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ =13.5 (CH_3), 22.1-32.2 (CH_2 , fatty chain), 37.1 (CH), 38.2 (CH_3), 40.8 (CH_2-NH), 51.2 (CH_2-N^+), 67.3 (d, $^1J_{P-C}$ = 5.3 Hz, CH_2-O-P), 121.9 ($HC=CH$), 123.1 ($HC=CH$), 135.2 ($N=CH$); Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[M]^+$ calculated for $C_{38}H_{77}N_3O_3P$ = 957.740; observed $[M]^+$ = 957.842.

Chapitre 5 : Conception
d'amphiphiles et bola-amphiphiles
multipolaires

I. Introduction

Au cours du chapitre précédent nous avons montré que les lipides cationiques synthétisés à partir d'alcools ramifiés commerciaux sont d'excellents candidats pour la vectorisation de l'ADN. De plus, les analyses par RMN de phosphore en milieu organisé ont montré la formation d'une phase hexagonale (probablement hexagonale inverse) connu pour avoir de meilleures propriétés fusogènes qu'une phase lamellaire. Cependant le volume important de la partie hydrophobe rend la formulation de ces vecteurs difficile et nécessite des temps d'hydratation importants (3 jours minimum).

Ainsi, afin de diminuer le temps d'hydratation de ces composés tout en gardant la possibilité de former des phases non-lamellaires une stratégie consisterait à augmenter le volume occupé par la partie polaire. Il s'agirait alors de synthétiser des lipides cationiques contenant plusieurs groupements polaires, comportant une ou plusieurs charges positives permanentes (cation permanent) en combinaison éventuelle avec un/des groupes protonables en fonction du pH, ou encore de groupes zwitterioniques ou neutres. De tels amphiphiles seraient donc nettement plus hydrophiles ce qui devrait faciliter l'étape de formulation. En termes de structures visées, nous adressons dans ce chapitre deux objectifs :

1- synthèse de nouveaux amphiphiles ayant une ou plusieurs têtes polaires volumineuses localisées à proximité afin de conférer aux amphiphiles une géométrie conique qui pourrait favoriser l'obtention de phases hexagonales directes. Cet objectif nous a conduit à proposer les structures ci-dessous obtenues selon les stratégies de synthèse notées A et B. La stratégie A vise à la synthèse de composés caractérisés par une tête polaire de type dendritique formées par trois fonctions hydrophiles de type ammonium ou alcool. La stratégie B, a pour but de ramifier chaque chaîne lipidique en y ajoutant une fonction polaire.

2- Le second objectif est plus exploratoire. Il a pour point commun avec l'approche précédente de développer de nouveaux amphiphiles multipolaires mais faisant apparaître les groupements polaires aux extrémités de domaines hydrophobes (composés bola-formes). Dans ce cas nous avons sélectionné des groupements pH-sensible (groupement imidazole) pour avoir un effet éponge à protons permettant de faciliter la sortie des acides nucléiques de l'endosome (Figure 148 stratégie C).

Au-delà de la synthèse de ces nouveaux types de composés, l'étude portera aussi sur leurs propriétés physico-chimiques et leurs propriétés de transfection. Nous regarderons aussi les propriétés d'assemblages en milieu aqueux.

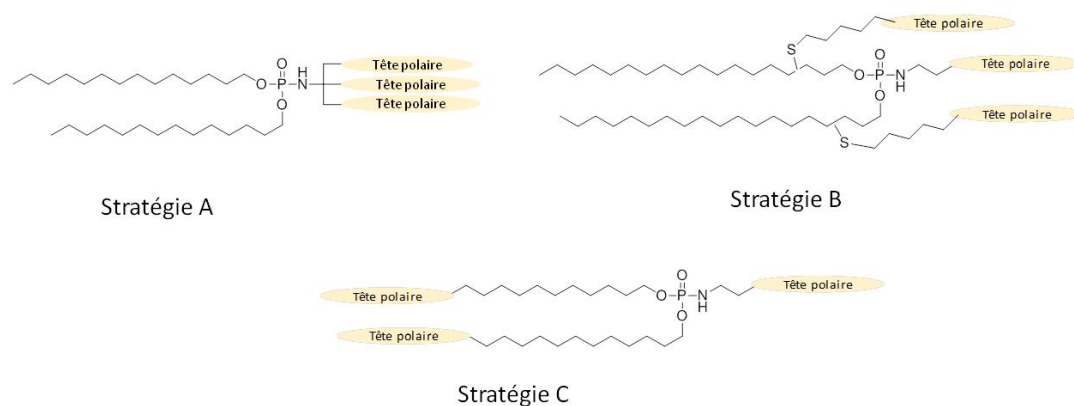


Figure 148 : Stratégies adoptées pour la synthèse de molécules amphotères multipolaires

II. Synthèse de molécules amphiphiles à tête polaire dendritique (stratégie A).

La première partie de ce chapitre est consacrée à la synthèse d'un phosphoramidate contenant une tête polaire dendritique polycationique. Historiquement, c'est Behr et al qui a décrit le premier lipide poly-cationique. Il s'agit du dioctadylamidoglycyl spermine (**DOGS**)¹⁹¹ représentées sur la *Figure 149*. C'est un lipopolyamine dérivée de la spermine. Formulé seul ce composé permet d'avoir de très bons résultats de transfection aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Il a été par la suite commercialisé sous le nom de Transfectam par la société promega.

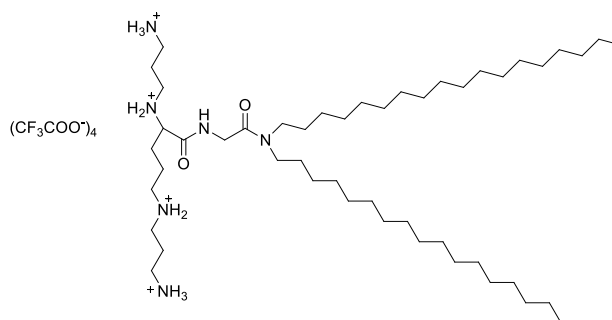


Figure 149 : Structure du **DOGS**

Plusieurs analogues du DOGS ont été synthétisés par la suite comme le pentafluoroacétate de 2,3-dioléyloxy-N-2-(sperminecarboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium (DOSPA

¹⁹¹ J. P. Behr, B. Demeneix, J. P. Loeffler, J. Perez-Mutul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1989**, 86, 6982-6986.

Figure 150) commercialisé en coformulation avec le co-lipide DOPE sous le nom de Lipofectamine™. Cette formulation est souvent utilisé comme référence pour les tests de transfection *in-vitro*¹⁹².

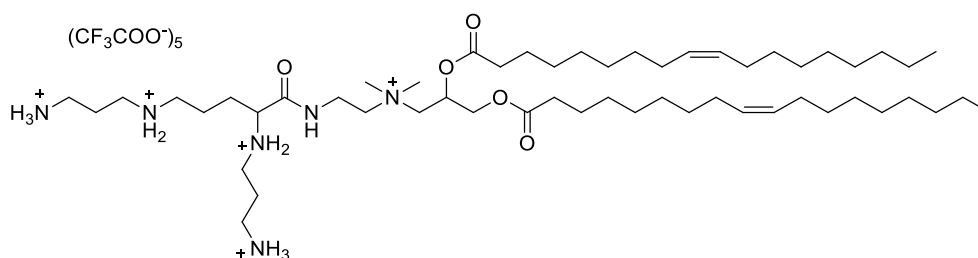


Figure 150 : Structure du **DOSPA**

Les lipides cationiques formés par une tête polaire poly-cationiques ont aussi beaucoup intéressé Safinya et al. En 2002, ils décrivent la synthèse d'un nouveau lipide cationique polychargé **MLV 5** (Figure 151) formé par deux chaînes oléyles et une tête polaire comportant 5 charges positives¹⁹³, Les tests de transfection montrent que le composé **MLV 5** est nettement plus efficace que le composé de référence commercial **DOTAP**.

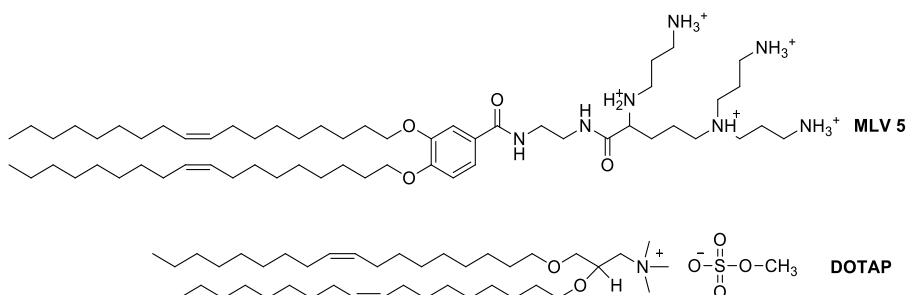


Figure 151 : Structure du **MLV 5** et du **DOTAP**

Ces résultats encourageants ont incité cette même équipe à synthétiser d'autres analogues du composé **MLV 5** en modifiant la nature de l'espaceur¹⁹⁴ ou en en augmentant le nombre de charges cationiques portées par la tête polaire¹⁹⁵. Ces modifications ont permis non seulement d'améliorer l'efficacité de transfection de ces vecteurs mais aussi d'établir un lien

¹⁹² K. Konopka, G. S. Harrison, P. L. Felgner, N. Duzgunes, *Biochimica Biophysica Acta*, **1997**, 1356, 185–197.

¹⁹³ K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, H. W. Schmidt, C. R. Safinya, *J. Med. Chem*, **2002**, 45, 5023-5029.

¹⁹⁴ R. S. Shirazi, K. K. Ewert, C. Leal, R. N. Majzoub, N. F. Bouxsein, C. R. Safinya, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, 1808, 2156–2166.

¹⁹⁵ K. K. Ewert, H. M. Evans, A. Zidovska, N. F. Bouxsein, A. Ahmad, C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc*, **2006**, 128, 3999-4006.

entre la nature de la tête polaire et l'assemblage supramoléculaire de ces composés dont certains adoptent, en présence d'ADN, des phases hexagonales directes.¹⁹⁶.

En se basant sur l'ensemble de ces travaux, nous avons choisis de synthétiser un nouveau phosphoramidate formé par une tête polaire contenant trois fonctions ammonium. Afin d'accéder à cet objectif, l'idée est de préparer deux synthons : un phosphite formé par deux chaînes de type tétradécyle et une amine contenant trois doubles liaisons terminales. Ces deux synthons seront par la suite couplés grâce à une réaction d'Atherton-Todd. La dernière étape sera une réaction click thiol-ène en utilisant un thiol comportant une fonction ammonium (Figure 152).

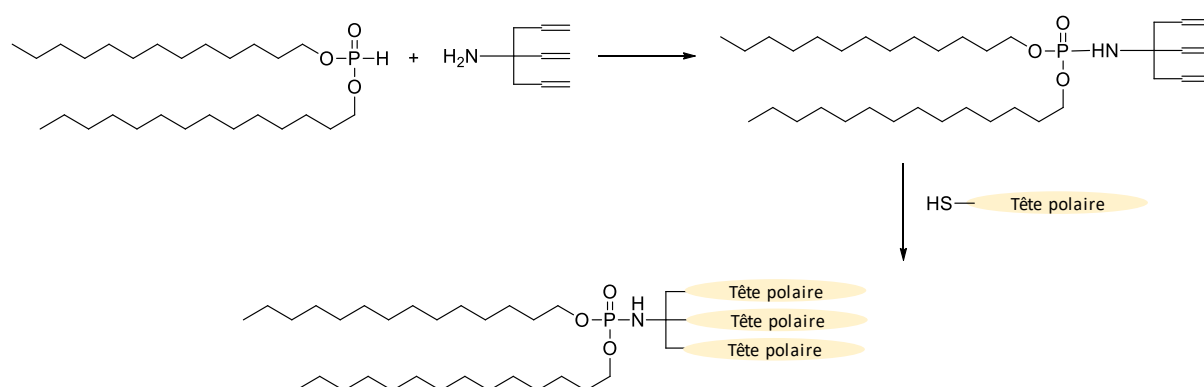


Figure 152 : Voie de synthèse pour les lipides formées de tête polaire de type dendritique.

1. Synthèse

Comme indiquée dans le paragraphe précédent la synthèse des nouveaux lipides cationiques multipolaires passe par deux étapes principales, la synthèse de l'amine comportant 3 doubles liaisons terminales à partir du chlorhydrate de 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol, et la synthèse du phosphite à partir du tétradécan-1-ol.

¹⁹⁶ K. K. Ewert, H. M. Evans, N. F. Bouxsein, C. R. Safinya, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 877–888.

2. Préparation de l'amine

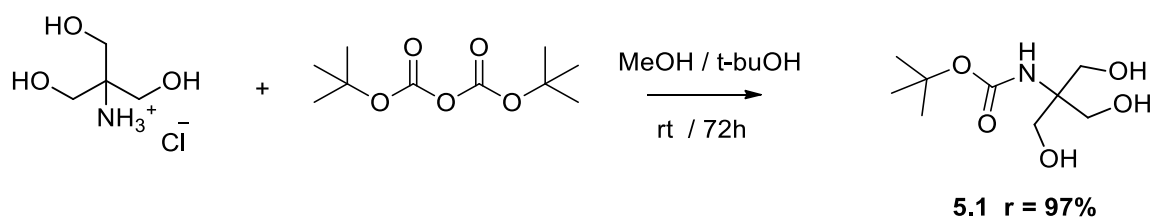


Figure 153: Protection de la fonction amine primaire

La première étape de synthèse est la protection de la fonction amine primaire du 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol avec le dicarbonate de di-tert-butyle (Boc) (*Figure 153*) en suivant une procédure de la littérature¹⁹⁷. L'amine protégée sous forme de carbamate **5.1** est obtenue au bout de 72h avec un rendement quantitatif comme l'atteste le spectre RMN ¹H où il est possible de noter la présence d'un singulet à 1,3ppm correspondant au groupement tert-butyle du groupement protecteur (*Figure 154*).

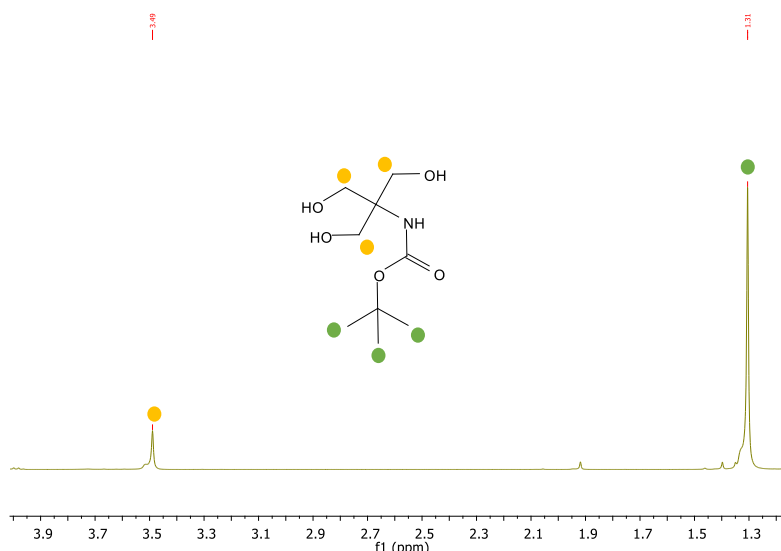


Figure 154 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃) obtenu après étape de protection de la fonction amine

Le bromure d'allyle est par la suite ajouté à l'amine précédemment obtenue afin d'introduire les trois doubles liaisons nécessaires pour la réalisation de la réaction thiol-ène (*Figure 155*). La formation du produit est confirmée par RMN ¹H avec l'apparition des signaux correspondant aux protons portés par les doubles liaisons. Une chromatographie sur gel de silice permet d'obtenir le produit désiré **5.2** avec un rendement de 85%.

¹⁹⁷ M. Segura, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Synthesis*, **2001**, 14, 2105-2112.

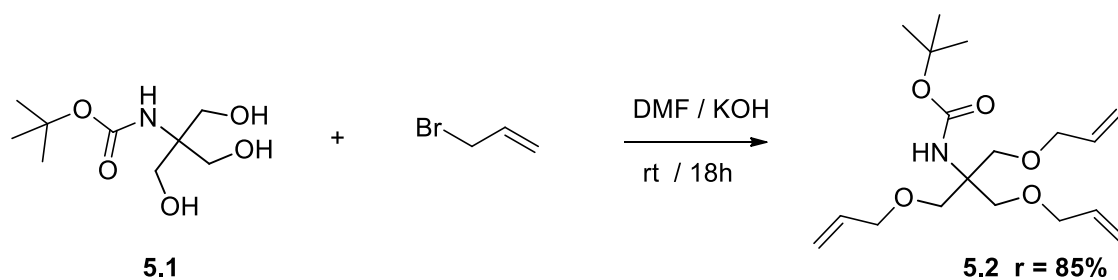


Figure 155 : Introduction des doubles liaisons

La dernière étape de synthèse du premier synthon consiste à déprotéger l'amine protégée sous forme de carbamate par ajout d'un excès d'acide trifluoroacétique (TFA) (Figure 156).

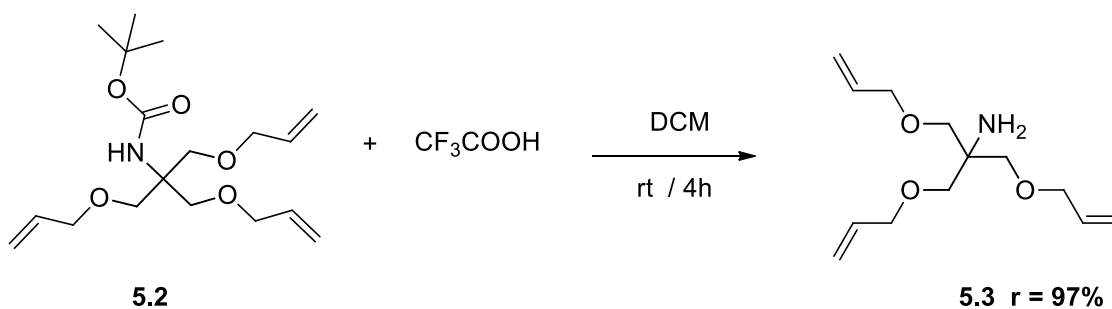


Figure 156: Synthèse de l'amine **5.3** par déprotection du carbamate **5.2**

La disparition du singulet à 1,3 ppm sur le spectre RMN ^1H (Figure 157 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) obtenu après la déprotection de l'amine) permet de confirmer la formation du produit final avec un rendement de 97%.

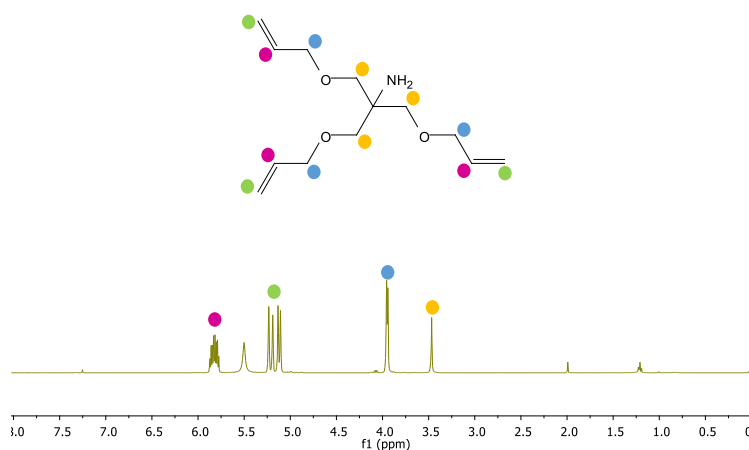


Figure 157 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) obtenu après la déprotection de l'amine

3. Synthèse du phosphite

Pour la synthèse du phosphite **5.4** la méthode utilisée est la même que celle décrite au cours des chapitres précédents. Il s'agit d'une réaction de transestérification entre le tétradécan-1-ol et le diphenyle phosphite *Figure 158*.

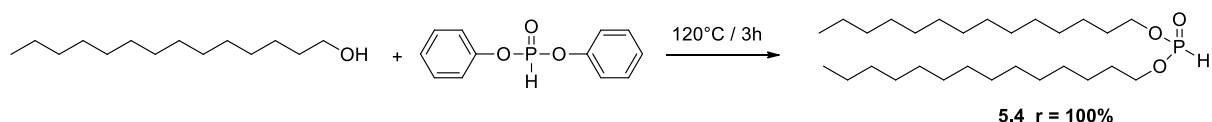


Figure 158 : Synthèse du phosphite à partir du tétradécan-1-ol

Deux raisons justifient le choix de cet alcool :

- La nécessité d'utiliser une chaîne alkyle qui ne contient pas de doubles liaisons afin d'éviter des réactions secondaires lors de la réaction thiol-ène.
- Éviter les difficultés de formulation liées à l'utilisation des alcools saturés à longues chaînes hydrocarbonées comme l'octadécan-1-ol.

4. Couplage Atherton-Todd

La synthèse du phosphoramidate se poursuit par une réaction de couplage de type Atherton-Todd (*Figure 159*). La méthode consiste à additionner le phosphite à un mélange d'amine et de DIPEA dissout dans du dichlorométhane, le bromotrichlorométhane est introduit en dernier.

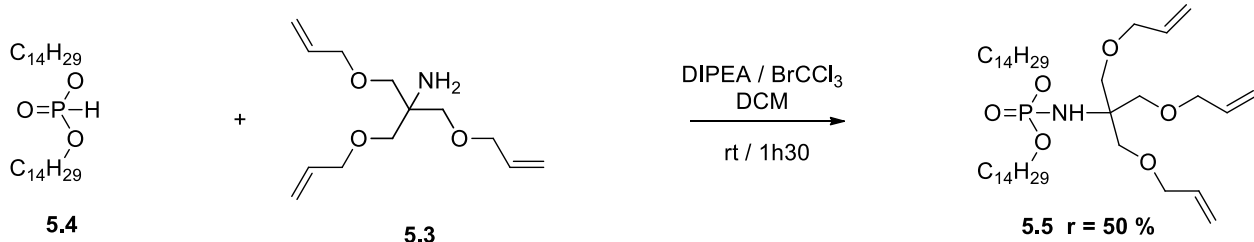


Figure 159: Couplage Atherton-Todd entre le phosphite **5.3** et l'amine **5.4**

La conversion totale du phosphite **5.4** est observée au bout de deux heures, et l'évolution de la réaction peut être suivie par RMN ^1H où il est possible de constater la disparition de doublet caractéristique de la liaison P-H comme l'atteste la *Figure 160*.

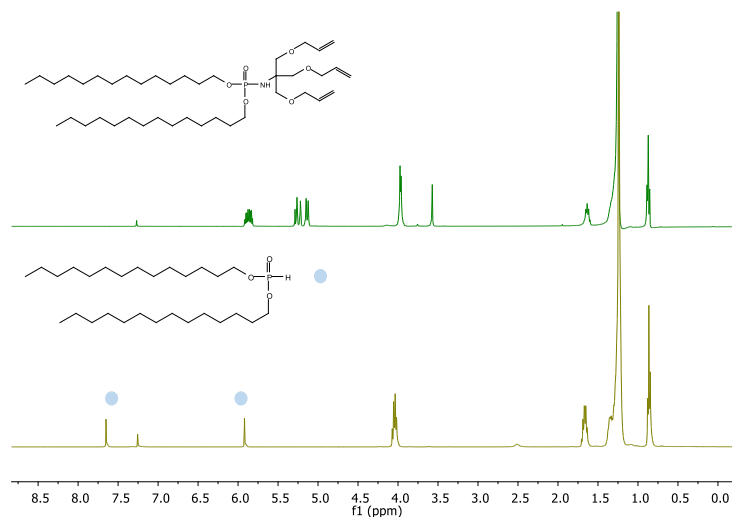


Figure 160 : Évolution du spectre RMN ^1H (CDCl_3) après couplage Atherton Todd

5. Réaction thiol-ène

La dernière étape de synthèse des lipides cationiques multipolaires est une réaction thiol-ène entre le phosphoramidate et un thiol comportant une fonction polaire. Le choix s'est porté sur le chlorhydrate de cystéamine qui est un aminothiols présent naturellement chez les mammifères et connu pour ses propriétés antioxydantes. La synthèse se déroule comme suit : le phosphoramidate **5.5** et un excès de chlorhydrate de cystéamine sont introduits dans un tube de Schlenk puis solubilisés avec un mélange MeOH / H₂O (9/1) (*Figure 161*). Une quantité catalytique du photoinitiateur (DMPA) est par la suite ajouté et le mélange est dégazé pendant quelques minutes puis placé sous lampes UV pendant 18h.

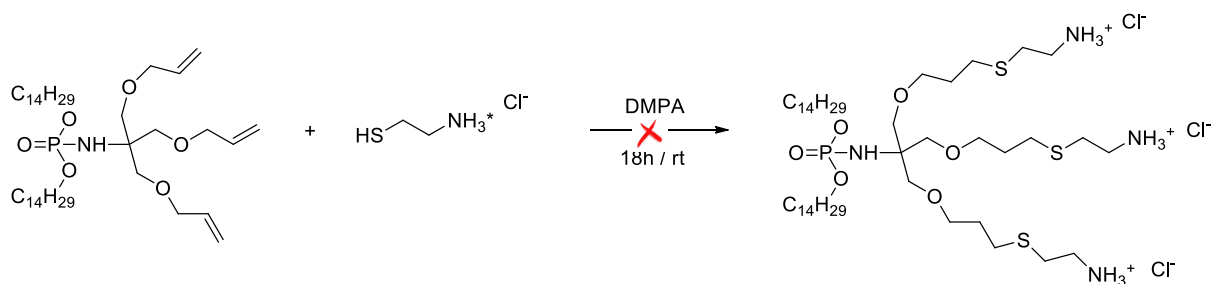


Figure 161 : Réaction thiol-ène entre le phosphoramidate **5.5** et le chlorhydrate de cystéamine

Cependant, la présence sur le spectre RMN ^1H des signaux correspondant aux protons portés par les trois doubles liaisons indique que la réaction n'a pas eu lieu probablement dû à des problèmes de solubilité.

Afin d'éviter ce problème, nous avons décidé de protéger la fonction amine du chlorhydrate de cystéamine en utilisant un groupement Boc pour éviter de travailler avec le sel de cystéamine (Figure 162).

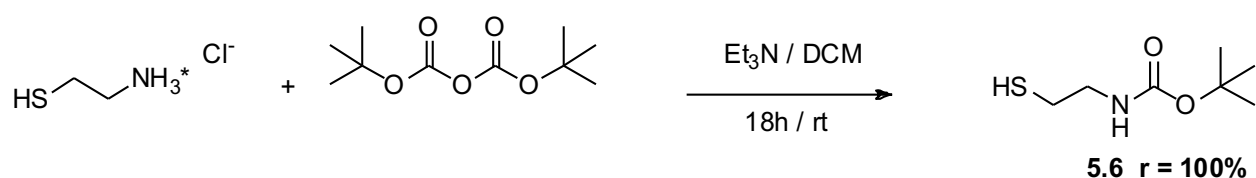


Figure 162 : Protection de la fonction amine du chlorhydrate de cystéamine

Le produit obtenu est par la suite engagé dans un couplage thiol-ène avec le phosphoramidate **5.5** en présence du photoinitiateur DMPA et sans utilisation de solvant (Figure 163).

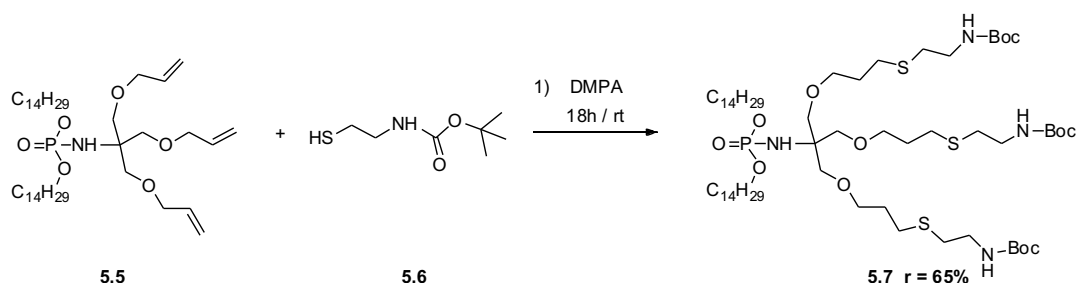


Figure 163 : Réaction thiol-ène entre le phosphoramidate **5.5** et le thiol **5.6**

Une transformation totale du produit est observée au bout de 4h comme l'illustre le spectre RMN ^1H sur la Figure 164.

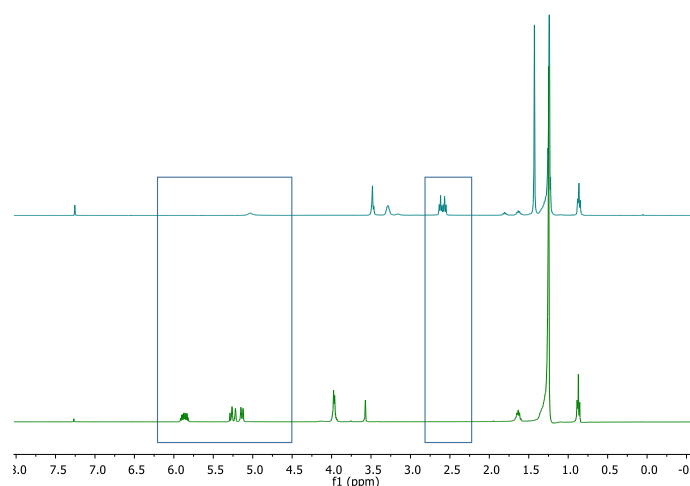


Figure 164 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du composé avant (en bas) et après réaction thiol-ène (en haut)

La déprotection des groupements Boc en présence de TFA (*Figure 165*) permet d'obtenir le lipide polycationique **BSV 200** avec un rendement global de 25% après 8 étapes de synthèse.

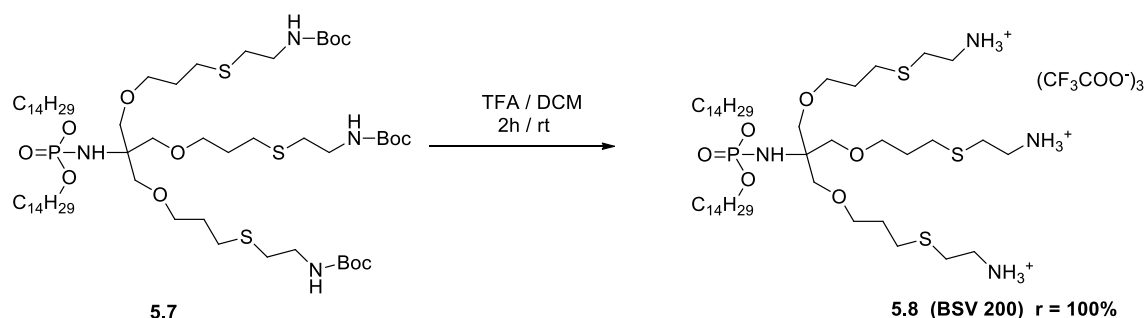


Figure 165 : Formation du composé **5.8 (BSV 200)** par déprotection des fonctions amines

Nous avons envisagé en deuxième lieu de synthétiser un co-lipide contenant une tête multipolaire en utilisant le même phosphoramidate (**5.5**) synthétisé précédemment.

Les co-lipides sont des molécules amphiphiles le plus souvent neutres, qui n'ont pas la capacité de compacter l'ADN par eux-mêmes, mais coformulés avec des lipides cationiques permettent d'améliorer considérablement leurs propriétés de transfection et de diminuer leurs toxicités¹⁹⁸. Le co-lipide le plus souvent utilisé pour la préparation des formulations par les différentes équipes de recherche est la DOPE. Cette molécule permet d'agir sur la nature de l'assemblage supramoléculaire des molécules amphiphiles en favorisant la formation de phase hexagonale inverse et facilitant l'échappement endosomale des molécules d'acides nucléiques.

Pour obtenir ce co-lipide nous avons réalisé un couplage thiol-ène entre le phosphoramidate (**5.5**) et le mercapto-éthanol par réaction thiol-ène (*Figure 166*). Le produit final est obtenu avec un rendement global de 35%.

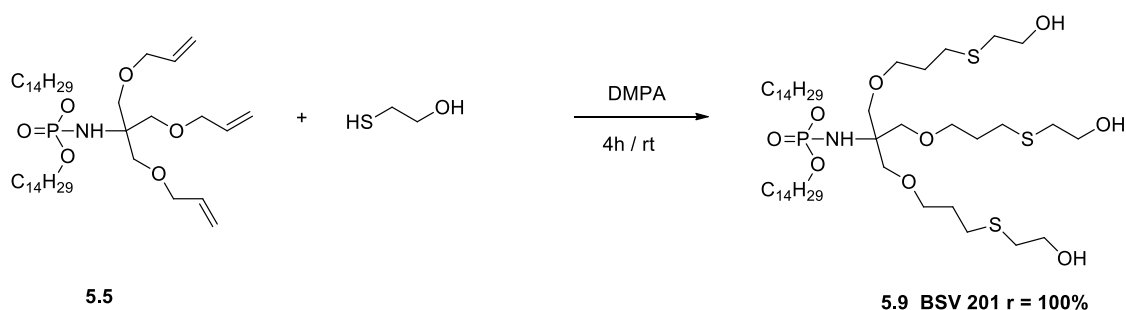


Figure 166: Synthèse du co-lipide **5.9 (BSV 201)** à partir du phosphoramidate **5.5**.

¹⁹⁸ S. Mochizuki, N. Kanegae, K. Nishina, Y. Kamikawa, K. Koiwai, H. Masunaga, K. Sakurai, *Biochimica Biophysica Acta* **2013**, 1828, 412–418.

III. Étude des propriétés physico-chimiques

1. Isothermes de compressions

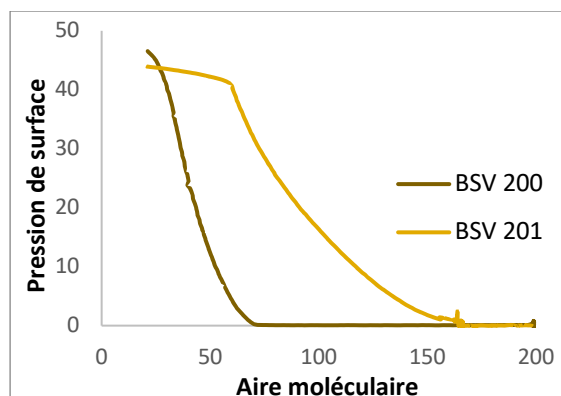


Figure 167: Isothermes de compressions des composés **BSV 200** et **BSV 201**

L'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire des nouveaux phosphoramides synthétisés a été étudiée par la technique d'isotherme de compression. Les résultats obtenus (*Figure 167*) montrent des comportements différents entre les composés **BSV 200** et **BSV 201**. En effet, les valeurs extraites de ces isothermes de compression (lift-off, surface moléculaire au collapse et pression au collapse –Tableau 30) montrent en particulier une mise en ordre importante du composé **BSV 200** sans pression latérale (faible valeur du lift-off) alors que le composé **BSV 201** nécessite une pression latérale pour une mise en ordre dès des surfaces de 150 Å/molécule.

Plusieurs hypothèses liées aux différences structurales entre ces deux molécules peuvent expliquer ces différences de comportement. Cependant, comme la partie hydrophobe est identique pour les deux composés, ces différences proviennent de la partie polaire de la molécule.

Dans le cas du composé **BSV 200** la molécule se caractérise par la présence d'une fonction phosphoramide et de 3 fonctions amines protonées. Le pH de la solution aqueuse étant compris entre 6,5 et 7,0, nous faisons l'hypothèse que ces trois fonctions amines restent protonées au cours de l'expérience. Pour le composé **BSV 201**, la tête hydrophile est nettement moins polaire car il n'existe que des fonctions alcools. Ces différences structurales nous laissent penser que le composé **BSV 200** est profondément immergé dans la partie aqueuse alors que pour le composé **BSV 201** seul les fonctions alcools et la fonction phosphoramide sont au contact de l'eau. Le composé **BSV 201** étant davantage en surface

(peu ou pas de volume immergé), il occupera une aire moléculaire plus importante conduisant à l'observation d'une surface au lift-off plus importante (près du double).

La seconde différence porte sur la surface moléculaire au collapse qui est de $24 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour **BSV 200** et $60 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour **BSV 201**. Là encore, puisque le composé **BSV 200** est plus profondément immergé que le composé **BSV 201**, son volume dans l'air est moins important conduisant assez logiquement à une surface moléculaire au collapse bien inférieur. De plus, il est probable que pour le composé **BSV 200** seul les deux chaînes lipidiques se trouvent dans l'air avec une orientation probablement orthogonale (ou proche de l'orthogonalité) à la surface aqueuse. Les chaînes lipidiques étant linéaires et saturées, elles peuvent adopter facilement des conformations « all-trans », qui expliquent également la faible surface moléculaire au collapse.

Enfin la dernière différence porte sur la pression au collapse qui est de 46 mN/m pour **BSV 200** et 42 mN/m pour **BSV 201**. Le film à l'interface est donc plus robuste dans le premier cas. En effet, le composé **BSV 201** étant moins polaire que le composé **BSV 200** il s'étale davantage à la surface conduisant à des interactions moins fortes entre les chaînes lipidiques pouvant alors expliquer une pression au collapse moins importante.

	Aire moléculaire au lift off $A_0^b \text{ \AA}^2/\text{molécule}$	Aire moléculaire au collapse $\text{\AA}^2/\text{molécule}$	Pression de surface au collapse mN/m
BSV 200	70 ± 1	24 ± 1	$46 \pm 0,25$
BSV 201	153 ± 3	60 ± 3	$41 \pm 0,35$

Tableau 30 : Données extraites des isothermes de compressions des composés **BSV 200** et **BSV 201**

L'ensemble de ces résultats d'isothermes de compression nous permettent de proposer un positionnement des composés **BSV 200** et **BSV 201** à l'interface eau-air comme indiqué sur la Figure 168.

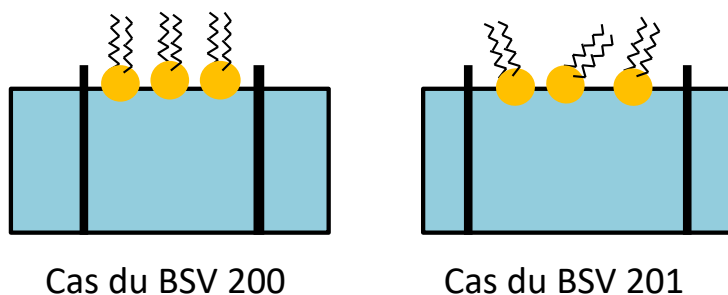


Figure 168 : Représentation schématique du positionnement des composés **BSV 200** et **BSV 201** à l'interface air / eau

2. Ellipsométrie

Les mesures ellipsométriques, enregistrées lors des isothermes de compression, nous conduisent à isoler une valeur de l'angle ellipsométrique au moment du lift-off (indiqué Delta min °) et une seconde valeur à la compression maximale avant le collapse (Delta max). Comme indiqué lors des chapitres précédents, l'angle ellipsométrique renseigne indirectement sur l'épaisseur de la couche organique à l'interface air / eau. Les résultats obtenus (*Tableau 31*) nous suggèrent que le composé **BSV 200** fait apparaître une épaisseur de film plus importante quel que soit la pression latérale. Cela pourrait paraître contradictoire avec les résultats des isothermes de compression qui nous indiquaient que la partie immergée était plus importante pour le composé **BSV 200** conduisant donc, a priori, à une épaisseur dans l'air moins importante. Néanmoins, nous avons émis l'hypothèse que le composé **BSV 200** du fait de son encrage plus marqué pouvait conduire à une orientation des chaînes lipidiques proche de l'orthogonalité par rapport à la surface et donc au final à une épaisseur plus importante. A l'inverse, à cause de sa faible polarité, le composé **BSV 201** s'étale à la surface de la cuve conduisant à la formation d'une monocouche moins épaisse.

	Delta min (°)	Delta max (°)	δ Delta (°)
BSV 200	4.2	9.4	5.2
BSV 201	3.2	8.5	5.3

Tableau 31 : Valeurs de l'angle éllipsométrique Delta

3. Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ^{31}P en milieu organisé

Les phosphoramides **BSV 201** et **BSV 200** synthétisés au cours de ce chapitre se caractérisent par le volume important occupé par la partie polaire. En se basant sur la théorie d'Israelachvili, la balance hydrophobe hydrophile joue un rôle important quant à la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire adoptée par les molécules amphiphiles. Avec ces deux molécules nous avons cherché à augmenter le volume de la partie polaire afin de favoriser la formation de phase hexagonale directe. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré le spectre RMN ^{31}P en milieu organisé du composé **BSV 200** en utilisant la séquence écho de Hahn (*Figure 169*). Le spectre fait apparaître un signal symétrique avec une très faible anisotropie de déplacement chimique qui ne correspond ni à la formation d'une phase lamellaire ni à l'obtention d'une phase hexagonale. En examinant les données de la littérature ce spectre pourrait correspondre à la formation d'une phase cubique¹⁹⁹. Cependant la RMN ^{31}P ne permet pas de confirmer cette possibilité. En effet une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'obtention d'un tel signal est la formation d'agrégats de petites tailles. Ces particules trop petites pourraient alors être suffisamment mobiles pour entraîner une diminution de l'anisotropie de déplacement du signal RMN obtenu²⁰⁰. Cette expérience n'est donc malheureusement pas concluante.

¹⁹⁹ A. V. Filippov, A. M. Khakimov, B. V. Munavirov, Annual Reports on NMR Spectroscopy, **2015**, 85, 27-92.

²⁰⁰ M. Traïkia, D. E. Warschawski, M. Recouvreur, J. Cartaud, P. F. Devaux, Eur Biophys J. **2000**, 29, 184-195.

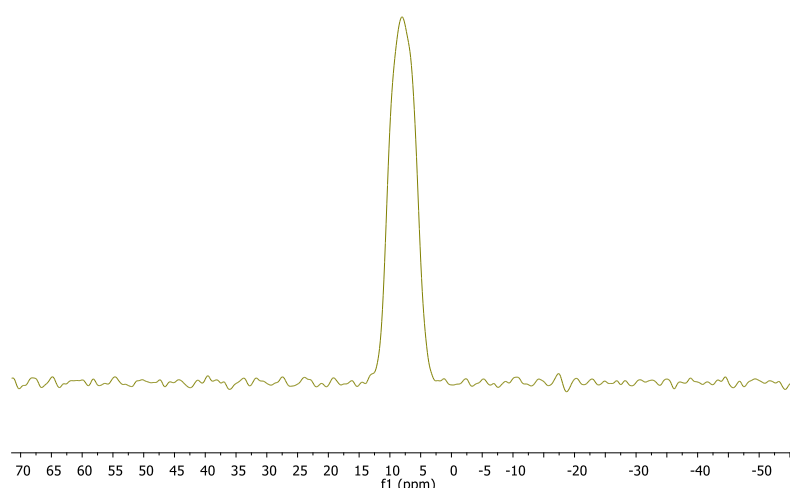


Figure 169 : Spectre RMN ^{31}P en milieu organisé dans l'eau (concentration 100 mg/mL) du composé **BSV 200** enregistré selon la séquence écho de Hahn.

IV. Évaluation des propriétés de transfections du composé BSV200

1. Détermination de la taille et du potentiel zêta des solutions liposomales

Dans le but d'étudier les propriétés de transfection des nouveaux phosphoramides multipolaires, une première étape consiste à formuler ces molécules en utilisant la méthode d'hydratation du film lipidique. Deux solutions liposomales sont préparées en utilisant le lipide poly-cationiques **BSV 200** seul et en co-formulation avec le co-lipide **BSV 201**. Une nuit d'hydratation à 4°C s'est avérée suffisante pour l'obtention de deux solutions homogènes. La taille et le potentiel zêta des solutions obtenues sont par la suite déterminés par la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les tailles mesurées pour les deux solutions (*Tableau 32*) sont assez semblables à d'autres formulations de notre laboratoire et avec des indices de poly-dispersités (Pdl) relativement faibles.

	Taille (nm)	Pdl	Zeta (mV)
BSV 200	293 ± 52	0.3	74 ± 4
BSV 200 / BSV 201 (1/1 en mole)	171 ± 12	0.3	32 ± 5

Tableau 32 : Valeurs de taille et du potentiels zêta des formulations préparées à base des vecteurs **BSV 200** et **BSV 201**

Comme attendu la solution liposomale formée à base du composé **BSV 200** affiche un potentiel zêta élevé dû à la présence de trois charges positives. L'ajout du co-lipide neutre **BSV 201** entraîne la diminution de cette valeur.

2. Étude des propriétés de transfection

La capacité des vecteurs synthétisés à vectoriser l'ADN est évaluée sur deux lignées cellulaires **SKMel 28** et **A549**. La lipoféctamine 2000 est choisie comme référence dans l'ensemble des tests réalisés pour cette étude. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure ci-dessous.

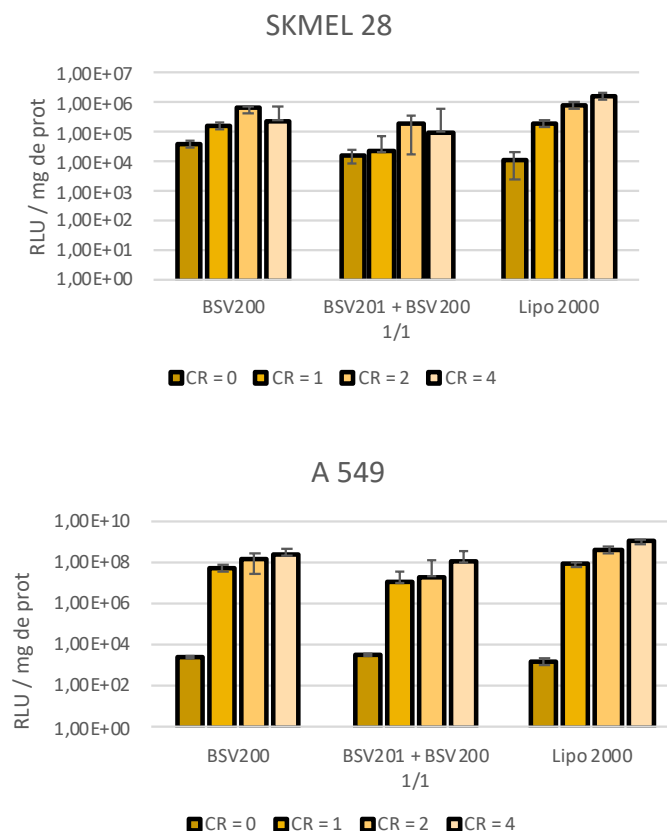


Figure 170: Efficacité de transfection des deux solutions liposomales formées par les composés **BSV 200** et **BSV 201** ; la Lipoféctamine 2000 est utilisée comme référence

Les résultats obtenus indiquent que formulé seul le composé polycationique **BSV 200** est aussi efficace que la Lipoféctamine sur les deux lignées cellulaires testées. En revanche, l'ajout du co-lipide **BSV 201** dans les formulations entraîne une légère diminution de l'efficacité de transfection en particulier sur la lignée **SKMel 28**.

3. Évaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire après transfection est évaluée par dosage par bioluminescence de l'adénylate kinase. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 171 : *Évaluation de la viabilité cellulaire des formulations sue les lignées A549.et SKMel28*

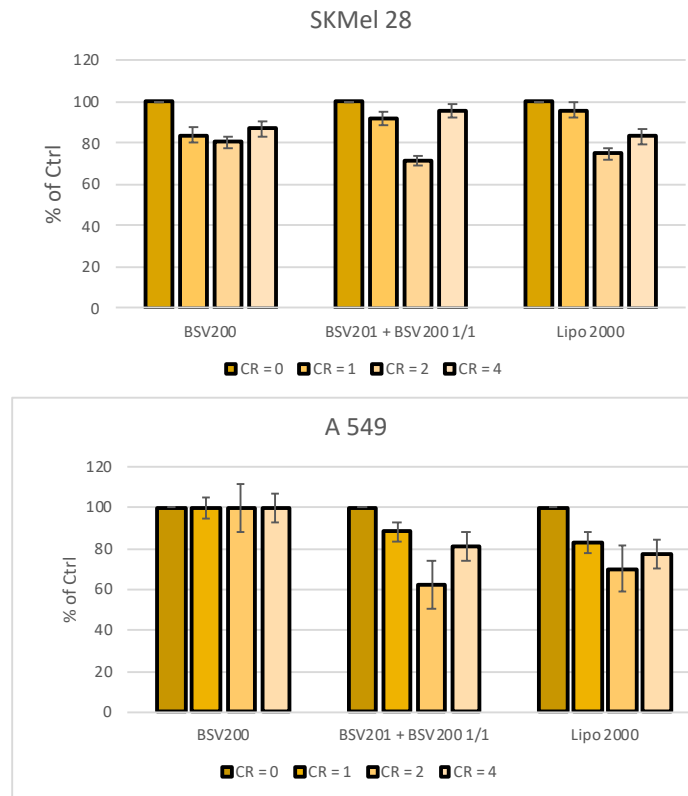


Figure 171 : Évaluation de la viabilité cellulaire des formulations sur les lignées **A549**.et **SKMel28**

Dans un premier temps, nous pouvons noter que la viabilité cellulaire reste supérieure à 80% sur les deux lignées cellulaires pour les formulations préparées à base du lipide cationique **BSV 200**. L'ajout de co-lipide **BSV 201** dans la formulation entraîne globalement une diminution de la viabilité cellulaire. Globalement la viabilité est acceptable (supérieure à 80%) puisqu'assez proche de la référence commerciale (Lipoféctamine).

Nous pouvons également remarquer que dans quelques cas la toxicité diminue en augmentant le charge ratio (CR=4). Ces résultats peuvent apparaître comme aberrant car normalement la toxicité augmente avec l'augmentation des CR. Ce comportement n'est observé que dans certains cas où CR = 4 (**Figure 171**). Nous pensons néanmoins que ces quelques résultats ne remettent pas globalement en cause tous les résultats qui indiquent que la formulation **BSV 200/BSV 201** n'est pas moins toxique que la formulation **BSV 200** seul

comme nous aurions pu nous attendre (dans la littérature certains co-lipide tout en permettant une amélioration des efficacités de transfection permettent aussi parfois une réduction de la toxicité).²⁰¹

- **Conclusion**

Dans cette première partie nous avons développé la synthèse d'une nouvelle famille de lipide multipolaires à base de réaction click thiol-ène. L'objectif étant d'augmenter le volume occupé par la partie polaire de ces amphiphiles afin de favoriser la formation d'auto-assemblage de type hexagonale direct. Le composé **BSV 200** formulé seul fait apparaître des résultats de transfection satisfaisant sur deux lignées cellulaires et cela avec une cytotoxicité associée tout à fait acceptable au regard du comparatif avec la référence commerciale Lipoféctamine. Concernant les propriétés physico-chimiques nous n'avons pas pu mettre en évidence le type de phase formé qui, par RMN ³¹P en milieu organisé, n'apparaît ni lamellaire ni hexagonal. La caractérisation par isothermes de compression et ellipsométrie nous indique que le composé ionique (**BSV 200**) est plus profondément ancré dans la phase aqueuse conduisant à un assemblage beaucoup plus compact et plus robuste lorsque la pression latérale augmente.

V. Synthèse de lipides cationiques à tête polaire volumineuse par ramification des chaînes lipidiques (stratégie B)

Pour poursuivre ce projet visant à la conception de composés amphiphiles pouvant s'organiser en phase non lamellaire, nous avons envisagé une nouvelle stratégie de synthèse. L'idée consiste à synthétiser un phosphoramidate comportant une double liaison dans les chaînes lipidiques mais localisée à proximité de la partie polaire. Le but est d'utiliser celle-ci comme point d'accroche, pour introduire des fonctions polaires par l'intermédiaire de réaction thiol-ène. Ces groupements polaires pourraient s'associer avec la tête triméthylammonium déjà existante contribuant ainsi à augmenter considérablement le volume de la partie polaire (*Figure 172*).

²⁰¹ U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, *Pharmaceutics*, **2017**, 9, 12-45.

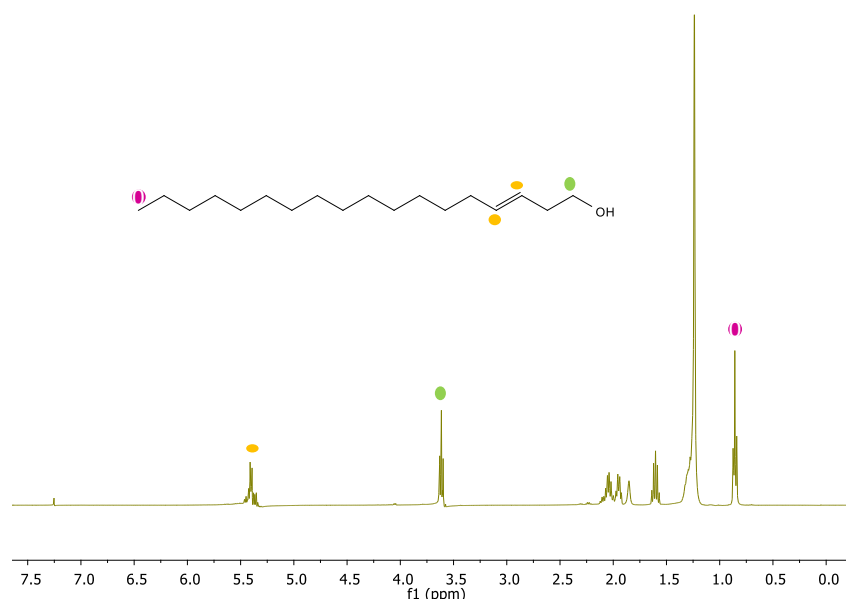


Figure 174 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) de l'alcool **5.10** après chromatographie

2. Synthèse du phosphoramide cationique

La synthèse du phosphoramide cationique à partir de l'alcool **5.10** précédemment synthétisé suit le même mode opératoire que pour les composés précédemment décrit au cours de ce manuscrit et abouti au composé (**5.13**) souhaité en 3 étapes (*Figure 175*).

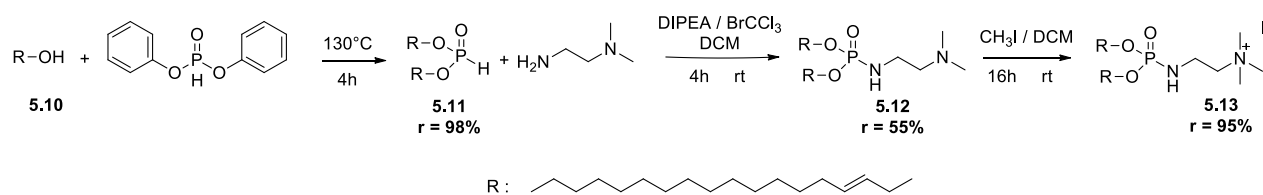


Figure 175 : Synthèse du phosphoramide **5.13**

L'alcool obtenu lors de la première étape réagit avec le diphenyle phosphite pour obtenir le dialkyl phosphite **5.11**. Ce dernier est par la suite engagé en un couplage Atherton Todd avec le *N,N*-diméthyléthylènediamine en présence de DIPEA et BrCCl_3 . Une chromatographie sur gel de silice permet l'obtention du phosphoramide **5.12** avec un rendement de 55%.

La quaternarisation s'effectue en ajoutant un excès d'iodométhane à une solution du composé **5.12** dissout dans le dichlorométhane. Le phosphoramide cationique **5.13** est obtenu finalement après évaporation du solvant avec un rendement de 95%. La *Figure 176* montre le spectre RMN ^1H du composé **5.13**.

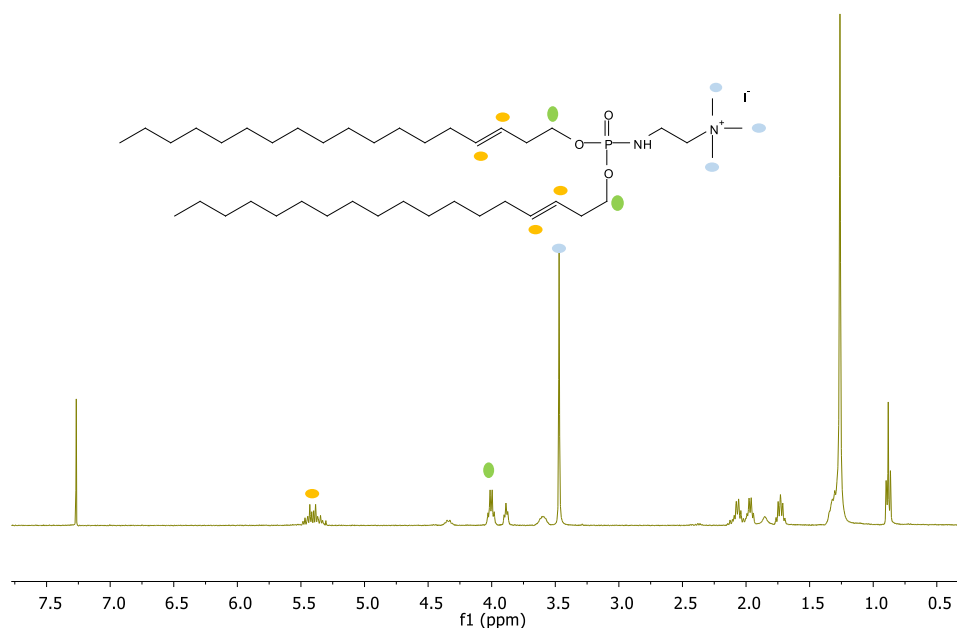


Figure 176 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du phosphoramide cationique **5.13**

3. Réaction thiol-ène

La dernière étape de synthèse est une réaction click thiol-ène entre le phosphoramide cationique **5.13** obtenu précédemment et le mercapto-hexanol (*Figure 177*). Le mélange est placé sous irradiations UV en présence du photo initiateur DMPA. Le produit final est obtenu après chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 25%.

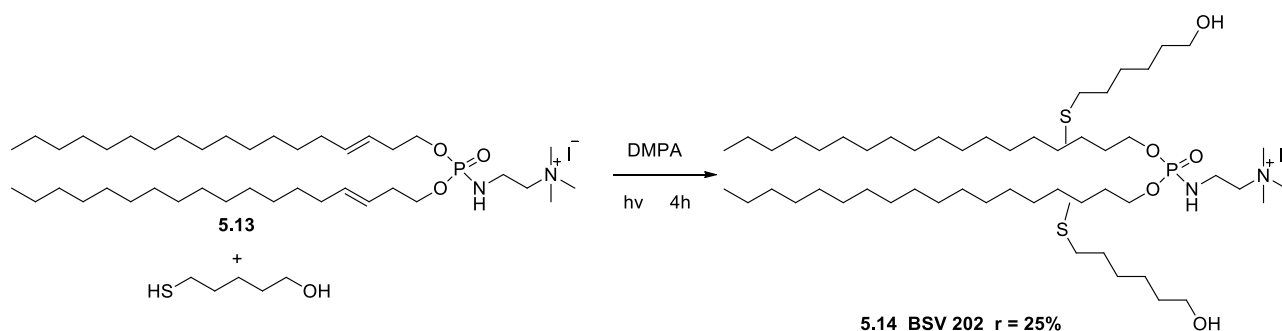


Figure 177 : Réaction thiol-ène entre le phosphoramide **5.13** et le mercapto-hexagonal pour l'obtention du composé **BSV 202 (5.14)**

Finalement le composé **BSV 202** (spectre RMN ^1H présenté sur la *Figure 178*) est obtenu avec un rendement global de 10% après cinq étapes de synthèse. La masse obtenue est de 90 mg.

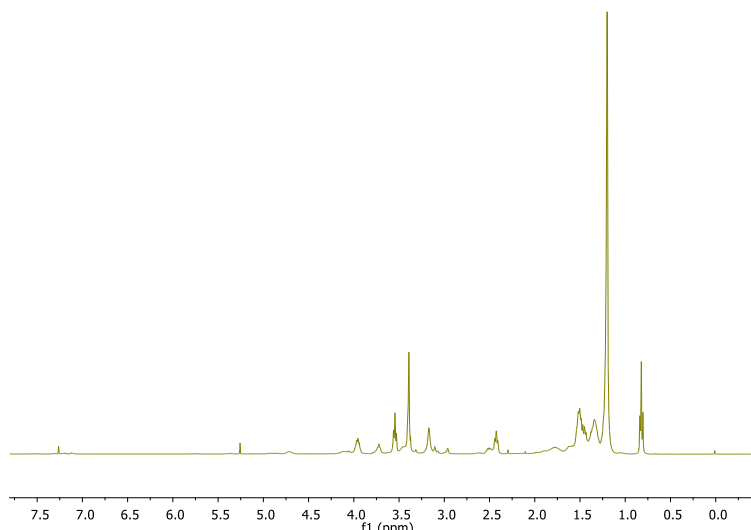


Figure 178 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du composé **BSV 202**

4. Détermination de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire par RMN ^{31}P en milieu organisé

Afin de déterminer le type d'arrangement supramoléculaire nous avons, ici aussi, tiré profit de la présence d'un atome de phosphore dans la structure moléculaire du composé **BSV 202** qui sert de sonde pour évaluer la mobilité des molécules au sein d'un assemblage supramoléculaire. Nous avons donc enregistré le spectre RMN ^{31}P (séquence écho de Hahn) en milieu aqueux et concentré (100 mg/mL). Le résultat est représenté sur la figure ci-dessous.

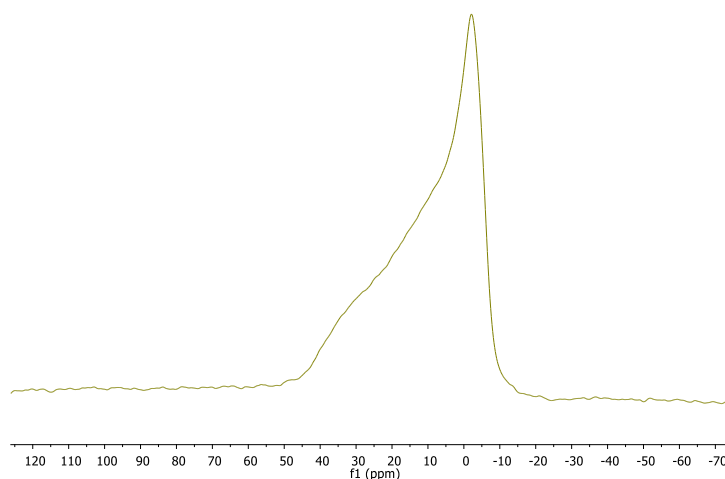


Figure 179 : Spectre RMN ^{31}P en milieu aqueux (100 mg/mL) du composé **BSV 202**

Le spectre obtenu montre que le composé **BSV 202** se caractérise par un signal dissymétrique avec un épaulement du côté gauche et avec une forte anisotropie de déplacement chimique

estimée à 50 ppm. Ces deux caractéristiques suggèrent que le phosphoramidate ici formé s'auto-assemble, dans les conditions de l'enregistrement, en phase lamellaire.

Une hypothèse qui pourrait permettre d'expliquer ce résultat est que l'introduction des deux fonctions alcool dans le composé **BSV 202** n'est pas suffisante pour entraîner des modifications structurales pour que l'amphiphile adopte une phase non-lamellaire. Deux raisons peuvent être alors évoquées : 1- la fonction alcool est petite en taille et ne modifie pas suffisamment la géométrie de l'amphiphile qui, en appliquant les concepts géométriques d'Israelachvili, conserve une forme conique. La seconde hypothèse est que la fonction alcool n'est pas suffisamment polaire. De ce fait, un équilibre est possible entre une localisation des fonctions alcools proche du cation ammonium (forme A, *Figure 180*) ou à l'inverse une conformation conduisant à un alignement avec la chaîne lipidique (forme B, *Figure 180*).

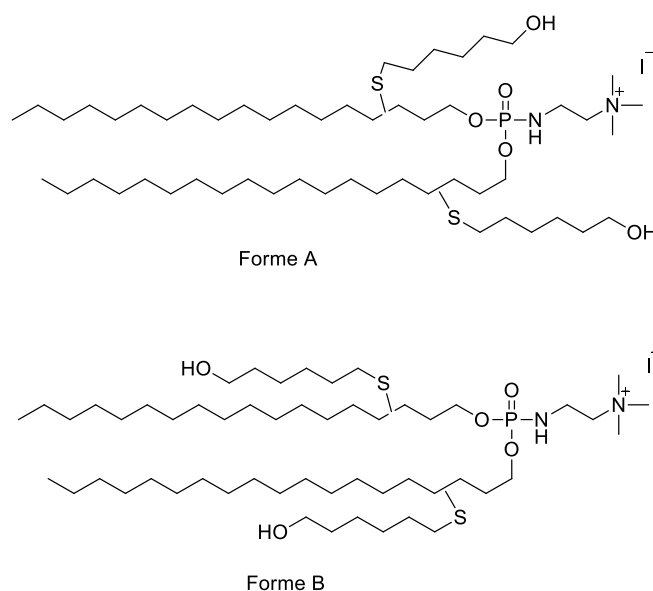


Figure 180 : Conformation possible du composé **BSV 202**

En termes de perspective, afin de limiter les interactions de van der Waals pouvant conduire à l'alignement de l'espaceur avec la chaîne lipidique une idée serait de raccourcir la longueur de la chaîne alkyle du thiol utilisé. La seconde option serait de remplacer la fonction alcool par une fonction ou groupe plus volumineux et plus polaire (fonction ammonium par exemple).

- **Conclusion**

Au cours de cette deuxième partie, nous avons décrit la synthèse d'un nouveau lipide cationique ramifié (**BSV 202**) portant trois fonctions polaires.

Le spectre RMN ³¹P obtenu indique la formation d'une phase lamellaire et non une phase hexagonale directe. Nous pouvons formuler l'hypothèse que les fonctions alcools introduites par réaction thiol-ene présentes ne modifient pas suffisamment la géométrie du composé. Le remplacement de la fonction alcool par un groupe plus volumineux et plus polaire constitue une perspective à ce travail.

D'autre part, la masse obtenue de ce composé (90 mg) n'a pas permis de réaliser d'autres études pour déterminer ses propriétés physico-chimiques et de transfection.

VI. Synthèse de bola-amphiphiles

Les molécules amphiphiles multipolaires de type bola-amphiphiles ou bolaforme se caractérisent par la présence de plusieurs fonctions polaires espacées par un domaine hydrophobe.

Les bola-amphiphiles sont naturellement présents dans les membranes de certaines familles d'archaebactéries. En effet, leur structure originale confère une stabilité importante à la membrane de ces bactéries leurs permettant ainsi de survivre dans des conditions hostiles (chaleur, milieu acide, milieu anaérobique).

L'ensemble de ces propriétés a incité plusieurs équipes à utiliser les bola-amphiphiles comme agent de vectorisation d'acides nucléiques ADN ²⁰³ ou si-ARN ²⁰⁴.

Une classe originale de molécules bola-formes à têtes polaires dissymétriques a aussi intéressé plusieurs chercheurs. En effet, la présence de partie hydrophile de nature différentes donne à ces molécules une double fonctionnalité. Une première partie polaire cationique assurant l'interaction avec l'acide nucléiques (ADN ou ARN), tandis que la deuxième tête polaire peut servir comme agent de ciblage ou permet d'avoir un effet tampon (éponge à protons favorisant la sortie de l'endosome) ²⁰⁵. Ce type de structures bolaformes ont aussi des propriétés d'auto-assemblage spécifiques ²⁰⁶. Néanmoins, leurs synthèses restent le plus souvent complexe. Il y a donc un intérêt à proposer des voies d'accès simples qui puissent aussi permettre de disposer de quantités suffisantes pour des caractérisations physico-chimiques ultérieures.

²⁰³ N. Jain, Y. Arntz, V. Goldschmidt, G. Duportail, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2110–2118

²⁰⁴ A. C. Eldredge, M. E. Johnson, N. J. Oldenhuis, Z. Guan, *Biomacromolecules*, **2016**, *17*, 3138–3144.

²⁰⁵ Z. Huang, D. M. Zhao, X. Deng, J. Zhang, Y. Zhang, X. Q. Yu, *Nanomaterials*, **2018**, *8*, 115-133.

²⁰⁶ M. Fariya, A. Jain, V. Dhawan, S. Shah, M. S. Nagarsenker, *Adv Pharm Bull*, **2015**, *4*, 483-491.

En se basant sur les données de la littérature, nous avons fait le choix de synthétiser un nouveau phosphoramidate bola-forme comportant deux domaines hydrophobes fonctionnalisés en bout de chaîne de façon dissymétrique : d'un côté une fonction diméthylamine protonable pouvant assurer l'interaction avec les molécules d'ADN ou ARN et de l'autre des fonctions imidazole assurant un effet tampon pour faciliter l'échappement endosomal des séquences d'acides nucléiques transportées.

Pour atteindre cet objectif, l'idée est de réaliser un couplage thiol-ène entre un phosphoramidate comportant une double liaison en position terminale de chaque chaîne grasse et un thiol comportant un motif imidazole (*Figure 181*).

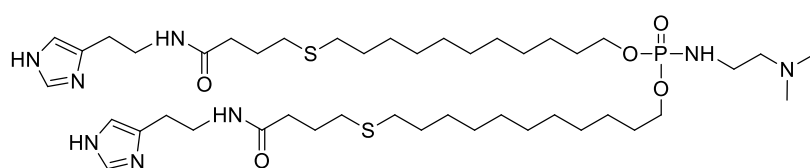


Figure 181 : Structure du bola-amphiphile **BSV 203**

La première étape de synthèse du bola amphiphile **BSV 203** est la préparation du thiol **5.15** selon la méthode de Lundberg et al²⁰⁷. La réaction met en jeu le γ -thiobutyrolactone et l'histamine dans l'acétonitrile (*Figure 182*). Le mélange est chauffé à reflux pendant 18h. La formation du produit peut être observée avec l'apparition d'un solide jaune. Ce dernier est par la suite filtré puis séché pour obtenir le thiol final avec un rendement de 98%.

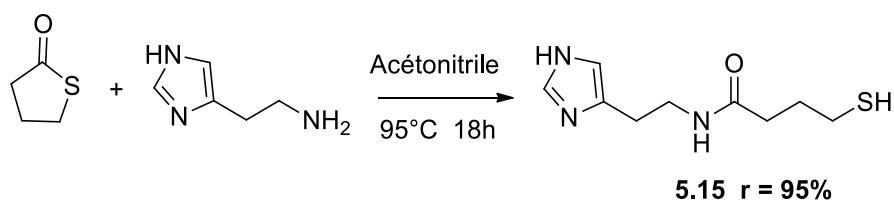


Figure 182 : Synthèse du thiol **5.15**

La seconde et dernière étape de synthèse du composé **BSV 203** est une réaction thiol-ène entre le phosphoramidate **2.2.b** synthétisé au cours du deuxième chapitre et le thiol synthétisé précédemment (*Figure 183*). Le mélange est irradié pendant la nuit sous UV puis une chromatographie sur gel de silice permet l'obtention de la molécule finale avec un rendement de 40 %.

²⁰⁷ P. Lundberg, N. A. Lynda, Y. Zhang, X. Zeng, D. V. Krogstad, T. Paffen, M. Malkoch, A. M. Nyström, C. J. Hawker, *Soft Matter*, **2013**, 9, 82-89.

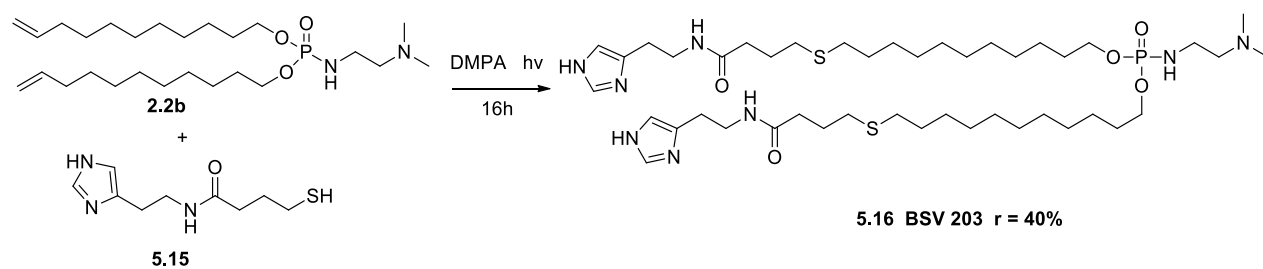


Figure 183 : Synthèse du bola-amphiphile **BSV 203** par réaction click thiol-ène

Le bola amphiphile (**BSV 203**) est finalement obtenu avec un rendement global de 25 %.

1. Préparation de solutions liposomales

Afin d'étudier les propriétés de transfection du lipide **BSV 203** deux types de formulation sont préparés. Une première à base du phosphoramidate **KLN 25** choisi comme référence pour cette étude. Il s'agit d'un lipide cationique formée de deux chaînes insaturées (oléyles) et une tête polaire méthyl imidazole. Ce composé a montré une bonne efficacité pour la vectorisation des molécules d'ARN lors d'une étude précédente réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Patrick Midoux²⁰⁸. La deuxième formulation est préparée à base d'un mélange équimolaire **KLN 25** / **BSV 203**. Les deux solutions liposomales sont préparées dans l'HEPES et en suivant la méthode d'hydratation de film lipidique.

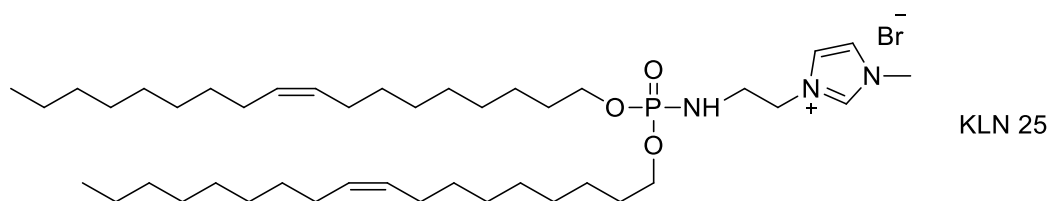


Figure 184: Structure du composé **KLN 25**

La mesure de la taille et du potentiel zêta des agrégats formés est effectuée après une nuit d'hydratation dans le tampon à 4°C. Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau 4.

	Taille (nm)	Pdl	Zeta (mV)
KLN 25	107 ± 54	0,2	+ 54 ± 8
BSV 203/ KLN 25	188 ± 82	0,2	+ 49 ± 7

Tableau 33 : Taille et potentiel zêta des formulation préparées à base du composé **BSV 203**

²⁰⁸ C. Gonçalves, M. Berchel, M. P. Gosselin, V. Malard, H. Cheradame, P. A. Jaffrès, P. Guégan, , C. Pichon, P. Midoux, Int J Pharm. **2014**, 460, 264-272

Le taille des liposomes obtenus pour les deux formulations sont satisfaisantes. Les valeurs mesurées de l'indice de polydispersité indiquent une bonne homogénéité des solutions liposomales et le potentiel zêta est positif pour les deux cas assurant une bonne stabilité colloïdale des formulations.

2. Évaluation de l'efficacité de transfection

La capacité des deux formulations préalablement préparées à vectoriser les molécules de si-ARN a été déterminé par l'équipe du Dr. Patrick Midoux.

La technique utilisée consiste à mesurer la capacité des molécules de si-ARN à bloquer la synthèse de la protéine fluorescente EGFP dans les cellules HeLa-EGFP. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure ci-dessous.

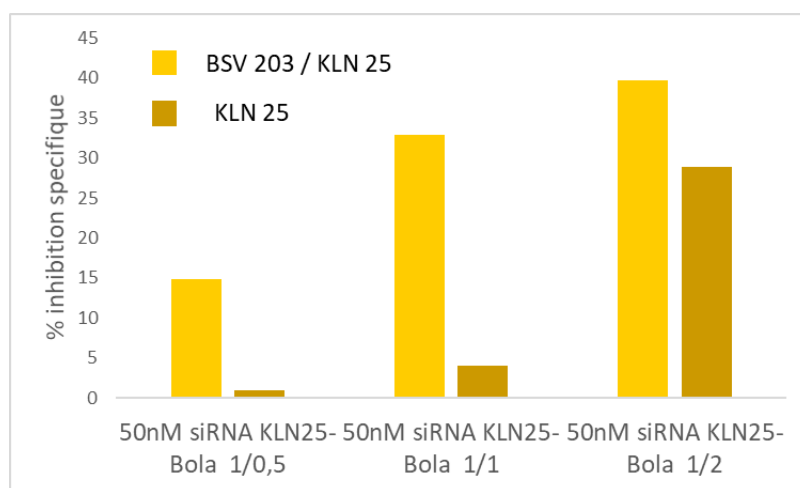


Figure 185 : Évaluation de l'efficacité de transfection des formulations à base de **KLN 25** et **BSV 203/ KLN 25**

En examinant la figure, il est possible de constater que l'ajout du composé **BSV 203** au formulation à base du phosphoramidite **KLN 25** permet d'améliorer significativement ses propriétés de transfections et ce sur les différents rapports de charge testés.

Cet effet peut être attribuer au pouvoir tampon des deux noyaux imidazoles présents dans la structure du composé **BSV 203** qui permettent de faciliter l'échappement endosomale des molécules de si-ARN. Des études complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

VII. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous nous sommes intéressés à la synthèse de molécules amphiphiles multipolaires. Trois stratégies de synthèse ont été adoptées.

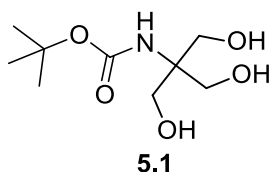
Lors de la première partie, nous avons réussi à synthétiser deux nouveaux phosphoramides formés par une tête polaire dendritiques (cationique ou neutre). Les études physico-chimiques par isotherme de compression et ellipsométrie ont indiqué que la différence de polarité entre les fonctions ammoniums (**BSV 200**) et les fonctions alcools (**BSV 201**) sont les causes principales de la différence de comportement de ces deux molécules à l'interface air / eau. Le spectre RMN ^{31}P en milieu organisé de **BSV 200** n'a pas permis de déterminer la nature de l'auto-assemblage formé. Des études par SAXS pourrait alors être envisagées afin de répondre à cette question.

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à la synthèse d'un nouveau phosphoramide cationique multipolaire en introduisant des ramifications portant des fonctions polaires sur les chaînes hydrophobes de la molécule. Le spectre RMN ^{31}P en milieu organisé a permis dans ce cas de confirmer la nature lamellaire de l'auto-assemblage supramoléculaire formé. Cependant la faible quantité de produit obtenu n'a pas permis d'étudier son efficacité pour la vectorisation d'acide nucléique.

Finalement, la dernière partie développée dans ce chapitre a été consacrée à la synthèse d'un amphiphile bolaforme comportant deux motifs imidazoles. L'objectif étant de tirer profit de l'aspect éponge à protons de ces deux fonctions pour améliorer l'efficacité de transfection (Si-ARN) du lipide cationique **KLN 25**. Les résultats de transfection ont montré que les formulations à base des composé **BSV 203/KLN 25** sont nettement plus efficaces que les formulations à bases du lipide **KLN 25** seul et ce pour tous les rapports de charge testés.

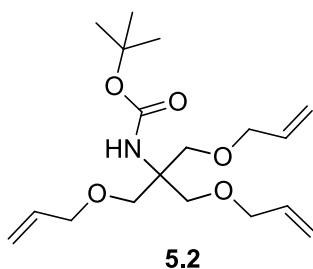
En terme de perspective il serait intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques de composé amphiphile et en particulier de déterminer la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire formé par ce type de composés amphiphiles.

VIII. Partie expérimentale



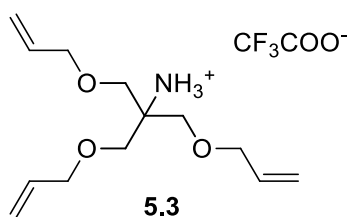
Synthesis of compound 5.1: to a suspension of amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride (5.0 g / 31.7 mmol) in a 1:1 mixture of MeOH/ t-BuOH (30 mL) was added a solution of di-tert-butyl dicarbonate (1.3 eq) in t-BuOH (15 mL). The solution was stirred for 72 h at room temperature (rt°). The solvents were then removed under reduced pressure to give a white residue which was purified by precipitation using cold EtOAc. The final compound was obtained after vacuum filtration as a white solid.

(Yield 97%, 6.8 g): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.30 (s, 9 H), 3.52 (s, 6 H).



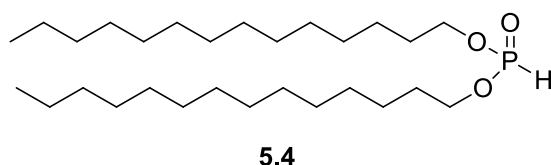
Synthesis of compound 5.2: A solution of **5.1** (5.0 g, 22,6 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was stirred at rt with allyl bromide (6 eq). Portions of finely ground KOH (6 eq) were slowly added and the mixture was further stirred at rt for 18 h. The solvent was then evaporated, and the residue was dissolved in 30 mL CH_2Cl_2 then washed with water then brine, dried over Na_2SO_4 . The solvent was then removed under reduced pressure. The crude product was purified using flash chromatography (Hex/AcOEt: 9/1) to give a colorless oil.

(Yield 85%, 6.5 g): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.34 (s, 9 H), 3.62 (s, 6 H), 3.90-3.92 (d, J = 6.0 Hz, 6H), 5.07-5.20 (m, 6H), 5.76-5.85 (m, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 27.2 (CH_3 -Boc), 37.9 (CH-NH), 68.5 (CH_2 -O), 72.0 (CH_2 -O), 116.17 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 134.23 ($\text{CH}_2=\text{CH}$).



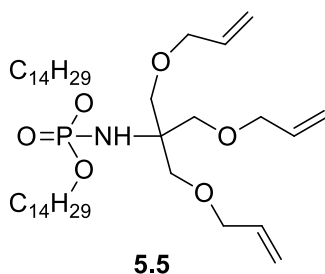
Synthesis of compound 5.3: Compound **5.2** (4.0 g, 11.7 mmol) was dissolved in 10 mL DCM then 5 mL of TFA was added and the mixture was stirred for 4h at rt. The solvent was then removed under reduced pressure. The residue was partitioned between AcOEt and Na₂CO₃ 5%. The solvent was finally removed under reduced pressure to give the product as a yellowish oil.

(Yield 97%, 2,8 g): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 3.46 (s, 6 H), 3.90-3.92 (d, J = 6.0 Hz, 6H), 5.07-5.20 (m, 6H), 5.50 (m, NH), 5.76-5.85 (m, 3H). ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ= 68.5 (CH₂-O), 72.0 (CH₂-O), 114.2 (CH₂=CH), 134.92 (CH₂=CH).



Synthesis of compound 5.4: Tetradecan-1-ol (4.0 g, 16.5 mmol) and diphenyl phosphite (0.5 eq) were combined and treated by Kugelroch distillation under reduced pressure (4. 10⁻² mbar) for 3 h at 120°C to remove phenol. The expected product, that doesn't distill, was obtained as a white solid.

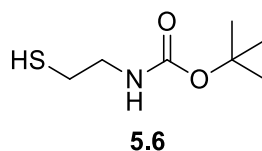
(Yield 100%, 4.0 g): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.87 (t, j = 6.6 Hz, 6H), 1.25 (m, 48H), 1.63-1.70 (m, 4H), 4.03-4.12 (m, 4H), 5.93 (d, J = 699.8 Hz). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 8.3.



Synthesis of compound 5.5: To a solution of compound **5.4** (2.2 g, 8.3 mmol) in 20 mL CH₂Cl₂ was added *compound 5.3* (1.1 eq) dissolved in 10 mL DCM, DIPEA (3.5 eq) and BrCCl₃ (3.5 eq) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 1.30 h. at rt. The solvent was

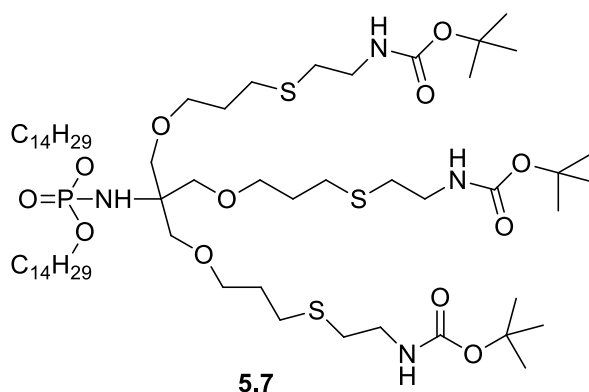
evaporated and 30 mL of diethylether were added and the mixture was stirred for 5 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂, washed with water, dried over MgSO₄ filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using CH₂Cl₂/MeOH: 9/1 as eluant to produce a pale-yellow oil.

(Yield 50%, 2.9 g): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.87 (t, j = 6.6 Hz, 6H), 1.24 (m, 48H), 1.61-1.65 (m, 4H), 3.57 (s, 6H), 4.03-4.12 (m, 10H), 5.12-5.28 (m, 6H), 5.81-5.90 (m, 3H). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ= 7,5. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ= 13.5 (CH₃), 22.1- 31.1 (CH₂ fatty chain), 65,2 (C-NH), 68.5 (CH₂-O), 70.0 (CH₂-O), 71.6 (CH₂-O-P), 116.1 (CH₂=CH), 134.3 (CH₂=CH).



Synthesis of compound 5.6: To a solution of cysteamine hydrochloride (2.5 g, 22.1 mmol) in DCM was added Et₃N (1 eq) and the mixture was stirred for 10 min at rt. A solution of di-tert-butyl dicarbonate (1.1 eq) in DCM was then added dropwise and the solution was stirred overnight at rt. The solution was the washed twice with K₂CO₃ (30 mL) then water (30 mL). The solvent was then removed under reduced pressure to give the desired product as a pale pink liquid.

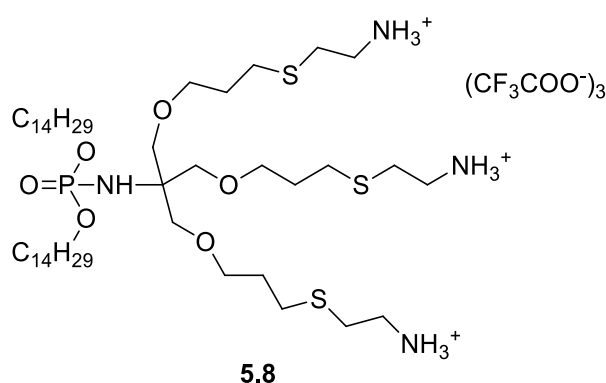
(Yield 100 %, 3.9 g): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.34 (s, 9H), 2.52-2.54 (m, 2H), 3.18-3.19 (m, 2H).



Synthesis of compound 5.7: A mixture of compound 5.5 (1.0 g, 1.40 mmol) and compound 5.6 (4 eq) were placed in a schlenk tube and degassed for 10 minutes, then DMPA (0.1 eq)

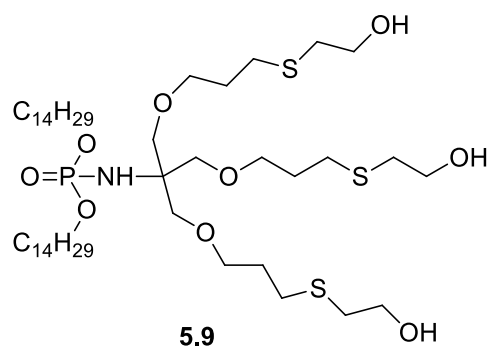
was added and the solution was placed under UV lamps (365 nm) overnight. The crude product was afterward purified using flash chromatography (Hex / AcOEt: 9/1) to give the desired compound as a pale-yellow oil.

(Yield 65%, 1,1 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.22 (m, 48H), 1.41 (s, 27H), 1.61-1.63 (m, 4H), 1.75-1.80 (m, 4H), 2.55 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 2.60 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 3.26 (m, 1H), 3.28 (m, 6H), 3.43-3.39 (m, 10H), 4.01-4.08 (m, 4H), $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 7.6. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.6 (CH_3), 25.2 (CH_3), 27.9- 31.1 (CH_2 fatty chain, $\text{CH}_2\text{-S}$), 39.9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 65.2 (C-NH), 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 70.0 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 71.6 ($\text{CH}_2\text{-O-P}$).



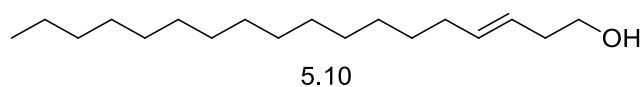
Synthesis of compound 5.8: TFA (3 mL) was added to compound **5.7** (1.0 g, 0.8 mmol) in DCM and the mixture was stirred for 2h at rt. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was dissolved in AcOEt (5 mL) then washed twice with water. The solvent was finally removed to give the desired product as a brown wax.

(Yield 100%, 1,1 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.25 (m, 48H), 1.65-1.67 (m, 4H), 1.79-1.82 (m, 4H), 2.55 (m, 6H), 2.88 (t, J = 5.6 Hz, 6H), 3.26 (m, 6H), 3.43-3.50 (m, 12H), 3.99-4.02 (m, 4H), 7.37 (m, 9H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 7,7. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.6 (CH_3), 27.9- 31.1 (CH_2 fatty chain, $\text{CH}_2\text{-S}$), 39.9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 70.0 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 71.6 ($\text{CH}_2\text{-O-P}$).



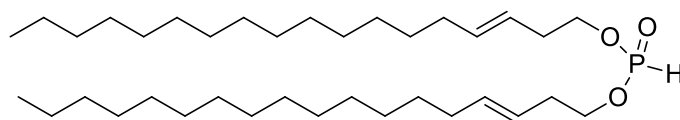
Synthesis of compound 5.9: A mixture of compound **5.5** (1g, 1,40 mmol) and mercaptoethanol (6 eq) were placed in a schlenck tube and degassed for 10 minutes, then DMPA (0.1 eq) was added and the solution was placed under UV lamps (365 nm) for 4h. The crude product was then dissolved in Hex and washed multiple times with water to give the final compound as a colorless oil.

(Yield 100%, 1,1 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1,18 (m, 48H), 1,61-1.63 (m, 4H), 1.78-1.83 (m, 4H), 2.58 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 2.67 (t, J = 6.2 Hz, 6H), 2.82 (m, 3H), 3.26 (m, 1H), 3.41-3.49 (m, 12H). 3.66-3.70 (m, 6H), 3.91-3.94 (m, 4H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 7,6. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.6 (CH_3), 22.9- 30.9 (CH_2 fatty chain, $\text{CH}_2\text{-S}$), 60.2 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 68.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 70.0 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 71.6 ($\text{CH}_2\text{-O-P}$).



Synthesis of compound 5.10: Buten-1-ol (2.0 g, 28.0 mmol) and hexadecene (3 eq) were both dissolved in DCM and the mixture was degassed for 10 minutes. 2nd generation Grubbs catalyst (0.02 eq) was then added and the solution was refluxed overnight. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was purigied using flash chromatography (Hex/AcOEt 9/1) to give the desired alcohol as a white solid.

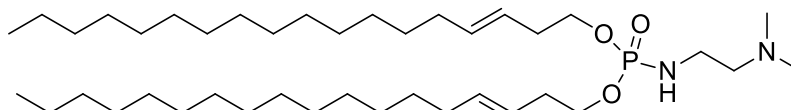
(Yield 51%, 3.9 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.23 (m, 22H), 1.58-1.62 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.93-1.95 (m, 2H), 2.01-2.05 (m, 2H), 3.62 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 5.35-5.42 (m, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.5 (CH_3), 22.1- 32.0 (CH_2 fatty chain), 61.9 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 128.3 ($\text{CH}=\text{CH}$), 128.8 ($\text{CH}=\text{CH}$), 130,2 ($\text{CH}=\text{CH}$), 130,7 ($\text{CH}=\text{CH}$).



5.11

Synthesis of compound 5.11: Compound **5.10** (2.0 g, 7.4 mmol) and diphenyl phosphite (0,5 eq) were combined and treated by Kugelrohr distillation under reduced pressure (4. 10^{-2} mbar) for 3 h at 120°C to remove phenol. The expected product, that doesn't distill, was obtained as a white solid.

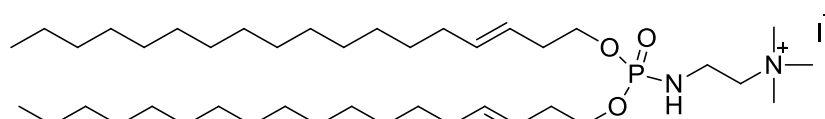
(Yield 98%, 2.0 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.22 (m, 44H), 1.69-1.72 (m, 4H), 1.91-1.94 (m, 4H), 2.02-2.12 (m, 4H), 4.00-4.05 (m, 4H), 5.28-5.43 (m, 4H). 5.89 (1H, J = 692.8, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 8.4. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.5 (CH_3), 22.1- 33.3 (CH_2 fatty chain), 64.5 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 127.3 (CH=CH), 127.6 (CH=CH), 131.0 (CH=CH), 133.0 (CH=CH).



5.12

Synthesis of compound 5.12: Compound **5.11** (1.0 g, 1.8 mmol) was dissolved in 10 mL DCM then N, N dimethyl ethylene diamine (1.1 eq), DIPEA (1.1 eq) and BrCCl_3 (1.1 eq) were added at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 1.30 h. at rt. The solvent was evaporated, and 20 mL of diethyl ether were added, and the mixture was stirred for 5 min. then filtered, and the solvent evaporated. The residue was dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 , washed with water, dried over MgSO_4 filtered and concentrated. The compound was purified by silica gel chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1 as eluant to produce a white solid.

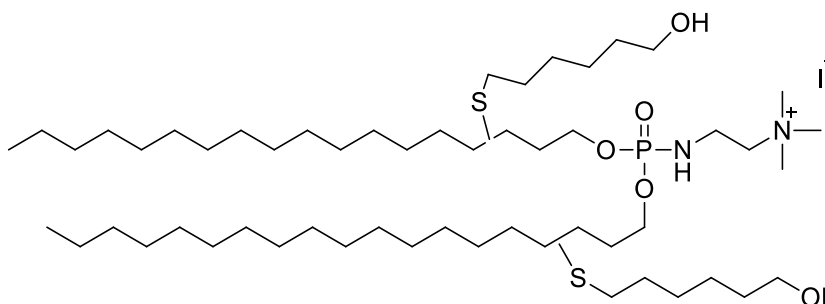
(Yield 55%, 0.6 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.27 (m, 44H), 1.69-1.72 (m, 4H), 1.97-1.99 (m, 4H), 2.02-2.14 (m, 4H), 2.22 (s, 6H), 2.95 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.33-3.36 (m, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.93-3.97 (m, 4H), 5.30-5.43 (m, 4H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 10.2. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.5 (CH_3), 22.1- 32.0 (CH_2 fatty chain), 38.0 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 44.4 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 59,2 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 65.2 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 127.3 (CH=CH), 127.6 (CH=CH), 131.0 (CH=CH), 133.0 (CH=CH).



5.13

Synthesis of compound 5.13: To a solution of **5.12** (0.5 g, 0.78 mmol) in DCM was added methyl iodide (5 eq) and the mixture was stirred at rt overnight. The solvent and the excess of methyl iodide were then evaporated to give a pale-yellow solid.

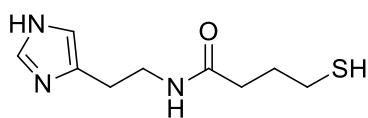
(Yield 95%, 0.58 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.85 (t, J = 6.0 Hz, 6H), 1.27 (m, 44H), 1.66-1.73 (m, 4H), 1.91-1.96 (m, 4H), 1.99-2.07 (m, 4H), 3.46 (s, 9H), 3.48-3.54 (m, 2H), 3.82-3.85 (m, 2H), 3.94-3.95 (m, 4H), 4.45-4.47 (m, 1H) 5.28-5.45 (m, 4H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 9.0. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.5 (CH_3), 22.1- 32.0 (CH_2 fatty chain), 35.6 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 49.8 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 59.2 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 66.2 ($\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-N}$), 127.3 ($\text{CH}=\text{CH}$), 127.6 ($\text{CH}=\text{CH}$), 131.0 ($\text{CH}=\text{CH}$), 133.0 ($\text{CH}=\text{CH}$).



5.14

Synthesis of compound 5.14: To compound **5.13** (0.3 g, 0.24 mmol) was added mercapto hexanol (3eq) and the mixture was degassed for 5 min. DMPA (0.3 eq) was then added and the solution was placed under UV lamps for 4h. The crude product was purified using flash chromatography (DCM / MeOH 8/2) to give a yellow wax.

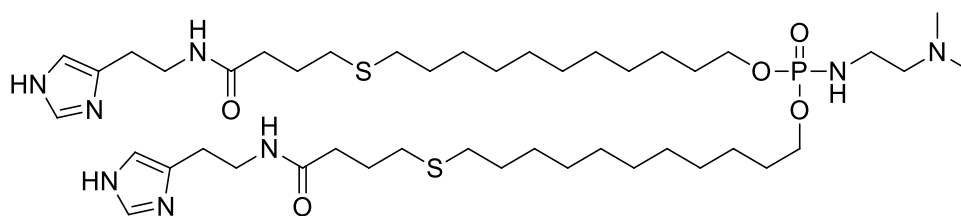
(Yield 25%, 0.09 g): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.87 (t, J = 6.2 Hz, 6H), 1.24 (m, 52H), 1.39, 1.48 (m; 12H), 1.54-1.58 (m, 12H) 1.78-1.82 (m, 4H), 1.95-1.97 (m, 2H), 2.24-2.27 (m, 10H), 3.43 (s, 9H), 3.54-3.56 (m, 2H), 3.59-3.62 (m, 4H), 3.80-3.82 (m, 2H), 4.00-4.01 (m, 2H), 4.02-4.04 (m, 2H), 4.74-4.80 (m, 1H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 9.2. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 13.5 (CH_3), 18.52- 32.4 (CH_2 fatty chain, $\text{CH}_2\text{-S}$), 35.6 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 44.9/ 45.06 (CH-S), 54.2 ($\text{CH}_3\text{-N}$), 61.2-66.6 ($\text{CH}_2\text{-O}$).



5.15

Synthesis of compound 5.15: In a round bottom flask histamine (1.0 g, 9.0 mmol), γ -Thiobutyrolactone (1.1 eq) and 15 mL of acetonitrile were added, and the mixture was refluxed overnight. After allowing the solution to cool back to rt the product was isolated by filtration and dried in vacuum to the thiol as a pale-yellow solid.

(Yield 1.9 g, 95%) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.87 (m, 2H), 2.35 (t, 2H), 2.49 (t, 2H), 2.79 (t, 2H), 3.44 (t, 2H), 6.86 (s, 1H), 7.60 (s, 1H).



5.16

Synthesis of compound 5.16: A mixture of **2.2b** (0.5 g, 1.05 mmol) and **5.15** was placed in a schlenk tube and the mixture was degassed for 3 minutes then DMPA (0.3 eq) was added. The solution was placed under UV lights for 16 hours. The crude product was then purified using flash chromatography (DCM/MeOH 8/2 v/v) to give the final product as a yellow solid.

(Yield 0.38 g, 40 %) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.26 (m, 28H), 1.52-1.56 (m, 4H), 1.63-1.66 (m, 4H), 1.85-1.88 (m, 4H), 2.25_2.29 (m, 10H), 2.46-2.49 (m, 8H), 2.74-2.79 (m, 6H), 2.97-2.99 (m, 1H), 3.39-3.43 (m, 4H), 3.92-3.98 (m, 4H), 6.86 (s, 2H), 7.60 (s, 2H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = 9.6. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 26.74- 39.56 (CH_2 fatty chain, CH_2 -S, CH_2 -NH), 45.16 (CH_3 -N), 60.02 (CH_2 -N), 66.80 (CH_2 -O), 117.12($\text{CH}=\text{C}$), 134.77 ($\text{C}=\text{CH}$), 134,88 ($\text{CH}=\text{N}$), 173.65 ($\text{C}=\text{O}$). MALDI-TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}]^+$ calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{N}_8\text{O}_3\text{PS}_2$ = 899.282; observed $[\text{M}]^+$ = 899.557.

Conclusion générale

Au cours de ce manuscrit nous avons décrit la synthèse de quatre nouvelles familles de phospholipides pour une application pour le transfert de gènes.

- Les amphiphiles cationiques contenant une fonction thioéther par chaîne hydrophobe
- Les amphiphiles cationiques contenant deux fonctions thioéthers par chaîne hydrophobe
- Les amphiphiles cationiques comportant des chaînes lipidiques ramifiées
- Les amphiphiles cationiques multi-polaires

Suite à l'étape de synthèse nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés physico-chimiques et de transfections de ces nouveaux systèmes de vectorisation afin d'établir une relation structure activités de ces molécules.

Le premier chapitre a été consacré à la synthèse de 4 nouveaux phosphoramides cationiques contenant une fonction thioéther par chaîne lipidique. L'objectif étant de générer du désordre dans les chaînes grasses de ces amphiphiles cationiques et ainsi augmenter la fluidité des assemblages supramoléculaires formés et faciliter la libération des acides nucléiques (e.g ADN ou ARN) dans le cytosol.

La stratégie de synthèse consistait à réaliser une réaction click thiol-ène entre des phosphoramides contenant une double liaison en position ω de la chaîne lipidique et des thiols commerciaux. Les produits obtenus comportent alors une fonction thioéther dans des positions différentes dans la chaîne alkyle (4, 6, 10 et 12 dans une chaîne de 18 atomes au total).

Les propriétés physico-chimiques et de transfection de ces nouveaux vecteurs ont été comparées à deux composés de référence. Le composé **BSV 36** formés par deux chaînes oléyles $C_{18:1}$ insaturés et le composé **BSV 101** formés par deux chaînes stéaryles saturées $C_{18:0}$. L'étude des propriétés physico-chimiques par anisotropie de fluorescence, isothermes de compression et ellipsométrie ont montré que les fonctions thioéthers, en particulier lorsqu'elles sont positionnées proche du milieu de la chaîne lipidique, permettent d'accroître la fluidité des assemblages supramoléculaires formés. Ces chaînes lipidiques font aussi apparaître une adaptabilité à la pression latérale plus importante que ce qui est observée pour les chaînes oléyles.

Les tests biologiques ont montré que la présence d'une fonction thioéther au milieu de la partie hydrophobe des molécules donne des vecteurs plus efficaces pour la transfection que les deux références **BSV 36** et **BSV 101**.

D'autre part, l'utilisation de chaînes lipidiques comportant une fonction thioéther peut aussi être considéré comme une alternative à l'utilisation de chaîne lipidique mono-insaturée de type oléyle qui ne sont pas compatibles avec des réactions d'hydrogénation catalytique. Ainsi des modifications de la partie polaire qui nécessiteraient l'utilisation de groupes protecteurs de type benzylique serait possible avec ce nouveau type de chaînes lipidiques.

Fort de ces constatations, nous avons estimées qu'il serait intéressant de synthétiser de nouveaux phosphoramides cationiques comportant cette fois-ci deux fonctions thioéthers par chaîne lipidique. L'objectif étant de vérifier si un effet cumulatif pourrait être observé au niveau des propriétés de transfection et des propriétés physico-chimiques de ces molécules. Ainsi, au cours du **deuxième chapitre** nous avons décrit la synthèse de trois nouveaux phosphoramides cationiques contenant deux fonctions thioéthers dans des positions différentes de la chaîne hydrophobe.

La conception de ces nouveaux vecteurs passe en premier temps par la synthèse d'alcools gras contenant deux atomes de soufres dans des positions différentes de la chaîne alkyle. La stratégie adoptée étant la réalisation d'une réaction thiol-ène croisées entre un alcane- ω -dithiol et deux alcènes dont l'un fonctionnalisés en ω par une fonction alcool. Bien qu'il s'agisse d'une réaction statistique où 3 produits sont formés, la différence de polarité entre ces trois composés permet l'obtention des alcools voulus avec de bons rendements et à l'échelle de gramme. Le reste de la procédure de synthèse suit le même acheminement que dans le cas précédent, à savoir une réaction de transestérification pour l'obtention du phosphite. L'étape suivante est un couplage Atherton-Todd pour avoir le phosphoramide correspondant. Finalement, une réaction de quaternarisation a permis l'obtention de la tête polaire de type triméthyl ammonium souhaitée.

L'étude des propriétés physico-chimique des nouveaux amphiphiles cationiques synthétisés montre qu'il existe bel et bien un effet cumulatif dû à la présence d'un deuxième atome de soufre dans la chaîne grasse de ces composés. En effet si dans le cas des composés monosoufré une transition de phase (gel-cristal liquide) a pu être observée à des températures variant de 38°C à 16°C selon la position de l'atome de soufre, dans le cas des

composés disouffré aucune transition de phase n'a été observée (sur la gamme de température testée).

D'autre part, l'étude des propriétés de transfection de ces nouveaux phosphoramides cationiques montre qu'ils peuvent être considérés comme de bons candidats pour la vectorisation d'acide nucléique avec une efficacité de transfection nettement supérieure au composé **BSV 36**.

Dans **la troisième partie** de ce manuscrit nous nous sommes intéressés à la conception de nouveaux amphiphiles cationiques contenant des chaînes hydrophobe ramifiées. Cette étude avait pour but d'augmenter le volume occupé par la partie hydrophobe de ces molécules et ainsi favoriser la formation de molécules susceptible de s'auto-assembler en phase hexagonale inverse. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi de travailler avec des alcools ramifiés commerciaux. En effet ces alcools présentent l'avantage d'être peu coûteux et permettent d'accéder à la molécule finale suite à 3 étapes de synthèse uniquement. Cette étude a été divisée en deux parties.

En premier temps nous avons synthétisés 3 nouveaux phosphoramides cationiques à partir de l'alcool ramifié 2-hexyldecan-1-ol, et en apportant un changement au niveau de la tête polaire. Ainsi, en plus du composé **BSV 161** ayant une tête polaire de type triméthyl ammonium, nous avons décrit la synthèse des composés **BSV 162** et **BSV 163** formées par des têtes polaires de type diméthylethoxyammonium et méthylimidazolium respectivement. Ces trois composés ont été obtenus avec de bons rendements et à l'échelle de gramme ce qui peut être considéré comme un considérable atout pour la synthèse de système de vectorisation.

Ayant à disposition ces nouveaux composés nous avons voulu répondre à la question de la nature d'auto-assemblages supramoléculaires formés par ces amphiphiles. Ainsi, des expériences de RMN ³¹P en milieu organisé aqueux selon la séquence echo de Hahn ont montré que les 3 vecteurs synthétisés s'auto-assemblent en phase hexagonale (probablement hexagonale inverse contenu du volume important des chaînes hydrophobes utilisés).

Les propriétés physico-chimiques des nouveaux composés semblent cependant être peu impactées par la nature du domaine hydrophile de ces molécules. En contrepartie, Les études des propriétés de transfection ont indiqué que le composé **BSV 163** (tête polaire méthylimidazolium) se démarque par une excellente efficacité de transfection et ce sur les différentes lignées cellulaires testées).

Ces résultats encourageant nous ont poussé à continuer à étudier les lipides cationiques formées par des chaînes ramifiées à partir d'alcools commerciaux. Ainsi la deuxième partie du quatrième chapitre a été consacrée à la synthèse de deux nouveaux phosphoramides cationiques contenant une tête polaire méthylimidazolium (comme dans le cas du composé **BSV 163**) mais en modifiant cette fois la longueur de la chaîne alkyle. Nous avons alors synthétisé le composé **BSV 164** à partir du 2-octyldodecan-1-ol et le composé **BSV 165** à partir du 2-tertadecyldecan-1-ol.

L'étude de la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire de ces deux molécules a montré la formation d'une phase hexagonale selon la signature du spectre RMN ³¹P obtenu.

L'évaluation des propriétés de transfection de ces nouveaux composés a montré que ces deux composés peuvent être considérés comme de bons agents de vectorisation.

Finalement, le cinquième et dernier chapitre de ce manuscrit a été consacré à la conception d'une nouvelle famille d'amphiphiles cationiques caractérisés par la présence de plusieurs groupements polaires. En effet si l'utilisation de chaînes hydrophobes ramifiées pour la synthèse de lipides cationiques qui s'auto-assemblent en phase non lamellaire peut être considérée comme une excellente approche pour la conception d'agent de vectorisation d'acide nucléiques. La formulation de ce type de composés en solution liposomales s'avère souvent difficile et nécessite des temps d'hydrations importants (3 jours minimum) à cause du volume important du domaine hydrophobe de ces composés. Ainsi notre idée était d'augmenter le volume de la partie hydrophile des phosphoramides dans le but de générer des assemblages supramoléculaires non lamellaires d'un côté et de l'autre côté la présence de plusieurs groupements hydrophiles dans la structure de ces molécules devrait faciliter l'étape d'hydratation.

Ainsi nous avons décrit en premier temps la synthèse de deux nouvelles molécules amphiphiles formées par une tête polaire dendritique (composé **BSV 200** et **BSV 201**). La stratégie de synthèse consiste à réaliser une réaction thiol-ène entre un phosphoramide comportant 3 doubles liaisons au niveau de sa partie polaire et un thiol commercial comportant une fonction polaire.

Cette étude a permis de montrer que le composé **BSV 200** ayant une tête polaire formée par 3 fonctions ammonium est aussi efficace que la référence commerciale Lipoféctamine pour la transfection des deux lignées SKMel28 et A549. Cependant, le spectre RMN ³¹P en milieu

organisé n'a pas permis de déterminer la nature de l'auto-assemblage supramoléculaire formée par ce composé.

La deuxième stratégie de synthèse explorée dans ce chapitre est l'introduction de ramifications portant des fonctions polaires sur les chaînes hydrophobes des phosphoramides. Nous avons ainsi obtenu le composé **BSV 202**. Le spectre RMN ³¹P en milieu organisé de ce produit montre qu'il s'autoassemble en phase lamellaire. Cependant la faible quantité de produit obtenu n'a pas permis d'étudier son efficacité de transfection.

Finalement, nous avons décrit la synthèse du composé BSV 203, il s'agit d'un composé amphiphile bolaforme contenant deux motifs imidazoles. Des études préliminaires montrent une bonne efficacité de transfection des formulations préparées à base du composé **BSV 203** et le composé **KLN 25**.

Pour conclure les divers travaux présentés tout le long de ce manuscrit montrent qu'il existe un lien étroit entre la structure des amphiphiles cationiques et leur capacité de transfection. Il est donc intéressant de tirer profit des différentes propriétés physico-chimiques de ces molécules afin d'une part essayer d'expliquer l'origine de ses variations et d'autre part proposer de nouvelles stratégies pour moduler la structure des amphiphiles cationiques dans le but d'améliorer leurs propriétés de transfection.

En guise de perspective il serait intéressant de mener une étude plus approfondie des propriétés physico-chimiques des molécules synthétisées afin de mieux comprendre leur mode d'action.

*"The end is never the end. It's always the beginning of
something."
Kate Lord Brown,*

Titre : Conception de composés amphiphiles, études physico-chimiques et applications en transfection

Mots clés : Thérapie génique, Synthèse organique, Phospholipides, Amphiphiles, Liposomes Transfection,

Résumé : La thérapie génique est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse visant à traiter différents types de maladies.

L'objectif de ce travail était la synthèse de nouvelles familles de phosphoramides cationiques afin d'étudier leurs propriétés physico-chimiques puis leurs propriétés de transfection

Dans un premier temps nous avons décrit la synthèse de nouveaux amphiphiles cationiques contenant une ou deux fonctions thioéther dans chaque chaîne lipidique. La fonction thioéther apparaît comme un élément de structure qui permet d'introduire de la fluidité dans les assemblages supramoléculaires et qui est bénéfique pour la transfection.

La deuxième partie de ces travaux a été consacrée à l'élaboration de nouveaux phosphoramides cationiques formés par des chaînes hydrophobes ramifiées. Ces nouveaux amphiphiles présentent la spécificité de s'assembler en phase hexagonale et ont également montré des efficacités de transfection intéressantes

Enfin, la dernière partie de ce projet portait sur la synthèse d'une nouvelle famille de molécules amphiphiles multipolaires incluant une structure bola-amphiphile. Ces composés ont été préparés selon trois stratégies de synthèse différentes. Ces composés ont aussi montré une bonne capacité de transfert d'ADN et de si-ARN.

Title: Design of new amphiphilic compounds, Study of their physico-chemical properties and application in gene delivery

Key Words: Gene therapy, Organic Synthesis, Phospholipids, Amphiphiles, Liposomes, Formulation

Abstract: Gene therapy is a new promising therapeutic approach for the treatment of multiple types of diseases (monogenic diseases, cancer ...).

The goal of this study was the synthesis of new families of cationic phosphoramides and the study of their physico-chemical and transfection properties.

First, we described the synthesis of a new family of cationic amphiphiles containing one or two thioether function per lipid chain.

The physico-chemical studies conclude that the thioether function present in the lipid chain is able to increase the fluidity of the supramolecular assemblies (liposomes). This series of compounds presented a

good transfection efficiencies

The second part of this work was devoted to the elaboration of new cationic phosphoramides containing branched hydrophobic lipid chains. These new amphiphiles presented the singularity to auto-assemble in hexagonal phase and were efficient for transfection.

Finally, the last part of this project was dedicated to the synthesis of multipolar amphiphilic compounds including one bola-amphiphile by using three different synthesis strategies. These compounds also exhibited a good capacity to deliver both DNA and si-RNA.