



HAL
open science

Composes amphiphiles modulables hautement fluorés : synthèse et applications dans le domaine de la vectorisation

Nicolas Dupuy

► **To cite this version:**

Nicolas Dupuy. Composes amphiphiles modulables hautement fluorés : synthèse et applications dans le domaine de la vectorisation. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10004 . tel-01748221

HAL Id: tel-01748221

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748221>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Science et Technique de la Matière et des Procédés
Ecole Doctorale de Chimie et Physique Moléculaires (SESAMES)
Département de Formation Doctorale de Chimie et Physico-chimie Moléculaires

THESE

Présentée devant l'université Henri Poincaré – Nancy I

Pour l'obtention du grade de
Docteur de Nancy Université, Université Henri Poincaré
en Chimie et Physicochimie Moléculaires
par **Nicolas DUPUY**

COMPOSES AMPHIPHILES MODULABLES HAUTEMENT FLUORES : SYNTHÈSE ET APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA VECTORISATION

Soutenance publique le 4 Mars 2010

Membres du jury :

Présidente	Mme Sandrine BOUQUILLON	Professeur, Université de Reims
Rapporteurs :	Mme Marie-Pierre KRAFFT	Directeur de Recherches CNRS, ICS, Strasbourg
	Mr Benoît CROUSSE	Directeur de Recherches CNRS, BioCIS, Paris Sud 11
Examineurs :	Mr Raphaël DUVAL	Maitre de Conférences, UHP Nancy I
	Mme Andreea PASC	Maitre de Conférences, UHP Nancy I
	Mme Christine GERARDIN	Professeur UHP Nancy I (directrice de thèse)

Laboratoire d'Etude et de Recherches sur le Matériau Bois, EA n° 4370, IFR 110

Equipe Valorisation Chimique de la Biomasse

Faculté des Sciences et Techniques BP 239, 54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex

U.F.R. Science et Technique de la Matière et des Procédés
Ecole Doctorale de Chimie et Physique Moléculaires (SESAMES)
Département de Formation Doctorale de Chimie et Physico-chimie Moléculaires

THESE

Présentée devant l'université Henri Poincaré – Nancy I

Pour l'obtention du grade de
Docteur de Nancy Université, Université Henri Poincaré
en Chimie et Physicochimie Moléculaires

par **Nicolas DUPUY**

COMPOSES AMPHIPHILES MODULABLES HAUTEMENT FLUORES : SYNTHÈSE ET APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA VECTORISATION

Soutenance publique le 4 Mars 2010

Membres du jury :

Présidente	Mme Sandrine BOUQUILLON	Professeur, Université de Reims
Rapporteurs :	Mme Marie-Pierre KRAFFT	Directeur de Recherches CNRS, ICS, Strasbourg
	Mr Benoît CROUSSE	Directeur de Recherches CNRS, BioCIS, Paris Sud 11
Examineurs :	Mr Raphaël DUVAL	Maitre de Conférences, UHP Nancy I
	Mme Andreea PASC	Maitre de Conférences, UHP Nancy I
	Mme Christine GERARDIN	Professeur UHP Nancy I (directrice de thèse)

Laboratoire d'Etude et de Recherches sur le Matériau Bois, EA n° 4370, IFR 110

Equipe Valorisation Chimique de la Biomasse

Faculté des Sciences et Techniques BP 239, 54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe SYACAM SYnthèse et Assemblage de Composés Amphiphiles du laboratoire « Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes » (SRSMC) de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1. Cette équipe a intégré le groupe Valorisation Chimique de la Biomasse du Laboratoire Etude et Recherche sur le Matériaux Bois (LERMAB) en janvier 2009.

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement Madame Christine Gérardin, Professeur à l'Université Nancy 1, qui a dirigé ma thèse et qui m'a encadré tout au long de mon travail. Je lui exprime ma sincère reconnaissance pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, pour ses conseils et pour les discussions fructueuses que nous avons eues.

Je remercie également Andreea Pasc, Maître de conférence à l'Université Nancy 1, qui a suivi mon travail et m'a apporté de nombreuses compétences dans des domaines variés et surtout en physico-chimie. Je la remercie pour la qualité de son jugement dans mon travail et pour sa bonne humeur constante.

J'adresse mes remerciements à Madame Marie-Pierre Krafft, Directeur de Recherches CNRS à l'ICS de Strasbourg et à Monsieur Benoît Crousse, Directeur de Recherches CNRS à Paris Sud, pour avoir accepté de rapporter ce travail.

Je suis très honoré par la présence dans mon jury de Madame Sandrine Bouquillon, Professeur à l'Université de Reims et de Monsieur Raphaël Duval, Maître de Conférences à l'Université de Nancy. Je remercie également ce dernier pour les discussions intéressantes ainsi que la fourniture de l'ADN et les différents tests de viabilité cellulaire.

Un grand merci pour Stéphane Parant qui m'a apporté un grand soutien technique et informatique et m'a permis de réaliser des expériences dans des conditions optimales.

J'adresse de sincères remerciements à Marie-José Stébé pour sa collaboration étroite, son savoir faire en physico-chimie et ainsi que de m'avoir permis l'emploi d'un matériel de qualité lors de l'établissement des isothermes de compression.

Enfin, je remercie l'ensemble des personnels du laboratoire et des autres laboratoires avec lesquels nous avons collaboré, ainsi que tous les doctorants pour leur soutien et leur bonne humeur. Un merci tout particulier à Francis Barros, Pascal Lemièrre et Florentin Michaux.

Sommaire

Introduction générale	7
I. Mise au point bibliographique.....	11
A. L'ARN interférence	11
1. Introduction.....	11
2. Historique	12
3. Principe.....	13
B. Vectorisation du matériel génétique	14
1. Définition d'une membrane cellulaire	14
2. Propriétés d'une membrane cellulaire.....	15
a) Les mécanismes passifs	15
b) Les mécanismes actifs	16
3. Objectifs de la vectorisation.....	17
4. Les vecteurs viraux	17
a) Les différents virus	18
b) Les problèmes liés aux vecteurs viraux.....	19
5. Les vecteurs non-viraux.....	19
a) L'ADN nu.....	19
b) Les méthodes d'injection physiques	20
c) Les vecteurs synthétiques	21
C. Les vecteurs supramoléculaires dérivés de molécules amphiphiles	24
1. Historique	24
2. Les tensioactifs : définition et caractéristiques.....	25
a) Classification des tensioactifs.....	26
(1) En fonction de la tête polaire	27
(2) En fonction de la chaîne hydrophobe	28
(3) En fonction de sa structure générale	29

b)	Applications des agents de surface	32
(1)	Propriétés des agents de surface	32
(2)	Domaines d'applications	33
3.	Les tensioactifs utilisés pour la vectorisation de matériel génétique	34
4.	Composés amphiphiles fluorocarbonés	36
a)	Propriétés des chaînes fluorées	36
b)	Avantages des molécules amphiphiles fluorocarbonées:	38
c)	Domaines d'applications des tensioactifs ou des molécules fluorées	38
D.	Les différents types d'interactions avec les oligonucléotides	39
1.	Point de vue général :	39
2.	Interaction avec les tensioactifs (TA)	40
3.	Interaction ADN / vésicule	42
4.	Relation structure molécule amphiphile / efficacité de la vectorisation	42
E.	Conclusion et stratégie envisagée	46
II.	Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés	
	et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des	
	interactions avec le matériel génétique	50
A.	Synthèse	50
1.	Structure des molécules cibles et stratégie de synthèse	50
2.	Synthèse des intermédiaires hydrophobes	50
3.	Synthèse de tensioactifs géminis	53
a)	Synthèse des diénamines	54
b)	Réduction des diénamines	56
c)	Saponification des diesters d'éthyle	58
B.	Propriétés physico-chimiques à l'interface air/eau	59
1.	Interface eau / air – tension superficielle	60
2.	Présentation de la balance de Langmuir	60

3.	Isothermes de compression des diesters d'éthyle 8.....	63
a)	Influence de la longueur de la chaîne fluorée.....	64
b)	Influence du pH	65
4.	Isothermes de compression des diacides 10.....	67
a)	Influence de la longueur de la chaîne fluorée.....	67
b)	Influence du pH	68
C.	Interactions géminis/oligonucléotides.....	69
1.	L'ADN.....	69
2.	Etudes en films de Langmuir	70
a)	Diester 8c.....	70
b)	Diacide 10c	72
III.	Vecteurs modèles pour le transport d'oligonucléotides	75
A.	Synthèse de tensioactifs monocaténares.....	75
1.	Synthèse de la partie hydrophobe	75
2.	Synthèse de tensioactifs monocaténares.....	75
a)	Tensioactifs de type bêta-aminoacides : par formation d'énamines.....	75
b)	Tensioactifs de type amines secondaires : par formation d'imines.....	76
c)	Hydrogénation des énamines et des imines monocaténares	79
d)	Saponification des esters monocaténares	82
B.	Propriétés physico-chimiques en solution aqueuse	82
1.	Dans l'eau	82
a)	Mesure de tension superficielle	83
b)	La diffusion de la lumière	88
(1)	Mesure de diffusion statique de la lumière	88
(2)	Mesure de diffusion dynamique de la lumière	91
c)	Microscopie électronique à transmission	93
2.	Dans un tampon phosphate pH = 7.4.....	97
a)	Mesure de tension superficielle	97

b)	Mesure de diffusion statique de la lumière	99
c)	Mesure de diffusion dynamique de la lumière	101
C.	Interactions tensioactifs synthétisés / ADN	102
1.	Introduction.....	102
2.	Etude par diffusion de la lumière.....	103
3.	Etude par dichroïsme circulaire.....	108
a)	Le dichroïsme circulaire.....	108
b)	Résultats	111
c)	Discussion	114
d)	Conclusion	114
4.	Etude par mesure fluorimétrique.....	115
a)	La fluorimétrie	115
b)	Déplacement du bromure d'éthidium	115
c)	Discussion	116
D.	Evaluation des propriétés biologiques : viabilité cellulaire	117
	Conclusion générale et perspectives	119
IV.	Partie expérimentale.....	123
A.	Généralités :.....	123
B.	Etude des agrégats en solution :.....	123
C.	Etude de l'interaction avec l'ADN :	124
D.	Etude de l'organisation à l'interface air/eau :.....	125
E.	Synthèses :	125
1.	Synthèse de la partie hydrophobe :	125
2.	Synthèse de tensioactifs géminis :	134
3.	Synthèse des tensioactifs monocaténares :	154
F.	Tests de viabilité cellulaire	178
	Bibliographie	179

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Boc : tert-Butyloxycarbonyle

CAC : Concentration agrégative critique

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%

CMC : Concentration micellaire critique

d : Doublet

DC : Dichroïsme Circulaire

DLS : Dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

DOGS : Dioctadécyl amidoglycine spermine

DOPE : Dioléylphosphatidyléthanolamine

DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-2-(carboxamidospérmine)éthyl-N,N-diméthyl-1-propammonium

DOTAP : N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate

DOTMA : Bromure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium

eq : Equivalent

EtOH : Ethanol

HCl : Acide chlorhydrique

HF : Acide fluorhydrique

IR : Infra-rouge

m : Multiplet

ma : Massif

MET : Microscopie électronique à transmission

ppm : Partie par million

RMN : Résonance magnétique nucléaire

s : Singulet

SLS : Static light scattering (diffusion statique de la lumière)

t : Triplet

TA : Tensioactif

THF : Tétrahydrofurane

TMS : Tétraméthylsilane

Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

γ : Tension superficielle

Z : Benzyloxycarbonyle

Introduction générale

La vectorisation est une technologie qui permet d'améliorer l'efficacité d'un principe actif en augmentant sa biodisponibilité, par exemple en augmentant la fraction du principe captée par l'organisme sous sa forme pharmacologiquement active, non dégradée au niveau de la cible biologique. Il s'agit plus précisément de promouvoir le passage à travers les membranes et/ou les cellules d'un principe actif, en le protégeant de la dégradation par les enzymes. Les principaux domaines d'application sont la pharmacie (délivrance de médicaments), l'agriculture et la cosmétique (délivrance cutanée voire transcutanée de molécules hydrophobes et /ou hydrophiles). Plusieurs types de techniques ont été développés :

- encapsulation du principe actif
- modification chimique du principe actif
- systèmes d'administration (spray, patch, implantation d'appareils dans l'organisme pour libérer le principe actif directement sur la cible)

Ces techniques font appel à des disciplines variées: biotechnologies, chimie, micro systèmes, nanotechnologies, physico-chimie, thérapie génique...

Malgré le coût de production et la complexité de tels systèmes, des verrous technologiques subsistent et ralentissent leur apparition sur le marché: difficulté à maîtriser les aspects toxicologiques, la biocompatibilité (des matériaux d'encapsulation par exemple), la biodégradabilité des matériaux utilisés, le passage des membranes biologiques comme la pénétration intracellulaire.

Ce dernier point est un des plus importants. De manière générale, les médicaments ne peuvent exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Les barrières sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs composantes: mécaniques, physico-chimiques et enzymatique.

La solution la plus fréquemment utilisée est l'utilisation de liposomes, qui sont des vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques entourant un cœur aqueux, et pouvant retenir plusieurs types de composés hydrosolubles (encapsulées dans le compartiment aqueux) ou liposolubles (empaquetées dans la bicouche lipidique).

Les liposomes permettent de protéger les principes actifs du système immunitaire de l'organisme et permettent également le passage de la membrane cellulaire grâce à leur structure

similaire. Ils ont toutefois deux défauts majeurs: le manque de spécificité pour la cellule cible ainsi que l'oxydation et l'instabilité chimique des phospholipides.

Un des domaines en plein essor est la vectorisation d'oligonucléotides, ADN ou ARN comme principe actif dans le but de pouvoir interagir au niveau génétique.

La mise en évidence d'un support biologique de l'hérédité date des travaux de Gregor Mendel en 1865 sur les pois et plus tard de Thomas H. Morgan sur la mouche drosophile. Le mot gène, lui, fut proposé par Wilhem Johannsen en 1909¹ et est défini actuellement comme une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) destinée à être transcrite en acide ribonucléique (ARN). La molécule d'ARN ainsi produite peut être traduite en protéine (ARN messenger) ou être directement fonctionnelle (ARN ribosomaux). Il existe environ 21000 gènes chez l'Homme qui détermine les caractéristiques de son espèce; ses briques élémentaire.

Le contrôle maîtrisé des gènes est devenu un sujet de débats éthiques depuis l'amélioration des techniques de biologie moléculaire, de microscopie optique et le décodage du génome humain en 2003. En effet, le contrôle des gènes et leur traduction en protéines permettraient de contrôler les caractéristiques les plus intimes de chaque individu. Mais ce contrôle fait également entrevoir des améliorations considérables dans le domaine médical et plus précisément dans le traitement des maladies génétiques ou des dérèglements liés à un gène.

Ces maladies restent pour beaucoup d'entre elles intraitables du fait de la difficulté d'établir un diagnostic et du manque de moyens techniques pour les contrer. Si pour certaines, on peut traiter les symptômes extérieurs, pour les autres, la cause génétique rend beaucoup plus difficile et souvent impossible le traitement de la maladie.

L'essor de la thérapie génique, qui consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus, a permis d'entrevoir un espoir pour le traitement de ces maladies génétiques. C'est à la fin des années 60 que le concept de thérapie génique est admis par la communauté scientifique pour réparer ou modifier le patrimoine génétique afin de traiter une pathologie. Ces techniques sont toutefois difficiles à mettre en œuvre d'un point de vue technique; le premier essai clinique date en effet de la fin des années 80 et a été initié par S. Rosenberg aux Etats-Unis. Depuis ces essais, toutes les pathologies héréditaires ou non, liées à un dysfonctionnement d'un gène sont ciblées par la thérapie génique car il n'y a pas, conceptuellement, une maladie qui ne pourrait pas bénéficier de cette technique. Une des difficultés rencontrées lors du développement de la thérapie génique pour les différentes maladies est la sélection du gène adéquat à transférer, c'est à dire du gène qui a le

meilleur potentiel thérapeutique en fonction de la pathologie à traiter. Mais un autre problème se pose aux chercheurs: mettre au point des vecteurs permettant le transport de ce gène dans l'organisme ainsi que son transfert vers les cellules visées.

Une nouvelle stratégie biomoléculaire a été découverte en 1990 par l'équipe de Jorgensen et relance l'intérêt déjà grand dans l'étude des gènes et le traitement des maladies liées à des gènes défectueux. Il s'agit de « L'interférence ARN ». Cette technique repose sur le fait qu'un petit ARN, appelé ARN interférent, peut interférer avec un ARN messager issu d'un gène, conduisant à sa dégradation et la diminution de sa traduction en protéine. Un des avantages de cette technique réside dans le fait que la cible se situe dans le cytoplasme et non dans le noyau de la cellule. Cette technique est très prometteuse dans le cadre des maladies génétiques et ouvre un champ de recherche immense sur les ARN non-codants et sur les fonctions des gènes. Cette technique nécessite cependant de faire appel à des vecteurs pour pouvoir transporter et transférer l'information génétique dans les cellules visées.

Les vecteurs à disposition pour cette technique sont du même type que ceux utilisés en thérapie génique. Ils peuvent être regroupés en deux catégories: les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs viraux sont des virus modifiés, sécurisés, dont l'utilisation repose sur le constat d'efficacité des virus pour transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines. La seconde catégorie regroupe les techniques d'injection physique mais également des vecteurs synthétiques qui n'ont pas les caractères potentiellement pathogènes des virus. Cette catégorie fait l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs années car elle offre de nombreux avantages par rapport à l'utilisation des virus modifiés. En effet, ces vecteurs sont plus faciles à produire en grande quantité et à moindre coût, ils peuvent être adaptés en fonction de la maladie à traiter et des tissus visés. Ils sont également plus faciles à manipuler et à stocker. Cependant, leur efficacité est bien moindre que celle des virus pour apporter une information génétique dans une cellule, rendant difficile leur utilisation dans certains cas. Ces vecteurs peuvent être de plusieurs natures mais les plus étudiés sont les lipoplexes qui sont des lipides cationiques capables de complexer des oligonucléotides et de permettre leur transport dans l'organisme et leur transfert dans les cellules.

De nombreux lipides ou amphiphiles cationiques sont à l'étude actuellement. Depuis quelques années, des travaux de recherche portent sur l'utilisation potentielle d'amphiphiles fluorocarbonés. Cette famille de molécules se révèle intéressante car elle peut, en particulier, permettre d'obtenir des vecteurs modèles conduisant à la compréhension des phénomènes

biologiques, physiques et chimiques nécessaires à une vectorisation adaptée. D'autre part, l'utilisation de molécules fluorées apporte de nombreuses propriétés spécifiques d'un point de vue physico-chimique et d'un point de vue biologique, comme une meilleure stabilité et une durée de vie plus importante au sein de l'organisme vivant.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur la conception de nanovecteurs par assemblage contrôlé d'amphiphiles fluorocarbonés multifonctionnels pour des applications dans le transfert d'oligonucléotides dans le cadre de l'interférence ARN.

Cette étude s'articule autour de trois axes principaux :

- Le design et la synthèse de briques moléculaires amphiphiles fluorocarbonées incorporant différents motifs à fonctionnalité variable et permettant une fixation du fragment d'ARN par interactions électrostatiques principalement.
- La caractérisation des assemblages et la mise en évidence des interactions avec l'ARN.
- La mise en évidence des propriétés biologiques et en particulier la réalisation de tests de viabilité cellulaire.

Plus précisément, ces travaux ont consisté à synthétiser deux nouvelles familles de molécules amphiphiles modulables. Après une mise au point bibliographique sur l'interférence ARN et sur les tensioactifs, ce rapport présente la synthèse et l'étude des propriétés physico-chimiques de ces deux familles. La première correspond à des composés géminis fluorocarbonés suffisamment hydrophobes pour conduire à la formation de films de Langmuir permettant alors de caractériser les interactions avec un fragment d'ADN. La deuxième correspond à des composés monocaténaux conduisant de manière spontanée à la formation de vésicules pouvant servir alors de modèles de vecteurs en 3D.

I. Mise au point bibliographique

Il est tout d'abord nécessaire, afin de bien appréhender le problème, de faire une mise au point sur le principe de l'interférence ARN et de détailler les différentes possibilités de vectorisation d'oligonucléotides ainsi que sur le problème du ciblage cellulaire. L'objectif principal de ce travail correspond à la préparation de vecteurs supramoléculaires à base de molécules amphiphiles, une partie sera donc ensuite développée sur les tensioactifs déjà utilisés dans ce domaine et sur l'intérêt d'utiliser ce type de systèmes par rapport à d'autres.

A. L'interférence ARN

1. Introduction

L'interférence ARN est un mécanisme naturel découvert d'abord chez les plantes en 1990^{2,3} par l'équipe de R. Jorgensen, puis mis en évidence chez les mammifères en 2001⁴. Ce phénomène correspond à l'extinction d'un gène cible et donc à l'arrêt (partiel ou total) de la production de la protéine associée. Depuis 2001, l'interférence ARN fait l'objet de nombreuses recherches tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué et d'un engouement important. Le journal Science a considéré l'interférence ARN comme la meilleure réussite de l'année 2002 et comme l'une des 10 meilleures avancées scientifiques en 2003.

De nombreuses études portent sur le développement de nouvelles techniques, basées sur ce mécanisme, pour des applications médicales. En effet, l'interférence ARN pourrait être utilisée comme outil thérapeutique pour toutes les maladies « génétiques » caractérisées par une surexpression de protéines ou l'apparition de mutations aberrantes ou encore la présence de gènes « malades » conduisant à la production de protéines anormales. Les chercheurs envisagent de combattre par cette méthode des maladies telles que les maladies neurodégénératives, oculaires ou encore des infections virales, ainsi que le VIH ou certains cancers.

Dans le domaine de la recherche fondamentale, cette méthode peut servir à comprendre le rôle d'un gène au sein d'une cellule ou d'un organisme. En bloquant un gène cible, il suffit d'identifier si oui ou non il est responsable des conséquences observées.

Maintenant que le génome humain a été décodé, on peut rêver à une technique universelle pour le traitement de maladies génétiques car il est possible d'identifier le ou les gènes responsables et de synthétiser les ARN nécessaires pour le ou les éteindre.

Cette partie présente tout d'abord un bref historique de l'interférence ARN, puis son principe de manière très succincte et enfin les nouveaux enjeux actuels.

2. Historique

L'interférence ARN a été mise en évidence en 1990 par l'équipe de Richard Jorgensen² alors qu'ils tentaient de renforcer la couleur pourpre de pétunias. C'est en introduisant un vecteur codant un pigment dans cette plante que ces chercheurs ont observé que presque la moitié des fleurs étaient devenues blanches ou anormalement pâles. Ils remarquèrent également que le taux d'ARN messager produit par le gène était fortement réduit par rapport au taux des fleurs témoins et que le gène responsable de la pigmentation n'avait pas été altéré. C'est ainsi qu'ils ont montré que l'introduction d'un gène codant pour une protéine déjà prise en charge par un autre gène réduisait l'expression de cette protéine. A l'époque, ce phénomène fut appelé : « Co-suppression »

Ce phénomène fut observé à nouveau en 1998 par Andrew Fire et Craig C Mello⁵ au niveau du règne animal alors qu'ils travaillaient sur des cellules du nématode *Caenorhabditis elegans*. Ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par introduction d'ARN homologue fut appelé « Interférence ARN ». Ces deux chercheurs ont reçu le 2 octobre 2006 le prix Nobel de Physiologie et de Médecine pour leurs travaux.

Ce mécanisme très intéressant ne semblait cependant pas pouvoir fonctionner chez les mammifères en raison du développement d'une réponse antivirale particulière mais forte appelée « interféron ». Cette réponse bloque en effet la synthèse des protéines cellulaires et aboutit à la dégradation non spécifique des ARN messagers quelque soit leur séquence. Ceci provoque la mort de la cellule afin d'éviter la réplication de particules virales et de protéger les cellules voisines.

C'est en 2001, après les travaux de Carthew et de Sharp^{6,7} que le phénomène est tout de même mis en évidence chez les mammifères. Ils ont tout d'abord observé que les longs doubles brins d'ARN introduit chez *C.elegans* généraient des petits mono brins de 21 à 25 paires de bases. Ils ont donc eu l'idée d'introduire directement de petits brins d'ARN et ont montré que ces petits brins inhibent rapidement, facilement et spécifiquement certains gènes. Ces chercheurs ont mis en évidence que c'est la taille des ARN introduits qui est responsable de la réponse cellulaire et que l'introduction de petits fragments ne déclenche pas la réponse antivirale de type interféron.

3. Principe

De manière très simplifiée, le mécanisme de l'interférence ARN se compose de plusieurs étapes dont deux essentielles : la production de petits ARN interférents et la destruction de l'ARN messenger cible.

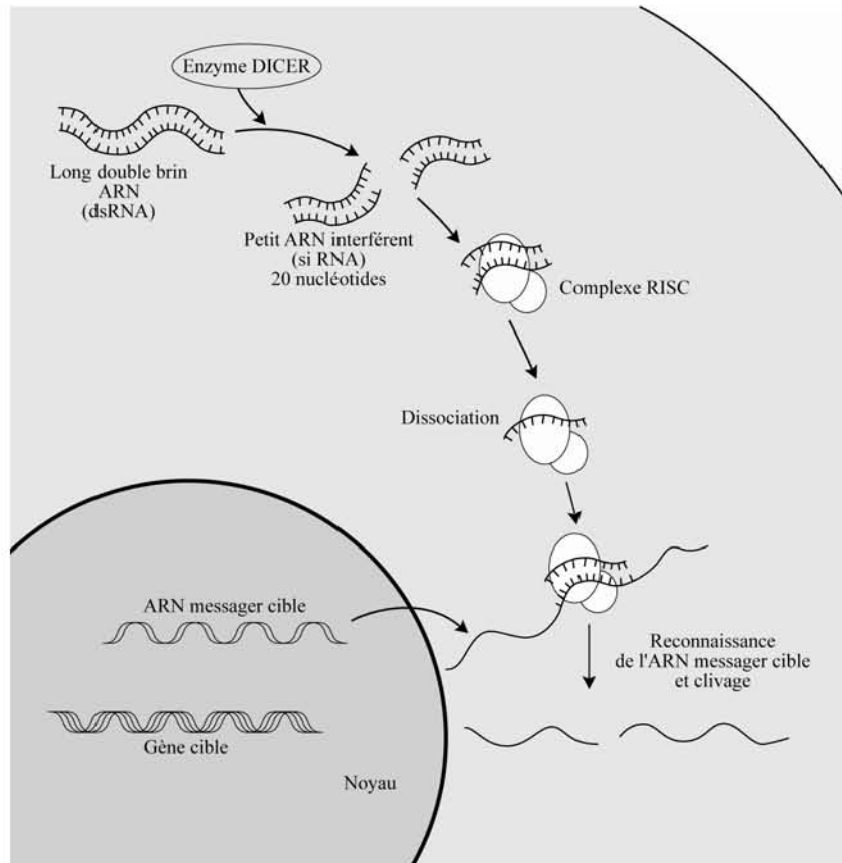


Figure 1 : Schéma simplifié du principe de l'ARN interférence

La première étape après introduction de longs ARN double brins dans la cellule est la reconnaissance de ces brins par une enzyme de la famille de la RNase III, présente au sein du cytoplasme. Cette enzyme, appelée DICER, assure le cleavage en petits fragments d'ARN double brins d'environ une vingtaine de nucléotides, les siRNAs (small interfering RNA).

DICER, après avoir couper les brins d'ARN, reste liée à ces oligonucléotides par formation d'un complexe appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui va ensuite être guidé vers l'ARN messenger à dégrader. Avant cette dernière étape, l'activation de RISC est nécessaire. Cette activation s'effectue par dissociation des doubles brins d'ARN en simples brins. Une fois activé, le complexe peut attaquer l'ARN messenger.

L'attaque commence par une fixation du complexe sur l'ARN à cliver. Les siRNA se fixent sur une région codante de l'ARN messager formant une région d'ARN double brins et activent ainsi le système de défense naturel de la cellule contre les virus. L'endonucléase de RISC coupe alors l'ARN messager, ce qui a pour conséquence de bloquer la synthèse de la protéine normalement codée par cet ARN.

L'inhibition de protéine ne nécessite qu'une faible quantité d'ARN interférents et il est supposé qu'il existe une étape d'amplification dans le phénomène de l'interférence ARN mais qui ne sera pas décrite ici.

On peut ajouter que ce mécanisme a lieu de manière naturelle mais qu'il est également possible d'administrer de manière artificielle un siRNA et donc cibler spécifiquement un ARN messager que l'on souhaite dégrader.

B. Vectorisation du matériel génétique

Le principal enjeu à l'heure actuelle dans le domaine de l'interférence ARN, comme dans celui de la thérapie génique, est le transport d'un oligonucléotide d'intérêt, vers les cellules malades et plus précisément vers des cibles qui sont intracellulaires. L'avantage de l'interférence ARN à ce niveau est que la cible se trouve dans le cytoplasme alors que dans le cas de la thérapie génique, l'oligonucléotide doit pouvoir pénétrer dans le noyau de la cellule. L'ADN et l'ARN sont des molécules ou plutôt des macromolécules polyanioniques hydrophiles, elles ne sont donc pas capables de traverser les membranes cellulaires hydrophobes directement.

1. Définition d'une membrane cellulaire

La membrane cellulaire est un assemblage de molécules : lipides, protéines, sucres sous forme de bicouches séparant le cytoplasme de l'environnement extérieur⁸. Elle régule les échanges de matière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Les composants majoritaires de la membrane sont les phospholipides⁹, découverts par Théodore Nicolas Gobley qui isola la lécithine du jaune d'œuf en 1847¹⁰. Ces molécules tensioactives composées d'une tête polaire et de deux queues hydrophobes, peuvent s'auto-assembler en bicouches les têtes polaires pointant à la fois vers l'extérieur de la cellule et vers l'intérieur de la cellule. L'épaisseur d'une membrane cellulaire est d'environ 7,5 nm et elle est en constante évolution. C'est un corps déformable dans les trois directions de l'espace : diffusion latérale, rotation, flip-flop¹¹.

Composition d'une membrane cellulaire :

Lipides	49%	Phospholipides	55%
		Cholestérol	25%
		Glycolipides	20%
Glucides	8%		
Protéines	43%		

Tableau 1 : Composition d'une membrane cellulaire

2. Propriétés d'une membrane cellulaire

La membrane cellulaire est une barrière sélective entre extérieur et intérieur. Elle présente la propriété de perméabilité sélective qui permet de contrôler l'entrée et la sortie des différentes molécules, ions... comme par exemple les hormones ou l'oxygène. Les membranes ont également la capacité de fusionner et de se séparer. Ce mécanisme est prépondérant dans les phénomènes d'exocytose et endocytose.

Il existe plusieurs mécanismes de transport membranaire repartis en deux classes : les mécanismes passifs et les mécanismes actifs.

a) Les mécanismes passifs

La diffusion :

Dans le cas des petites molécules comme O₂, CO₂, les alcools... C'est le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur qui contrôle cette diffusion.

La diffusion facilitée :

Dans le cas des molécules plus volumineuses qui ne passent pas dans les pores de la membrane. Elles traversent néanmoins en se combinant avec les transporteurs protéiques qui sont présents dans la membrane et sont ensuite relâchés dans le cytoplasme de la cellule.

La filtration :

L'eau et les solutés vont traverser la membrane grâce à la pression hydrostatique. C'est un gradient de pression ici qui contrôle le transport.

b) Les mécanismes actifs

Le transport actif utilise des transporteurs de nature protéique qui se combinent spécifiquement et réversiblement avec les substances à transporter. Ces transporteurs sont constitués de protéines et ressemblent à des enzymes. Ils permettent le déplacement d'acides aminés, d'ions à contre courant (contre le gradient de concentration). Ce type de transport nécessite bien sûr de l'énergie qui est fournie sous la forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate).

On peut citer par exemple la pompe à sodium¹² et le transport vésiculaire. C'est ce dernier qui nous intéresse le plus car il permet de faire entrer des macromolécules dans la cellule.

Les deux principaux types de transport vésiculaires sont l'exocytose (vers l'extérieur) pour les hormones, les émissions de neurotransmetteurs ou l'élimination de certains déchets et l'endocytose (vers l'intérieur) pour des molécules spécifiques. Dans le cas de l'exocytose, les éléments destinés à l'expulsion sont enfermés dans une vésicule. Ensuite la vésicule migre vers la membrane et fusionne avec celle-ci. Enfin après perturbation de la membrane, le contenu de la vésicule est rejeté vers l'extérieur. Dans le cas de l'endocytose, il est nécessaire qu'une vésicule se forme à l'extérieur, soit directement introduite dans l'organisme (tensioactif de synthèse) soit par détachement graduel de la membrane cellulaire. On décrit classiquement trois formes d'endocytose : la phagocytose, la pinocytose et l'endocytose par récepteurs interposés. Ces trois formes ne seront pas décrites ici en détails.

Il est maintenant accepté que le processus de pénétration du complexe ADN/lipide dans la cellule fasse appel à l'endocytose plutôt qu'à un phénomène de fusion du complexe avec la membrane cellulaire comme cela avait été précédemment décrit¹³⁻¹⁵. Plusieurs équipes ont montré ce phénomène en utilisant des tests biologiques ou une visualisation à l'aide de la microscopie électronique^{16,17}. Les travaux de Matsui *et al.*¹⁸ montrent l'importance de la charge négative de la membrane cellulaire et de la capacité d'endocytose dans le mécanisme d'entrée du complexe dans la cellule.

3. Objectifs de la vectorisation

Il est nécessaire de rendre les oligonucléotides suffisamment stables au sein de l'organisme et de leur éviter d'être éliminés trop rapidement par le système immunitaire. Ces problèmes de stabilité et d'adressage se posent comme pour le transport des autres molécules thérapeutiques et il est donc nécessaire de les vectoriser. Le vecteur idéal doit répondre aux critères suivants¹⁹ :

- Il doit être facile à produire à l'échelle industrielle par des méthodes simples et sécurisées. Il doit également être le moins onéreux possible.
- Il doit être non immunogène et permettre ainsi des administrations répétées.
- Il doit être spécifique des cellules cibles visées.
- Il doit pouvoir s'adapter à la taille de l'oligonucléotide à transporter
- Il doit pouvoir déstabiliser la membrane cellulaire et permettre l'introduction de l'oligonucléotide dans la cellule (phénomène de transfection).
- Il doit se dégrader et s'éliminer facilement de l'organisme.

Actuellement, le vecteur idéal n'existe pas et d'après les recherches nombreuses dans le domaine il serait plus juste de penser que les vecteurs qui seront utilisés dans l'avenir seront spécifiques à une ou plusieurs pathologies et/ou à un type de cellule donné. De plus ils seront choisis suivant le type d'oligonucléotide à transporter (taille, interactions vecteur-ARN...).

Il existe deux principaux types de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les plus utilisés à l'heure actuelle sont les vecteurs viraux car leur efficacité à insérer l'information génétique est encore, pour le moment, beaucoup plus importante que celle des vecteurs non-viraux ou synthétiques. Cependant, ils présentent de nombreux inconvénients et les recherches concernant les vecteurs non-viraux sont particulièrement nombreuses.

4. Les vecteurs viraux

Ce sont les premiers à avoir été utilisés et ils restent encore aujourd'hui les plus efficaces. Ces vecteurs sont des virus, connus pour leur capacité à insérer une information génétique au sein des cellules et de se répliquer sans se disséminer dans l'organisme. On peut par exemple citer le succès de l'équipe d'O. Banos sur la myopathie de Duchenne²⁰. Cette maladie se caractérise par l'absence de production, par les muscles, de la protéine appelée dystrophine. Un mois après une simple injection

du gène écourté de la dystrophine dans un virus associé aux adénovirus, 80% des fibres musculaires ont sécrété la protéine à un taux normal et fonctionnel. Cette thérapie a permis de corriger les effets de la maladie : les animaux ont retrouvé leurs propriétés mécaniques. Bien sûr avant d'utiliser des virus comme vecteurs il est indispensable d'éliminer leur caractère pathogène ainsi que leur pouvoir de réplication et de dissémination responsables de l'infection. Pratiquement, de manière simplifiée, on remplace les gènes viraux du virus par le gène d'intérêt à insérer dans les cellules.

a) Les différents virus

Il existe plusieurs types de virus utilisés pour le transport de gène ou d'ARN. Le tableau 2 regroupe les principales classes de virus utilisés.

Nom du vecteur	Avantages	Inconvénients
Adénovirus	Transfection des cellules quiescentes et en division Forte efficacité de transfection dans beaucoup de tissus Production aisée	Taille limite de l'oligonucléotide 7.5 kb Réadministration impossible Durée d'expression courte
Rétrovirus	Durée d'expression assez longue Peu immunogène	Transduction des cellules en division seulement Taille limite du gène 8 kb Production difficile
Lentivirus	Transfection des cellules quiescentes et en division Expression à long terme	Taille limite du gène 8kb Production difficile Encore immunogène
AAV	Transfection des cellules quiescentes et en division Expression à longue durée in vivo Peu immunogène	Réadministration impossible Taille limite du gène 5kb Production moyenne
Herpes Simplex HSV-1	Large capacité 40kb Transfecte les cellules en division ou non	Tropisme naturel pour les neurones

Tableau 2 : Différents types de virus utilisés comme vecteurs

b) Les problèmes liés aux vecteurs viraux

Les vecteurs viraux présentent une efficacité bien supérieure aux vecteurs non-viraux et c'est pourquoi ils représentent 70% des essais cliniques (thérapie génique incluse). Cependant, ils ont des inconvénients majeurs communs qui poussent la communauté scientifique à développer des vecteurs non-viraux.

- La production en grande quantité

La production de masse de ce type de vecteur est très difficile pour des raisons de biosécurité. De plus les rendements sont souvent assez faibles et le coût de production est important.

- La réponse immunitaire

L'inconvénient majeur de ces vecteurs est lié à leur nature virale qui active le système immunitaire de défense de l'organisme, souvent encore de manière aléatoire.

Il est difficile de savoir si les améliorations continues de ces vecteurs viraux pourront remédier à ces problèmes inhérents à leur nature. C'est pourquoi des vecteurs non viraux ont été développés en parallèle.

5. Les vecteurs non-viraux

Les vecteurs non-viraux sont des vecteurs synthétiques chimiques ou des méthodes physiques permettant le remplacement des virus pour l'introduction d'oligonucléotides dans les cellules. Leur développement est en plein essor au vu de l'abondance d'études dans la littérature.

Tout d'abord il existe plusieurs techniques physiques qui se développent pour apporter l'information génétique dans les tissus ou les cellules en particulier les plasmides. Voici une liste non exhaustive de ces techniques :

a) L'ADN nu

C'est le système d'administration le plus simple et le moins cher. C'est également la méthode la plus sûre car l'absence de vecteurs réduit les risques de réponse immunitaire de l'organisme. C'est en 1990 que Wolff et al. ont montré qu'un ADN nu injecté directement dans le muscle permet une expression efficace pendant plusieurs mois du transgène par les fibres musculaires²¹. Cependant, l'ADN n'est pas protégé et peut donc être facilement dégradé par les DNAses. Il est donc nécessaire d'injecter des quantités importantes pour obtenir une réponse significative²². De plus elle présente

une très faible capacité à transférer même dans le muscle. L'application principale de l'injection d'ADN nu est la vaccination car elle permet l'induction de réponses immunitaires protectrices. Cette technique n'est pas seulement limitée aux muscles ; elle est applicable à la peau²³, au foie²⁴ et au cerveau²⁵ ...

b) Les méthodes d'injection physiques

Elles regroupent toutes les méthodes utilisant une ingénierie physique ou des propriétés physiques permettant d'améliorer l'administration d'oligonucléotides dans les cellules ou les tissus. Voici une liste des techniques les plus étudiées.

Le phosphate de calcium : C'est une des techniques les plus classiques et les moins chères, elle a été découverte en 1977 par S. Bacchetti et F. L. Graham²⁶. Une solution saline tamponnée doublement concentrée et contenant des ions phosphate est combinée avec une solution de chlorure de calcium contenant l'ADN à transférer. Lorsque ces deux solutions sont combinées, il se forme un fin précipité de phosphate de calcium, liant l'ADN à transférer à sa surface. La suspension contenant le précipité est alors ajoutée aux cellules à transférer. Par un procédé non entièrement compris, les cellules incorporent le précipité contenant l'ADN (les ions Ca^{2+} masquent la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans la cellule).

*Le pistolet à gène*²⁷ : Cette technique consiste à envoyer des particules d'or ou de tungstène recouvertes d'ADN directement dans le cytoplasme des cellules cibles, voir dans le noyau. Cette méthode est surtout utilisée dans le domaine végétal dans le but de créer des organismes génétiquement modifiés (OGM). Son inconvénient majeur reste le faible taux de transfection in vivo.

*L'injection sans aiguille*²⁸ : Elle est réalisée sous haute pression, grâce à un système fonctionnant à air comprimé. Utilisé depuis plusieurs années ce système permet une bonne pénétration dans les tissus, meilleure qu'avec une aiguille ou un pistolet à gène. De nouvelles avancées permettent d'éviter le risque de contamination entre patient (risque qui été faible toutefois).

L'électrotransfert : Cette technique apparaît comme une bonne alternative aux vecteurs viraux depuis 1984 après les travaux de H. Potter²⁹. Elle consiste à appliquer de courtes impulsions d'un champ électrique, après injection locale d'ADN. Ceci induit une perméabilisation des membranes cellulaires et un effet électrophorétique qui permet la

migration de l'ADN³⁰. Les résultats dépendent des différents paramètres à prendre en compte comme la quantité d'ADN, la durée et le voltage des impulsions, la nature de l'électrode et l'orientation du champ électrique par rapport aux cellules. Cette méthode permet une expression du transgène supérieur à l'ADN nu ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules transfectées. Elle est surtout utilisée sur le tissu muscle mais également sur la cornée, le foie, la peau³¹...Cependant une réaction inflammatoire non négligable est observée sur les tissus perméabilisés.

Les ultrasons : Cette technique améliore également le transfert de gène après injection locale. Il a été montré que les ultrasons induisent la formation de pores dans les membranes cellulaires et facilite la translocation de l'ADN³². La méthode est non invasive et est particulièrement intéressante pour des applications cliniques.

Le laser : Autre source d'énergie facilitant l'entrée du plasmide ou de l'ADN dans le cytoplasme, le laser permet d'avoir une expression prolongée du gène sans dommage dans les tissus et sans effets secondaires³³.

La magnétofection : Cette méthode utilise des nanoparticules paramagnétiques placées dans un champ magnétique et permet d'accumuler les vecteurs associés sur la membrane des cellules et donc d'augmenter la capacité de transfection³⁴. Cependant elle reste une méthode récente et nécessite encore quelques études complémentaires.

Toutes ces méthodes physiques sont encore à leur stade de développement et s'améliorent continuellement. L'électrotransfert est la technique la plus utilisée du fait de son efficacité démontrée dans un grand nombre de tissus. Néanmoins elle demande un matériel spécifique et des personnes qualifiées contrairement aux vecteurs synthétiques qui ne demandent qu'une simple injection. D'autres recherches s'orientent donc vers le design et la préparation de ces vecteurs synthétiques afin d'obtenir l'architecture requise pour une efficacité thérapeutique maximale.

c) Les vecteurs synthétiques

Alors que les virus possèdent déjà une structure bien définie qu'il suffit de modifier, les vecteurs synthétiques doivent être construits de toutes pièces. L'objectif avec la mise au point de ce type de vecteur est de remplacer les virus pour éviter l'apport viral tout en gardant leur efficacité pour intégrer l'information génétique dans des cellules. Ils présentent les avantages suivants :

- ❖ Facilité de production en grande quantité et coût de production relativement faible.
- ❖ Possibilité d'administration répétée car il n'y a pas de réponse immunitaire spécifique.
- ❖ Absence de risques dus à une recombinaison virale.

Actuellement il existe une multitude de vecteurs synthétiques à l'étude^{35,36} comme par exemple les lipides cationiques (lipoplexes), les polymères cationiques (polyplexes), les lipides anioniques avec agent de condensation cationique, les vecteurs neutres par masquage des charges de surface, les sphérulites, les fullerènes fonctionnalisés, les calixarènes fonctionnalisés, les billes de latex cationiques et des particules inorganiques. Cette liste n'est pas exhaustive mais voici quelques précisions sur certains d'entre eux.

Les fullerènes fonctionnalisés : Les applications des fullerènes ne cessent de se développer ces dernières années mais peu d'exemples d'utilisations comme vecteurs d'oligonucléotides sont parus dans la littérature. Pourtant ces molécules peuvent être fonctionnalisées et elles peuvent former des particules à l'échelle nanométrique³⁷. Des travaux utilisant des fullerènes, fonctionnalisés avec un ou plusieurs motifs ammoniums, comme vecteurs montrent qu'ils sont capables de condenser³⁸ et de protéger l'ADN dans le cytoplasme et qu'ils ont une meilleure capacité à transfecter³⁹ les cellules que la lipofectamine, un agent de transfection commercial.

Les calixarènes fonctionnalisés : Ces macromolécules, fonctionnalisées avec des motifs amines ont la capacité d'interagir avec l'ADN par interactions électrostatiques lorsqu'ils forment des films monomoléculaires à l'interface air/eau. L'interaction avec l'ADN provoque une expansion du film lorsque la concentration d'ADN augmente⁴⁰.

Les billes de latex : Ces dispersions de billes de polymère, souvent produits par polymérisation en émulsion et entourées d'une couronne de contre ions de type tensioactif bolaforme avec une tête polaire sucre, montrent également un pouvoir complexant vis-à-vis de l'ADN⁴¹. De plus, la partie modulable sucre de la tête polaire est une méthode intéressante pour cibler un type particulier de cellules à transfecter.

Les particules inorganiques : Un exemple de particule inorganique étudiée pour la délivrance de gènes sont les montmorillonites modifiées⁴². Ces particules inorganiques sont des silicates d'aluminium hydratés avec une structure en couche bidimensionnelle. L'espace entre les deux couches s'appelle « l'espace intercouche » et il est trop petit pour certains oligonucléotides. De plus la surface de ces particules est chargée négativement comme l'ADN ce qui entraîne une répulsion

électrostatique. La solution est d'intercalé un tensioactif cationique qui sert de dilatateur et qui permet une complexation avec l'ADN.

Les polymères cationiques : Grâce à leurs charges positives, ce type de polymères est également capable de former un complexe avec l'ADN appelé polyplexe et de transférer les cellules. Les plus fréquents sont les poly L-lysine (PLL) et les polyéthylèneimine (PEI) dont la structure est donnée après. La PEI, le polymère le plus connu, est même commercialisé dans une forme branchée sous le nom de Jet-PEI (Polyplus-transfection, Strasbourg, France) et dans une forme linéaire sous le nom Exgen 500 (Fermentas Life Science, Ontario, Canada) moins toxique. Bien que très efficace *in vitro* et *in vivo*, l'excès de charges favorise l'interaction non spécifique avec la membrane cellulaire⁴³. La diminution de sa taille a permis de diminuer sa toxicité en conservant sa capacité à transférer⁴⁴.

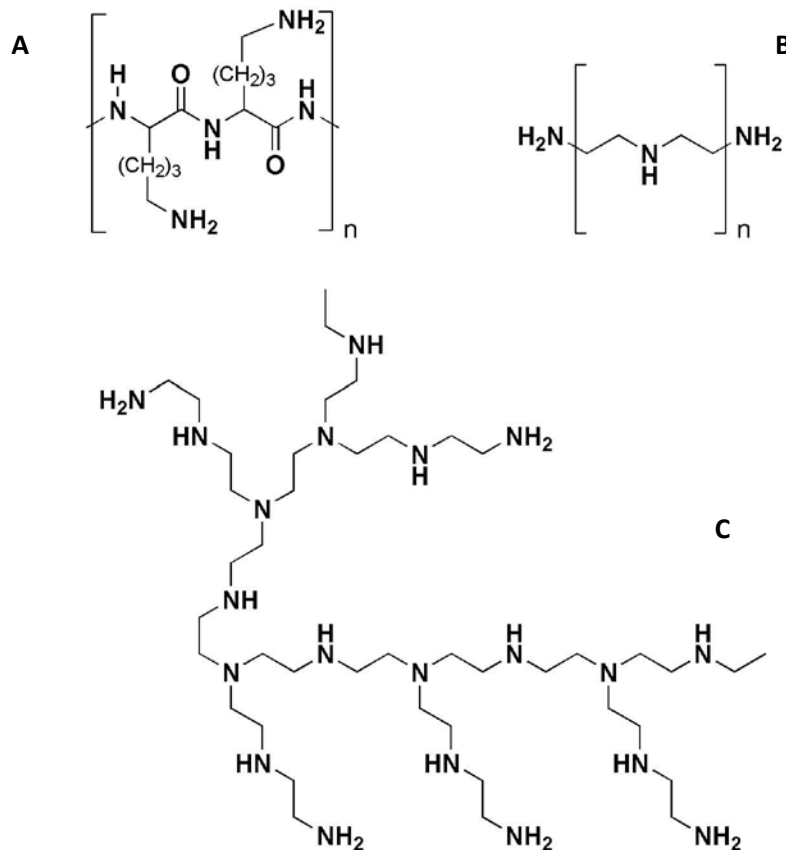


Figure 2 : Structure des principaux polymères cationiques, A : PEI linéaire, B : PLL, C : PEI branchée

Les lipides cationiques : De nombreux travaux ont été menés pour trouver d'autres types de vecteurs synthétiques permettant une bonne vectorisation des oligonucléotides, un ciblage efficace vers les cellules visées et une faible toxicité. Les plus développés actuellement sont les lipides cationiques⁴⁵ (tensioactifs cationiques) qui sont capables comme les polymères cationiques⁴⁶ de complexer l'ADN grâce à leurs charges positives, de le compacter pour engendrer des particules appelées lipoplexes

ou polyplexes et de pénétrer les cellules grâce à leurs interactions avec les membranes cellulaires anioniques hydrophobes. Ce type de vecteurs sera détaillé dans la partie suivante.

Il est très difficile de comparer les vecteurs synthétiques entre eux. En effet leur efficacité et leur toxicité dépendent de nombreux paramètres tels que la structure chimique du vecteur, la formulation des systèmes vecteur/ADN et la nature des cellules visées. S'y rajoute les nombreux facteurs liés au passage *in vitro in vivo* qui ont aussi une forte et difficilement prévisible incidence sur l'efficacité des vecteurs. Le challenge des vecteurs synthétiques est donc d'acquérir les propriétés structurales qui leur permettront de résister aux milieux extracellulaires, de cibler les cellules et d'y libérer efficacement l'oligonucléotide.



Figure 3 : Exemples d'architectures permettant la complexation d'ADN ou d'ARN. De gauche à droite, fullerène, billes de latex et nanotube de carbone.

En conclusion, les vecteurs synthétiques présentent l'inconvénient d'être beaucoup moins efficaces au niveau thérapeutique que les vecteurs viraux et ceci est lié à un problème de transfection. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux vecteurs synthétiques et de comprendre les relations entre l'architecture du système utilisé et les effets biologiques observés. De plus, il est essentiel de mettre au point des vecteurs pour délivrer des « petits ARN » car la plupart des agents à disposition sur le marché ont été créés pour la transfection de grands plasmides d'ADN.

C. Les vecteurs supramoléculaires dérivés de molécules amphiphiles

1. Historique

Historiquement, le concept de liposome est rattaché aux observations⁴⁷ de Dimitriadis en 1965, qui étudiait les phospholipides, composants majoritaires des membranes cellulaires. Il découvrit que ces molécules avaient la propriété de former des assemblages globulaires en contact de l'eau. Ces assemblages portent le nom de liposomes⁴⁸ ou vésicules lorsqu'il s'agit de molécules de

synthèse. Dès 1979, G.J. Dimitriadis⁴⁹ utilisa les liposomes comme une « enveloppe » pour y incorporer de l'ADN mais sans utiliser de lipide chargé. Par la suite, J.P. Behr⁵⁰ démontra qu'un lipide cationique protoné à pH physiologique et assemblé en liposome pouvait complexer l'ADN et le condenser. L'année suivante, Felgner et ses collaborateurs⁵¹ réalisèrent les premières expériences de lipofection (transfection cellulaire) par le biais de liposomes. Ce liposome (Lipofectine) est devenu le premier vecteur liposomal distribué commercialement et il est encore utilisé de nos jours. C'est un mélange d'un lipide cationique et d'un lipide neutre, respectivement le DOTMA (1,2-dioléoxypropyl-3-triméthylammonium) et le DOPE (dioléoyl phosphatidyléthanolamine) en proportion 1 : 1.

Depuis ces premières études, de nombreux tensioactifs cationiques ont été développés et testés avec succès, que ce soit en modifiant la nature cationique, la partie hydrophobe ou la formulation avec un co-lipide. Ce champ de recherche reste très actif et la diversité des formulations pouvant être testées ou restant à découvrir est très vaste.

Les travaux de vectorisation évoluent vers l'utilisation d'approches combinées entre différents vecteurs synthétiques : liposomes liés à des peptides, liés à des polymères cationiques. Mais d'autres études sont faites en cherchant une architecture particulière des amphiphiles pour répondre à différents problèmes : accumulation de charges, toxicité ou relargage de l'ADN...

2. Les tensioactifs : définition et caractéristiques

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules abaissant la tension interfaciale. Ce sont des molécules dites amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles sont composée de deux parties : une partie apolaire dite hydrophobe ou lipophile⁵² et une partie polaire dite hydrophile.

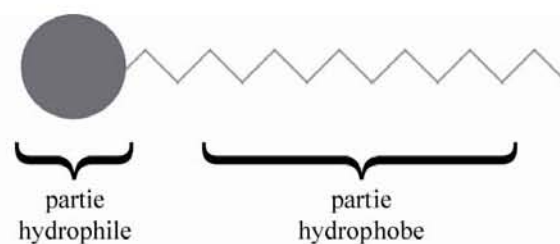


Figure 4 : Représentation schématique d'un tensioactif

De manière générale, les composés polaires se solubilisent préférentiellement dans des solvants polaires tandis que les dérivés apolaires ont une affinité plus importante pour les solvants apolaires, ceci du à la diminution d'énergie du système qui permet d'obtenir l'interaction solvant-soluté maximum. Cette caractéristique de structure apporte des propriétés de surface à ce type de

composés. En effet, un tensioactif a tendance à se placer à l'interface lorsqu'il est mélangé à un solvant polaire ou apolaire. C'est cet effet qui explique leurs multiples applications : détergence, étalement, émulsification, dispersion, agent de moussage...

Dans un mélange eau / huile (l'huile représentant ici une phase apolaire de type hydrocarbure) les molécules amphiphiles se placent à l'interface avec leur partie polaire orientée vers l'eau et leur partie hydrophobe orientée vers l'huile et cette disposition permet d'abaisser la tension interfaciale entre les deux phases. Lorsqu'ils sont solubilisés dans l'eau, c'est l'air qui joue le rôle de la phase apolaire. Au-delà d'une certaine concentration propre à chaque produit, appelée concentration agrégative critique CAC, des agrégats se forment : micelles, bicouches, vésicules... A cette concentration l'interface est saturée de molécules de tensioactifs. Les molécules solubilisées dans l'eau s'arrangent donc afin de diminuer la surface de contact entre la partie hydrophobe et l'eau pour former des micros domaines en solution. L'agrégation est accompagnée d'une diminution de l'entropie du système du fait de la diminution de mobilité des amphiphiles dans l'agrégat. Cependant, l'agrégation des tensioactifs entraîne le relargage de molécules d'eau, qui formaient une couche d'hydratation hautement organisée autour des parties hydrophobes des molécules, provoquant ainsi un désordre illustré par une augmentation de l'entropie du système.

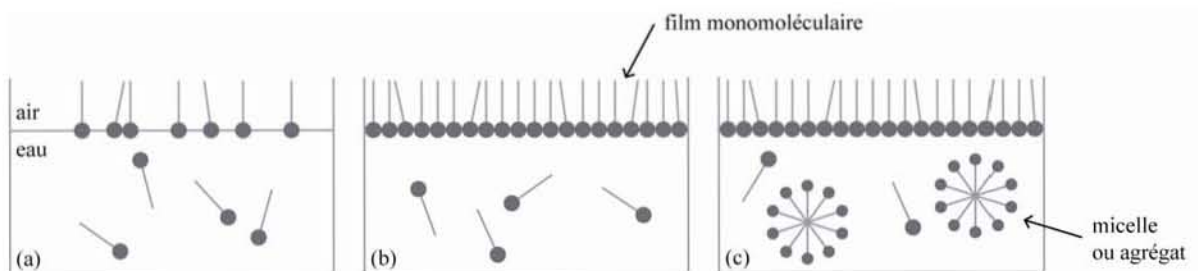


Figure 5 : Comportement des tensioactifs en milieu aqueux

Pour les micelles on observera donc dans l'eau des micelles dites « directes » où les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur et les chaînes hydrophobes sont rassemblées au cœur des micelles. Dans l'huile, les micelles sont dites « inverses » où cette fois les parties polaires sont dirigées vers le cœur de la micelle. Pour la plupart des agents de surfaces on observe une inflexion au niveau de la CAC pour certaines propriétés physiques. La connaissance de la CAC est donc une donnée très importante pour l'utilisation des tensioactifs.

a) Classification des tensioactifs

On peut classer les tensioactifs en fonction de leur tête polaire, de leur chaîne hydrophobe ou bien encore suivant leur structure générale.

(1) En fonction de la tête polaire

C'est le système de classification le plus utilisé. On classe alors les amphiphiles dans quatre grandes catégories : les dérivés anioniques, cationiques, amphotères et non-ioniques.

Les agents de surface anioniques sont les premiers à avoir été préparés et ils sont surtout les plus utilisés dans le monde⁵³. Ces molécules forment des anions tensioactifs dans l'eau (carboxylate, sulfate, sulfonate...) associés à un contre ion généralement un métal alcalin. Ces agents de surface représentent plus de la moitié de la production de tensioactifs dans le monde en raison de leurs utilisations dans le domaine de la détergence^{54,55}, comme savon ou comme moussant et dispersant. De plus ils rentrent dans les ingrédients de base des produits d'hygiène et cosmétiques⁵⁶.

Les agents de surface cationiques forment des cations amphiphiles lorsqu'ils sont solubilisés dans l'eau, il s'agit souvent d'ammonium. Ils sont surtout utilisés comme adoucissants dans l'industrie du textile mais ils ont également des propriétés bactériostatiques et émulsionnantes. Ils sont plus chers car leur production et les réactifs mis en œuvre ont un coût plus élevé.

Les agents de surface amphotères sont chargés à la fois négativement et positivement, ce sont des molécules zwitterioniques⁵⁷. Suivant le pH du milieu ils se comportent comme un tensioactif cationique ou anionique. Ils sont moins agressifs et moins irritants sur le plan biologique. Ils sont utilisés comme détergents ou produits d'hygiène plus délicats par exemple pour les peaux sensibles.

Les agents de surface non-ioniques ne forment pas d'ions en solution dans l'eau, leur solubilité est due à la présence de motifs polaires (éthylène glycol par exemple). Ils sont souvent utilisés en formulation avec des tensioactifs ioniques et sont souvent moins toxiques. Ils sont souvent utilisés comme détergents.

Classes	Volume de production en Europe (10 ³ t)	Pourcentage en Europe	Pourcentage dans le monde
Anioniques	970	40%	> 60%
Non ioniques	1245	51%	30%
Cationiques	179	7%	< 10%
Amphotères	57	2%	
Total	2451	100%	100%

Tableau 3 : Répartition des différentes classes de tensioactifs en Europe et dans le monde 1999 (statistiques CESIO, 1999 et Dolkemeyer, 2000)

Application	Volume mondial de production (10 ³ tonnes)	Pourcentage de la production totale
Détergence ménagère	6160	56%
Marché des industries techniques et agricoles	2970	27%
Détergence industrielle	990	9%
Hygiène corporelle et cosmétique	880	8%
Total	11000	100%

Tableau 4 : Répartition du marché mondial des tensioactifs suivant les débouchés (Rapport de l'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie – ADEME 2000)

(2) En fonction de la chaîne hydrophobe

La partie hydrophobe d'un tensioactif est souvent constituée d'une ou plusieurs chaînes alkyles hydrocarbonées. Cette chaîne peut contenir des hétéroatomes comme du silicium ou du fluor et permet donc de classer suivant ces critères.

Les tensioactifs hydrocarbonés :

Ils peuvent être d'origine naturelle (acides gras, huiles végétales, bois...) ⁵⁸ ou synthétique et contenir une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, linéaire ou ramifiée, ou encore cyclique, aromatique ou non. Ils sont les premiers à avoir été étudiés et synthétisés. En général pour qu'une molécule ait un pouvoir tensioactif, il faut que la chaîne hydrocarbonée comporte entre 6 et 18 atomes de carbones. En dessous de cette valeur, la partie hydrophobe n'apporte pas un effet hydrophobe assez important. Si la chaîne comporte plus de 18 atomes de carbone c'est la solubilité dans l'eau qui devient limitée.

Les tensioactifs siliconés :

L'atome de silicium apporte une hydrophobie supplémentaire par rapport à l'atome de carbone. Ce type de tensioactif est souvent composé de copolymères ⁵⁹ de polysiloxanes. Ce sont de bons moussants et ils permettent d'obtenir des isolants de forte densité.

Les tensioactifs fluorocarbonés :

Ces molécules comportent au moins un atome de fluor dans la partie hydrophobe ⁶⁰. Si la chaîne ne comporte que des atomes de fluor, on parle de chaînes « perfluorées » ou fluorocarbonées. Le fait d'avoir des atomes de fluor dans la partie hydrophobe apporte de nombreux intérêts à la molécule

(cette partie sera développée plus loin). Ils sont moins répandus que leur homologues hydrogénés mais leur utilisation devient de plus en plus importante dans différents domaines (transport d'oxygène, domaine médical...).

Les tensioactifs hybrides :

Une molécule amphiphile est dite hybride lorsqu'elle est composée de groupes hydrophobes de nature différente. Par exemple une chaîne hydrocarbonée et une chaîne fluorocarbonée⁶⁰. On peut ainsi cumuler les effets de chacun et d'obtenir des nuances ou une plus grande variété de propriétés physiques.

(3) En fonction de sa structure générale

Les molécules amphiphiles peuvent également être classées suivant leur architecture, selon qu'elles comportent une ou plusieurs chaînes grasses, une ou plusieurs têtes polaires ou encore les deux à la fois. Le tableau suivant récapitule les grandes familles de structures de tensioactifs.






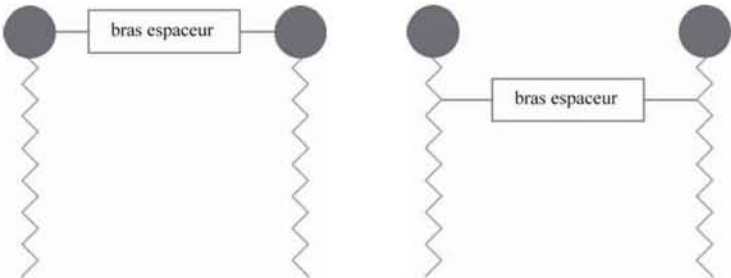
Structure du tensioactif	nom
	monocaténaire
	bicaténaire
	tricaténaire
	Bolaforme simple chaîne
	Bolaforme double chaîne
	Géminés

Tableau 5 : Les différentes structures de tensioactif

La nature des agrégats formés dans l'eau dépend étroitement de la structure des tensioactifs, de l'hydratation des groupements polaires, des interactions intermoléculaires, de la température et de la concentration. Ainsi par exemple les tensioactifs monocaténaires forment essentiellement des micelles alors que les tensioactifs bicaténaires forment des vésicules ou des bicouches. Plus précisément la forme des agrégats dépend du paramètre d'empilement décrit par Israelachvili, $g = V / A_0 l$ qui permet de prévoir l'arrangement le plus probable des agrégats formés à partir de la surface par tête polaire de l'amphiphile A_0 , de la longueur de la chaîne étirée l et du volume moléculaire V^{61} . Les différentes géométries ainsi que leur mode d'organisation respectif sont représentés dans le tableau suivant :

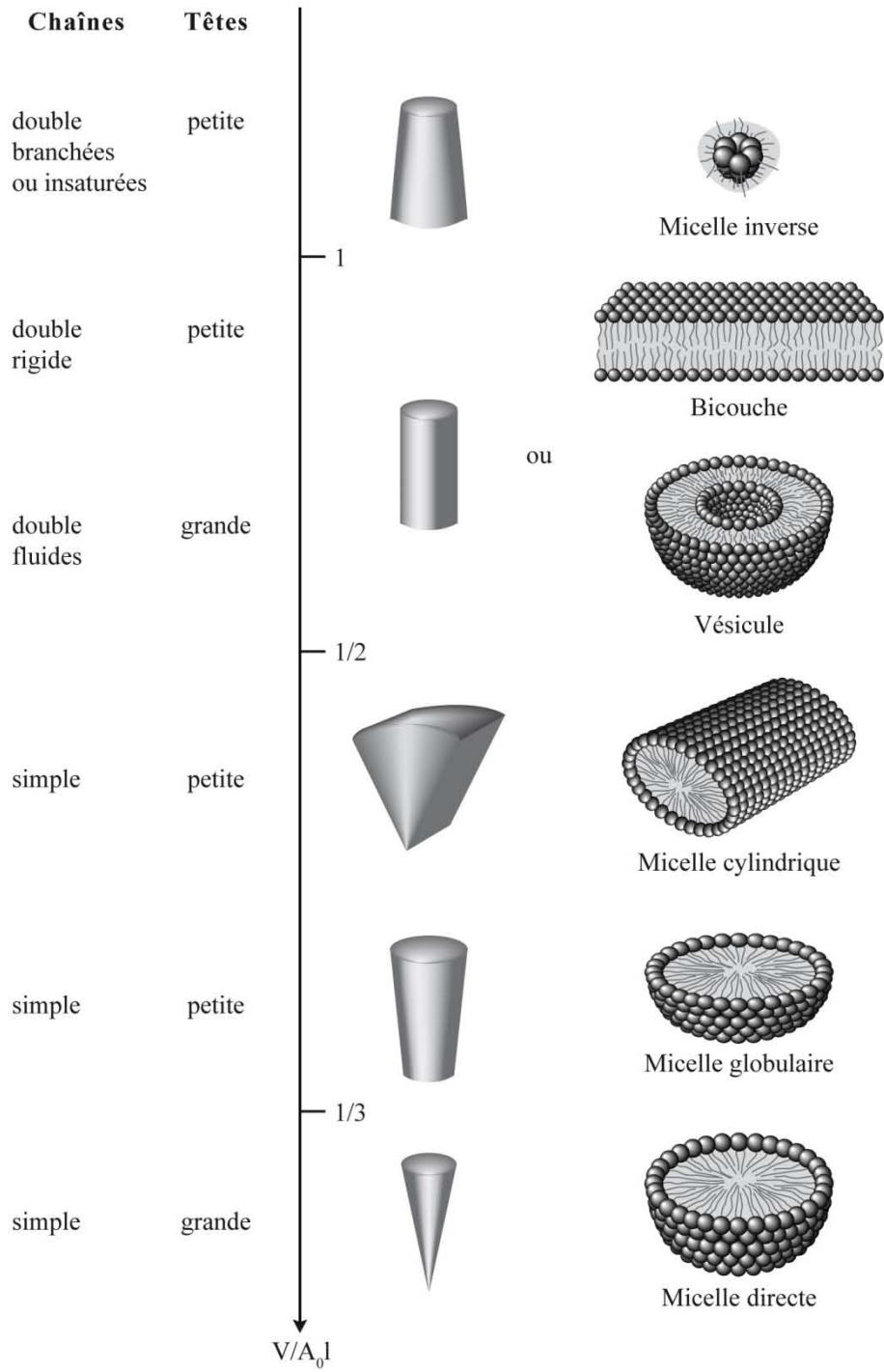


Figure 6 : Exemple de structures des agrégats formés par les tensioactifs en fonction du paramètre d'empilement

b) Applications des agents de surface

Les tensioactifs sont devenus indispensables dans le monde aujourd'hui. Ils sont présents dans tous les secteurs industriels, que ce soit directement comme matières premières ou comme produits auxiliaires, où que ce soit dans la vie de tous les jours. Leurs nombreuses applications, shampoing, détergents, textile, alimentaire, photographie, peintures,..., dépendent des différentes propriétés des tensioactifs.

(1) Propriétés des agents de surface

Le pouvoir solubilisant : Les solutions d'agents de surface à des concentrations supérieures à leur CAC permettent d'augmenter dans certains cas la solubilité apparente de composés peu ou pas solubles dans l'eau soit en les incluant dans les micelles, soit en formant des micelles mixtes. Ce phénomène est mis à profit pour certaines formulations comme la teinture des fibres polyester ou pour la polymérisation en émulsion.

Le pouvoir moussant : Il est lié aux caractéristiques mécaniques des films superficiels qui constituent les parois des bulles de la mousse. Certains tensioactifs forment des couches interfaciales suffisamment résistantes pour ne pas céder à la pression interne de l'air emprisonné et à la pression externe des molécules d'eau mais également assez élastique pour encaisser les chocs mécaniques. Cette propriété est surtout utilisée pour les détergents, les shampoings, les boues de forage et les mousses extinctrices.

Le pouvoir antimousse : A l'opposé, les antimousses se rassemblent aux interfaces et font chuter les propriétés mécaniques des films superficiels.

Le pouvoir émulsionnant : Il permet de disperser et de maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible. Cette propriété est utilisée essentiellement en cosmétique pour disperser des principes actifs issus de corps gras dans l'eau.

Le pouvoir mouillant : Il augmente l'étalement d'un liquide sur une surface lisse et augmente la vitesse de pénétration dans les matériaux poreux. On utilise ce type de produit dans le blanchissement des textiles par exemple.

Le pouvoir dispersant : Il augmente la stabilité des suspensions de petites particules solides dans un liquide en évitant leur agrégation comme par exemple pour les pigments de peinture.

Le pouvoir détergent : Il permet aux agents de surface de détacher d'un support les produits qui le souillent et de les maintenir en dispersion. Il résulte de l'action conjugué du pouvoir mouillant, émulsionnant et dispersant.

Cette liste de propriétés n'est pas exhaustive, les tensioactifs peuvent avoir d'autres propriétés comme un pouvoir antistatique, épaississant ou encore lubrifiant... ce qui explique la diversité de leurs applications.

(2) Domaines d'applications

L'utilisation des tensioactifs est devenue quotidienne pour tout le monde et elle se répartit sur une large gamme de domaine d'application. Le tableau suivant donne un aperçu de l'utilisation des tensioactifs dans différents domaines au niveau mondial.

	Valeur (en millions de livres Sterling)	Volume (en millions de tonnes)
Détergents ménagers	3200	4240
Produits de nettoyage industriels et	490	570
Soins personnels	1130	960
Produits antiparasitaires	310	200
Champs de pétrole	440	460
Peintures et revêtements	160	170
Ensimage de filature	230	170
Produits auxiliaires pour le textile	510	530
Construction	220	500
Polymérisation en émulsion	280	310
Produits alimentaires	225	220
Additifs plastiques	65	40
Pâtes et papiers	110	120
Autres	830	630
Total	8200	9120

Tableau 6 : Secteurs de consommation des tensioactif (source Unichema, 2000)

Secteur domestique : Il représente plus de 50% de la consommation en tensioactifs. En effet, ils sont présents dans la plupart de nos produits de consommation, essentiellement dans les produits pour l'hygiène et l'entretien.

Secteur de la chimie : La chimie représente elle 30% de l'utilisation industrielle de tensioactifs. Ceux-ci sont utilisés pour améliorer les procédés et réduire les dépenses énergétiques.

Secteur du textile : Cette industrie représente le deuxième consommateur de tensioactifs avec 16% du tonnage. Ici les composés amphiphiles réduisent les frictions au cours du filage, améliorent l'application des couleurs...

L'industrie pétrolière : Les agents de surface servent à ce domaine au cours des forages et pendant les phases de récupérations.

Les autres domaines d'utilisation sont moins importants en termes de quantité, mais l'utilisation de tensioactifs y est tout aussi importante pour améliorer la qualité ou la production : secteur agro-alimentaire, la peinture, la papeterie. Le dernier domaine que l'on peut citer est celui qui nous intéresse le plus dans le cadre de ces travaux : la biologie.

En effet, les tensioactifs sont couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique et médical. On peut relever énormément d'exemples d'utilisation dans la littérature : activité antimicrobienne⁶², propriétés antioxydantes⁶³, propriétés de solubilisation⁶⁴ pour la dépollution des eaux et également l'utilisation des tensioactifs comme vecteurs de principes actifs ou d'oligomères. Dans le domaine médical ils peuvent également servir l'étude théorique en servant de modèle membranaire par exemple.

3. Les tensioactifs utilisés pour la vectorisation de matériel génétique

Ils correspondent aux lipides cationiques. Ce sont des lipides mono ou multivalents (motifs ammonium) possédant une ou deux chaînes hydrogénées de 12 à 18 carbones. Ils peuvent être utilisés seuls ou avec un co-lipide pour aider à la stabilisation. En milieu aqueux, ce type de lipides cationiques s'auto-organise en bicouche, pour minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et l'eau, qui une fois refermée sur elle-même forme des vésicules avec un cœur aqueux permettant le transport de principes actifs hydrophiles ou hydrophobes en s'intercalant dans la bicouche hydrophobe⁶⁵. Le libre passage de macromolécules hydrophiles d'un compartiment à l'autre est quasiment impossible, au contraire celui de quelques solutés hydrophobes ou de petits solutés hydrophiles, qui diffusent librement au travers de la bicouche, est possible⁶⁶⁻⁶⁸. Ce type de

vecteurs interagit avec l'ADN grâce aux motifs ammonium par des forces électrostatiques. Lorsqu'il y a de multiples groupements amine, l'interaction est plus forte mais elle est contrebalancée par une plus grande difficulté à libérer l'ADN une fois entré dans la cellule. De plus, lorsque le nombre d'amine augmente, on observe une accumulation de charges (cytotoxicité) surtout à des concentrations élevées. Malgré tout, en termes d'efficacité de transfection, ce sont les lipides multivalents qui sont le plus utilisés encore actuellement.

La protection et le transport d'oligonucléotides dans l'organisme par des assemblages de lipides cationiques ont montré depuis le début un faible rendement dans la délivrance dans la cellule par rapport aux vecteurs viraux mais l'accident mortel survenu dans le cadre d'un essai thérapeutique en 1999 utilisant un vecteur viral a relancé l'intérêt de la communauté scientifique pour les vecteurs synthétiques en particulier pour les liposomes.

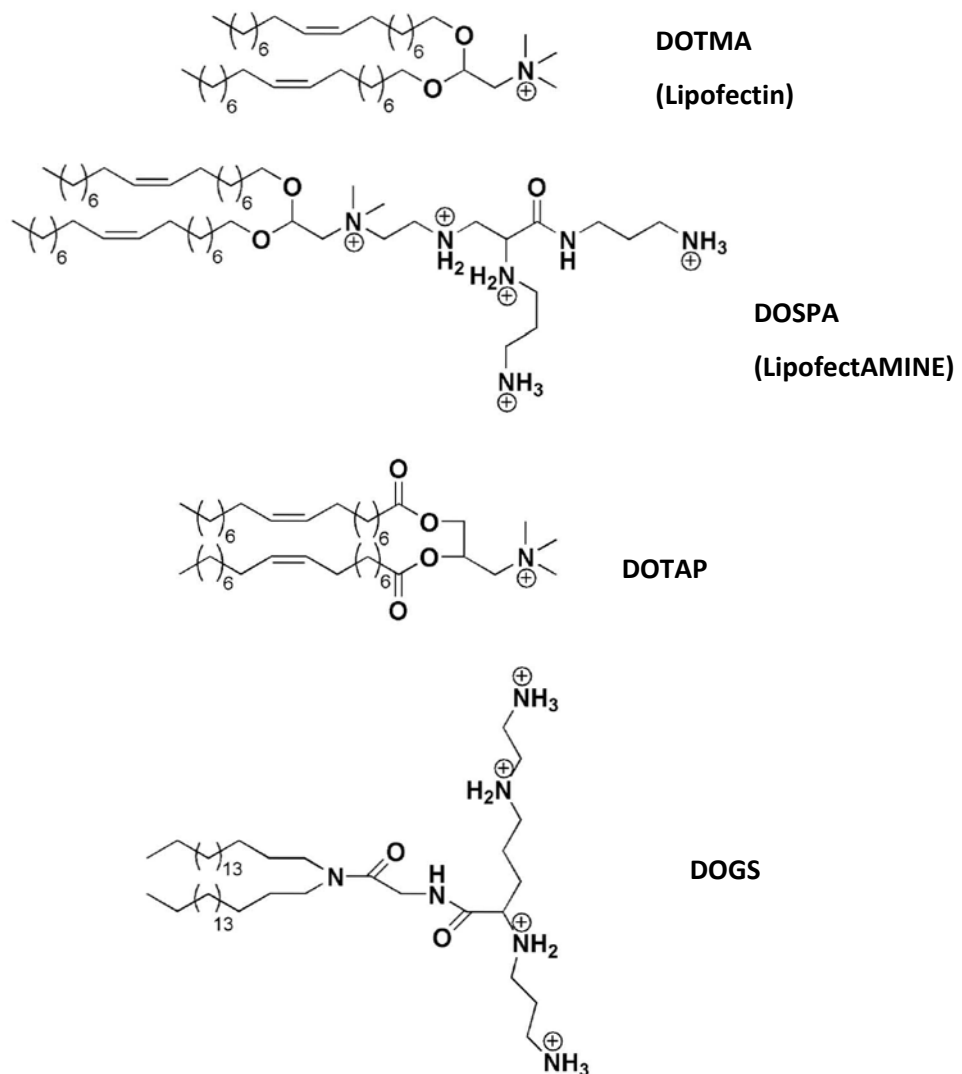


Figure 7 : Exemples de lipides cationiques utilisés pour la vectorisation

4. Composés amphiphiles fluorocarbonés

L'utilisation de tensioactifs possédant une chaîne fluorocarbonée apporte de nombreuses différences par rapport à l'utilisation de leurs homologues hydrogénés. En effet l'atome de fluor donne de nouvelles propriétés physiques aux molécules le contenant.

a) Propriétés des chaînes fluorées

Le fluor possède des caractéristiques extrêmes. Les caractéristiques du fluor élémentaire⁶⁹ sont les suivantes:

- Potentiel d'oxydation élevé : $F_2 + 2e^- \rightarrow 2F^-$, $E_0 = + 2,65 \text{ V}$
- Energie d'ionisation élevée : $F \rightarrow F^+ + e^-$, $E_1 = 401,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
- Affinité électronique élevée : $F + e^- \rightarrow F^-$, $A_E = 83,5 \text{ kcal}$
- Electronegativité élevée : 4 (sur l'échelle de Pauling)
- Faiblement polarisable
- Faible énergie de dissociation $F_2 \rightarrow 2F$, $E_D = 37 \text{ kcal}$

L'atome de fluor est relativement petit mais il est considérablement plus grand que l'atome d'hydrogène (rayon de Van Der Waals 1.47 Å contre 1.20 Å pour l'hydrogène). Les chaînes fluorocarbonées, C_nF_{2n+1} , sont donc plus volumineuses que leurs homologues hydrogénées (section transversale 30 Å² contre 20 Å²). De plus les groupements CF_2 et CF_3 sont plus volumineux^{70,71} 38 Å³ et 92 Å³ respectivement, contre 27 Å³ et 54 Å³ pour les groupements CH_2 et CH_3 .

Une autre propriété des chaînes fluorocarbonées découlant de la plus grande taille des atomes de fluor est leur plus grande rigidité. Elles adoptent une conformation essentiellement « all-tans » et hélicoïdale. Cette rigidité est responsable des températures de fusion plus élevées des tensioactifs fluorés par rapport à celles de leurs homologues hydrogénés. En revanche, les températures d'ébullition sont plus faibles pour les composés perfluorés. Ceci est dû à la faible polarisabilité du fluor ainsi qu'aux forces d'attraction relativement faibles entre les atomes de fluor.

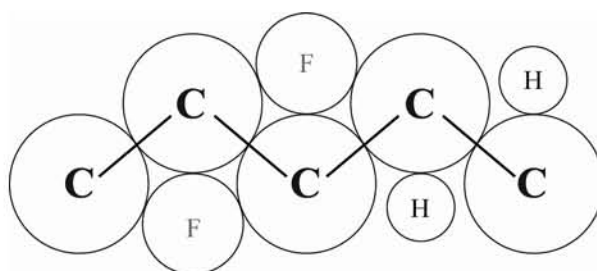


Figure 8 : Représentation des effets stériques dans les fluorocarbures

On peut noter également que la liaison C-F est la liaison la plus stable en chimie organique (485 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport à 425 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour une liaison C-H standard). De plus cette liaison est polarisée à l'inverse d'une liaison C-H. Enfin la fluoration renforce aussi les liaisons C-C adjacentes.

Les composés fluorés sont par conséquent plus stables thermiquement que leurs homologues hydrogénés. Ils résistent également mieux aux acides, aux bases et aux agents oxydants et réducteurs. Le nuage électronique des atomes de fluor forme une barrière qui protège les chaînes contre l'approche des réactifs⁷², cependant cette stabilité peut évoluer grâce à la présence d'autres groupes fonctionnels sur la molécule.

La présence d'atomes de fluor modifie également l'acidité des composés. Les composés fluorocarbonés sont plus acides que leurs analogues hydrocarbonés en raison de la forte électronégativité du fluor. A structure équivalente, un acide peut, par la présence d'atome de fluor et de son effet électroattracteur perdre deux unités de pKa. Cet effet est ressenti même au-delà de deux groupements méthylène.

Les fluorocarbures possèdent des propriétés originales dues à la faible polarisabilité des atomes de fluor qui conduit à de faibles interactions de Van der Waals entre les chaînes fluorées et à de faibles densités d'énergie de cohésion dans les fluorocarbures liquides : faible tension de surface, excellentes propriétés d'épandage, grande fluidité, faible constante diélectrique, pression de vapeur élevée, grande compressibilité et forte capacité à solubiliser des gaz. Dans le cas de l'oxygène, par exemple, ils solubilisent 25% (en volume) de plus que l'eau⁷³ et sont donc très étudiés comme transporteurs d'oxygène.

Les chaînes fluorocarbonées sont extrêmement hydrophobes mais elles sont également lipophobes en raison de la différence de polarité qui existe avec les chaînes hydrogénées. Elles combinent deux caractéristiques antinomiques.

Pour résumer, les principales propriétés des chaînes fluorocarbonées qui influencent le comportement physico-chimique sont :

- Une grande stabilité thermique et chimique
- Un volume et une aire de la section transversale plus grande que les chaînes hydrogénées
- Un caractère lipophobe et hydrophobe
- Une acidité supérieure aux homologues hydrogénés

b) Avantages des molécules amphiphiles fluorocarbonée :

Les tensioactifs fluorocarbonés montrent une forte activité de surface et une remarquable tendance à s'auto-assembler dans l'eau, en architectures supramoléculaires bien organisées. Ces propriétés proviennent des interactions fortement hydrophobes ainsi que des faibles interactions de Van Der Waals entre les chaînes fluorocarbonées.

Ces tensioactifs sont capables de s'adsorber aux interfaces air/eau pour former soit des films de Gibbs si le tensioactif est soluble dans l'eau, soit des films de Langmuir si il est insoluble. Dans ces deux cas, les films formés sont perpendiculaires à l'interface, plus organisés et plus rigides que les monocouches formées par des tensioactifs hydrogénés. De plus, l'aire minimale par molécule est plus grande dans le cas des tensioactifs fluorocarbonés car leur section transversale est plus grande. Enfin les monocouches formées par des molécules perfluorées sont plus compressibles et s'étalent plus facilement à l'interface air/eau que les monocouches formées par des molécules hydrogénées.

Les concentrations d'agrégation des tensioactifs fluorocarbonés sont plus faibles que leurs homologues hydrocarbonés et ils abaissent d'avantage la tension de surface. On considère qu'un groupement CF_2 a l'effet hydrophobe de $1.5 - 1.7 \text{ CH}_2$. Ils peuvent abaisser la tension superficielle des systèmes aqueux à des valeurs plus basses ($20 - 15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) que les tensioactifs hydrogénés ($40 - 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

Les molécules amphiphiles fluorocarbonées ne peuvent pas être simplement considérées comme plus hydrophobes que leurs homologues hydrogénéocarbonés. Des études montrent que la présence de fluor dans la partie hydrophobe influence l'hydrophilie de la tête polaire.

De plus, les amphiphiles fluorés peuvent conduire à une grande variété d'architectures supramoléculaires comme les vésicules, des tubules, des hélices ou encore des rubans. Grâce à l'effet structurant des chaînes fluorées, les tensioactifs fluorés peuvent former des vésicules stables plus facilement que les tensioactifs hydrogénés. Contrairement aux dérivés hydrocarbonés, les molécules fluorées monocaténares (ne comportant qu'une seule chaîne grasse) peuvent conduire à la formation de vésicules^{74,75}.

c) Domaines d'applications des tensioactifs ou des molécules fluorées

De par leurs propriétés spécifiques chimiques et biologiques, les molécules fluorées sont l'objet d'un intérêt croissant depuis plusieurs années pour des applications dans le domaine

pharmaceutique, médical⁷⁶⁻⁷⁸ ou même dans le domaine de la physico-chimie des émulsions⁷⁹ et des formulations. On peut citer par exemple leur utilisation dans l'administration de principes actifs au niveau pulmonaire^{80,81} ou encore leur utilisation comme substituts du sang ou transporteur d'oxygène⁸². En effet, ces composés fluorés sont inertes d'un point de vue biologique et montrent une forte capacité à solubiliser les gaz. De plus ils sont actifs à des concentrations inférieures à leurs homologues hydrogénés. A cela s'ajoute la plus longue durée de vie in vivo des molécules fluorées du fait qu'elles soient inertes biologiquement. Ces produits sont également les composants de mousses extinctrices pour les incendies de raffineries ou de pétrole^{83,84} où ils sont habituellement appelés Aqueous Film Forming Foam (AFFF).

Au niveau de la vectorisation, des homologues fluorés des principaux vecteurs non-viraux commerciaux ont été synthétisés et ils montrent une plus grande capacité à transfecter les cellules⁸⁵. Notre choix s'est donc porté sur des molécules amphiphiles fluorocarbonées pour la synthèse de nouveaux lipides cationiques permettant la vectorisation d'ADN ou d'ARN.

D. Les différents types d'interactions avec les oligonucléotides

1. Point de vue général :

Les molécules et les ions peuvent interagir avec un oligonucléotide tel que l'ADN de trois manières différentes principales⁸⁶ :

- Le long de l'extérieur de l'hélice par des interactions principalement de type électrostatiques.
- Au niveau des sillons majeurs et mineurs par des interactions directes entre la molécule complexante et les bords des paires de bases de l'ADN.
- Par intercalation de cycles aromatiques plan ou quasi plan entre les paires de bases.

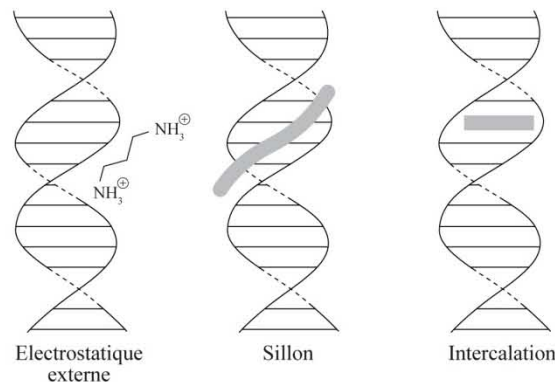


Figure 9 : Les trois principaux modes d'interaction avec l'ADN

Les deux premiers modes ne nécessitent pas de changement de conformation de l'oligonucléotide mais peuvent induire des transitions de structures sur la formation du complexe. L'intercalation requiert des changements dans les angles de torsion des chaînes sucres-phosphates pour pouvoir séparer des paires de bases adjacentes d'une distance suffisante pour permettre l'insertion de l'agent intercalant.

Il existe plusieurs forces d'interactions pour ces différents modes de complexations :

Les interactions électrostatiques : Ce sont des interactions fortes entre les charges positives des amphiphiles cationiques ou des ions et les charges négatives des phosphates de l'ADN. C'est la force principale qui permet une complexation et une condensation de l'ADN. Un autre type d'interactions électrostatiques correspond à l'empilement externe non spécifique. Une molécule aromatique plane peut s'empiler avec d'autres pour former des dimères ou des agrégats plus gros. Quand ces molécules sont chargées elles se repoussent entre elles, cependant si elles s'empilent le long de la chaîne sucre-phosphate, cette répulsion diminue et on observe une interaction de cations plans le long de l'hélice.

L'interaction par liaisons hydrogènes : Elles interviennent dans l'interaction au niveau des sillons et dans l'intercalation si la molécule complexante possède un motif le permettant comme un motif NH. Il existe d'autres liaisons de Van Der Waals qui rentrent en compte dans ces différents modes d'interactions. Ces forces d'interaction sont plus faibles que les liaisons électrostatiques et ont une influence à plus petite distance.

L'interaction par effet hydrophobe : Les longues chaînes hydrophobes peuvent condenser l'ADN pour réduire la surface de contact avec l'eau⁸⁷. En effet l'ADN possède un corps hydrophobe à l'intérieur de l'hélice.

L'interaction par liaisons de type π -stacking : Elles proviennent des électrons π de cycles aromatiques le plus souvent. Ce sont des liaisons faibles et qui n'existent qu'à petite distance mais qui sont très utiles pour maintenir la forme d'hélice de l'ADN.

2. Interaction avec les tensioactifs (TA)

L'ADN et l'ARN sont des macromolécules chargées négativement au niveau des groupements phosphates. Elles peuvent interagir avec des tensioactifs de différentes natures⁸⁸ : cationiques, anioniques ou neutres⁸⁹. L'interaction est majoritairement de type électrostatique pour les tensioactifs cationiques et majoritairement de type hydrophobe pour les tensioactifs anioniques ou

neutres. On peut noter que l'ADN simple brin interagit de manière plus importante avec les tensioactifs que l'ADN double brin⁹⁰. Cette observation suggère qu'une simple interaction électrostatique n'est pas suffisante, car un double brin a une densité de charges plus forte qu'un monobrins, et que la flexibilité de la chaîne d'ADN joue un rôle important. Il existe cependant des tensioactifs possédant des motifs aromatiques, hydrophobes et cationiques permettant une complexation multiple⁹¹ de l'ADN en utilisant toutes les interactions précédentes.

D'après de nombreux travaux⁹²⁻⁹⁵, on remarque deux mécanismes de complexation ADN / TA en fonction de la concentration en ADN comme le montre la figure ci-après. Le diagramme se décompose en deux régions. A des concentrations faibles en ADN, inférieure à la concentration dite concentration agrégative critique sur l'ADN (CAC^{ADN}) qui correspond à la formation de prêt agrégats autour de l'ADN, la complexation du tensioactif dépend peu de la concentration en ADN^{96,97} et dans ce cas, en dessous de la CAC, l'ADN facilite par interactions électrostatiques la formation d'agrégats stabilisés par des interactions hydrophobes. Dans la deuxième partie du schéma, l'interaction, est nettement dépendante de la concentration en tensioactif et elle est conduite uniquement par une neutralisation électrostatique des charges négatives des phosphates de l'ADN⁹⁸ par le tensioactif. Il a été défini une concentration d'agrégation du tensioactif sur la matrice ADN (CAC^{ADN}) correspondant à l'inflexion avant la complexation électrostatique dans la deuxième région. Ce diagramme est réalisé en prenant la valeur médiane sur des courbes de fluorimétrie (mesure de la diminution de fluorescence lors d'essais de déplacement du bromure d'éthidium) à différentes concentrations en tensioactif et en ADN.

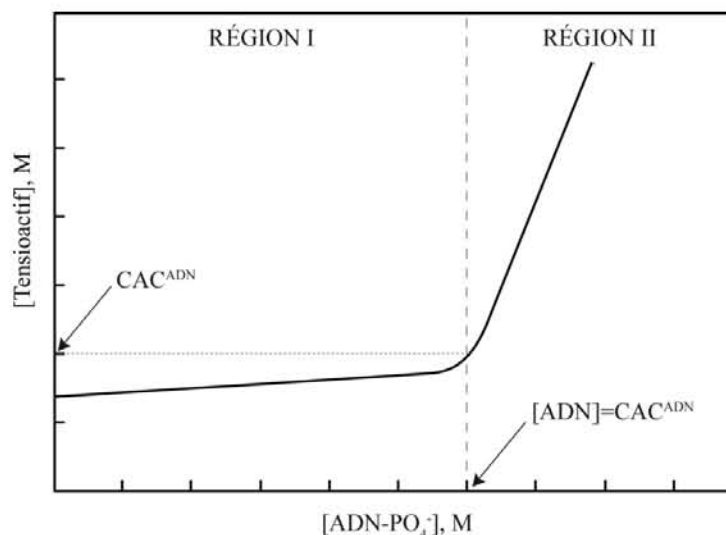


Figure 10 : Diagramme théorique de la complexation ADN / TA

La structure des complexes ADN / TA est différente dans chacune des deux régions d'interaction⁹⁹. Dans la première zone, mécanisme d'association hydrophobe, la structure des complexes est pseudo-micellaire. Dans la deuxième, il y a un excès de phosphates et les interactions électrostatiques prédominent et empêche la formation des prémicelles.

3. Interaction ADN / vésicule

Il faut cependant différencier la complexation de l'ADN par des tensioactifs monomères et la complexation de l'ADN par des architectures organisées comme des vésicules¹⁰⁰ ou des micelles. Là aussi il existe plusieurs types de complexation qui dépendent de nombreux paramètres. L'ADN peut être encapsulée dans une vésicule avec une charge globale positive en formant des particules multi lamellaires^{101,102}. Dans ce cas l'interaction est principalement hydrophobe lorsqu'il y a pénétration du polymère dans la bicouche de la vésicule ou électrostatique lorsque l'ADN se retrouve dans le cœur aqueux de cette même vésicule. L'ADN peut également se compacter à la surface d'une vésicule cationique sous forme de globule par des interactions électrostatiques.

Le choix du type d'interactions avec l'ADN va dépendre de la nature de son utilisation. Dans le cas de la vectorisation, il faut une complexation forte pour permettre un transport dans l'organisme efficace, mais également une complexation qui permette le relargage simple de l'ADN dans la cellule. La plupart des lipides qui servent à la vectorisation sont de types cationiques et ils permettent une complexation forte. Toutefois le développement de tensioactifs neutres pour éviter un excès de charges (cytotoxicité) ou pour moduler la complexation est en plein essor. Le type d'interaction utilisée correspond aux différentes forces citées précédemment : liaison hydrogène, π -stacking, effet hydrophobe¹⁰³.

4. Relation structure molécule amphiphile / efficacité de la vectorisation

Les recherches se multiplient actuellement pour trouver des relations entre les propriétés physico-chimiques, l'activité biologique et la structure des molécules amphiphiles. Ces nombreux travaux ont été réalisés afin d'étudier l'influence de la partie hydrophile, hydrophobe ou encore de la structure générale des tensioactifs. Certaines conclusions ont pu en être tirées :

Nature de la tête polaire :

La partie hydrophile est très importante car c'est souvent à ce niveau que se trouve la fonction permettant la complexation avec l'oligonucléotide. Le motif le plus répandu est le motif

amine ou plutôt polyamine¹⁰⁴. En effet, ces motifs étant sous forme d'ammonium au pH physiologique, permettent de complexer l'oligonucléotide par une interaction électrostatique entre les charges positives des tensioactifs d'une part et des charges négatives de l'ADN d'autre part. Cette complexation est liée également à des liaisons hydrogènes entre l'ADN et les lipides. Les interactions hydrophobes ne sont pas non plus à négliger comme le prouvent les travaux de B. Lindman¹⁰⁵ où il est montré que plus la tête polaire est hydrophobe plus l'ADN interagit à des ratios de charges plus petits, ceci étant lié à une CAC plus petite. Ces polyamines présentent une accumulation de charge responsable d'une certaine toxicité pour l'organisme, en particulier hépatique. Par contre, on peut noter que les amines quaternaires sont plus toxiques que les amines tertiaires et que l'introduction d'un hétérocycle azoté à la place de ces amines comme la guanidine ou la pyridine, permet de délocaliser la charge et de diminuer la toxicité.

La partie polaire peut cependant être très différente et contenir des cations métalliques^{91,106,107} comme le cobalt ou le cuivre et le zinc. Ce type de produit présente souvent des ligands aromatiques qui peuvent complexer l'ADN par intercalation en plus de l'interaction électrostatique.

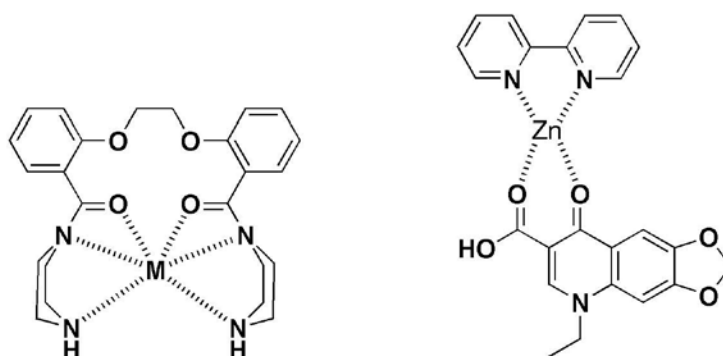


Figure 11 : Exemple de structures contenant des cations métalliques

Il existe aussi des tensioactifs possédant des têtes polaires non ioniques ou anioniques capables de complexer l'ADN par effet hydrophobe ou par liaisons hydrogènes. Ces produits sont très intéressants pour éviter l'excès de charges toxiques mais également pour moduler la complexation et ainsi adapter le transport et le relargage de l'ADN. On peut par exemple citer les travaux de B. Pucci sur des tensioactifs avec une tête polaire sucre¹⁰⁸ qui présentent une moindre toxicité et cytotoxicité que les tensioactifs cationiques. Ce genre de tête polaire permet d'avoir un groupement fortement hydrophile et d'introduire une certaine stœchiométrie¹⁰⁹. D'autres types de têtes polaires ont été élaborés comme les amino-acides qui permettent un ciblage précis des cellules cibles¹¹⁰ et une faible toxicité. De plus ce type de tête polaire permet d'envisager d'autres interactions que les forces électrostatiques pour moduler la complexation¹¹¹. La littérature montre également des exemples de

vecteurs lipidiques avec des têtes polaires plus complexes comme des motifs bicationiques ammonium / imidazolium¹¹² ou pyridinium¹¹³ et même beaucoup plus complexes¹¹⁰. Tous ces efforts sont réalisés dans le but d'obtenir des vecteurs permettant une bonne transfection avec une toxicité minimale.

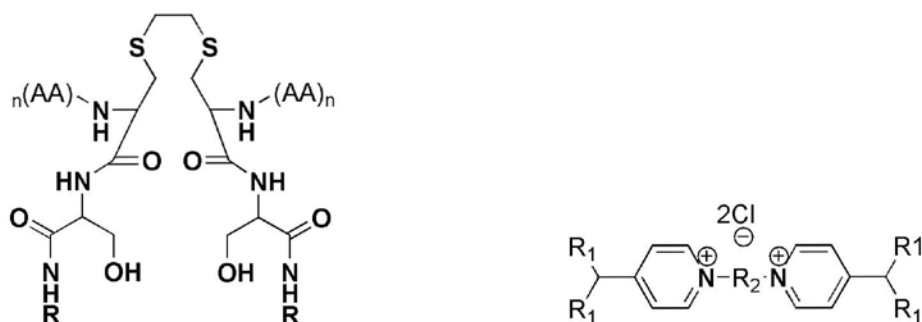


Figure 12 : Exemple de structures contenant à gauche des acides aminés et à droite des motifs pyridinium

Au niveau de la partie hydrophile, l'introduction de motifs furtifs de type polyéthylène glycol^{114,115}, permet une moins bonne reconnaissance par les macrophages du corps et donc d'augmenter la durée de vie dans le corps. Les PEG sont des molécules hydrophiles et non immunogènes. Le recouvrement de la surface des vecteurs par des PEG crée un réseau hydrophile dense autour de ces particules. Ce réseau crée une barrière stérique entre la particule et le milieu qui l'entoure. Ce masquage stérique et hydrophile empêche toutes les interactions hydrophobes ou électrostatiques et entraîne une diminution des phénomènes d'adsorption ou d'adhérence des constituants sanguins¹¹⁶⁻¹¹⁸ sur les vecteurs ce qui limite leur capture par la système réticulo-endothélial¹¹⁹. Ce masquage se traduit également par une réduction des interactions avec les cellules^{120,121} et donc diminue significativement les niveaux de transfection *in vitro* et *in vivo*. Un bon équilibre est cependant possible permettant une bonne transfection avec une durée de vie *in vivo* plus longue.

Un dernier exemple montre des vésicules cationiques photo-sensibles permettant une perturbation de la membrane de la vésicule au niveau de la cellule et donc une meilleure transfection sous irradiation UV¹²².

Nature de la chaîne grasse :

Des travaux¹²³ montrent également pour une série de lipides cationiques, la relation entre la longueur du segment hydrophobe et la capacité de transfection ainsi que l'influence du nombre d'insaturations présentes dans la chaîne grasse. Cette étude montre que la capacité à transférer et l'interaction avec la membrane cellulaire¹²⁴ augmente avec une diminution de la longueur de la

chaîne grasse et une augmentation du nombre d'insaturation sur cette chaîne. Cette étude ne peut pas être, cependant, généralisée à tous les lipides cationiques car l'influence des têtes polaires fait varier les propriétés de la partie hydrophobe.

En ce qui concerne la partie hydrophobe, à côté des nombreux composés hydrocarbonés proposés, certaines études se sont orientées vers l'utilisation de molécules fluorées ou partiellement fluorées. Il a été montré que les homologues fluorés des lipides les plus utilisés comme vecteurs commerciaux ont une efficacité de transfection plus forte⁸⁵ et une durée de vie dans l'organisme plus importante grâce à leur hydrophobie et lipophobie simultanées. Comme il a été expliqué précédemment, ce type de molécule possède en plus l'avantage de former des vésicules plus stables de manière souvent spontanée¹²⁵. (Voir les avantages des molécules amphiphiles fluorées page 40).

Géométrie de la molécule :

Au niveau de la géométrie des molécules tensioactives les plus étudiées, on retrouve de nombreux amphiphiles bicaténaires, qui forment des bicouches ou des vésicules plus facilement que leurs homologues monocaténaires. Plusieurs types de molécules ont été étudiés. Géminis^{126,127}, bolaformes, composés bicaténaires ont tous fait l'objet de travaux. On peut citer l'exemple des travaux de B. Pucci¹²⁸ sur des tensioactifs mixtes hydrogéné-fluorés bolaformes possédant à une extrémité une tête polaire de type sucre et de l'autre une tête polaire cationique lysine ou histidine reliées par deux chaînes grasses partiellement fluorées. Ces molécules peuvent s'auto-arranger en bicouches ou vésicules possédant un cœur cationique pouvant condenser l'ADN et une surface non ionique évitant l'accumulation de charges et donc diminuant la toxicité.

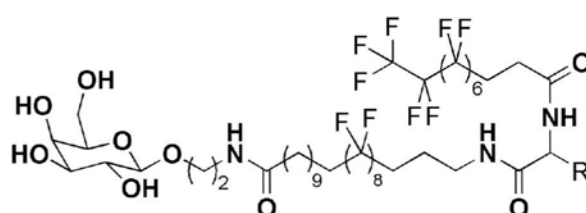


Figure 13 : Exemple de structure bolaforme mixte hydrogénée et fluorée

Il serait impossible de lister tous les travaux réalisés sur des tensioactifs géminis ou bicaténaires car ils sont extrêmement nombreux. On peut noter toutefois que, les composés amphiphiles comportant deux queues hydrophobes semblent de manière générale moins toxiques et plus efficaces que leurs homologues monocaténaires^{129,130}. Cependant, Tang et al. ont montré qu'une molécule monocaténaire (LHON) était plus efficace et moins cytotoxique que DOTAP. Ce résultat

montre que l'on ne peut pas complètement abolir l'utilisation de tensioactifs simple queue dans la vectorisation d'oligonucléotides.

Actuellement, de nombreuses molécules sont testées pour la vectorisation. Elles peuvent contenir des têtes polaires cationiques, saccharidiques ou d'une autre nature ainsi que des squelettes hydrophobes différents fluorés ou non.

E. Conclusion et stratégie envisagée

Le problème de la vectorisation d'oligonucléotides est très large et il existe une multitude de systèmes offrant chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Les plus développés sont les lipoplexes, formés à partir de tensioactifs cationiques. Même restreint à ce type de vecteurs, la recherche reste abondante et beaucoup de composés ont été testés. La plupart conduisent à une complexation du matériel génétique par le biais d'interactions électrostatiques. Des variations de structure sont apportées pour moduler l'excès de charge, limiter la toxicité et obtenir une transfection la plus efficace possible et d'optimiser le ciblage.

Après avoir fait cette mise au point bibliographique non exhaustive, l'objectif de nos travaux est de préparer de nouveaux systèmes, à base de molécules amphiphiles, capables de former des architectures supramoléculaires et de complexer le matériel génétique en vue d'application dans le domaine de l'interférence ARN. Ces systèmes sont schématisés dans la figure 14.

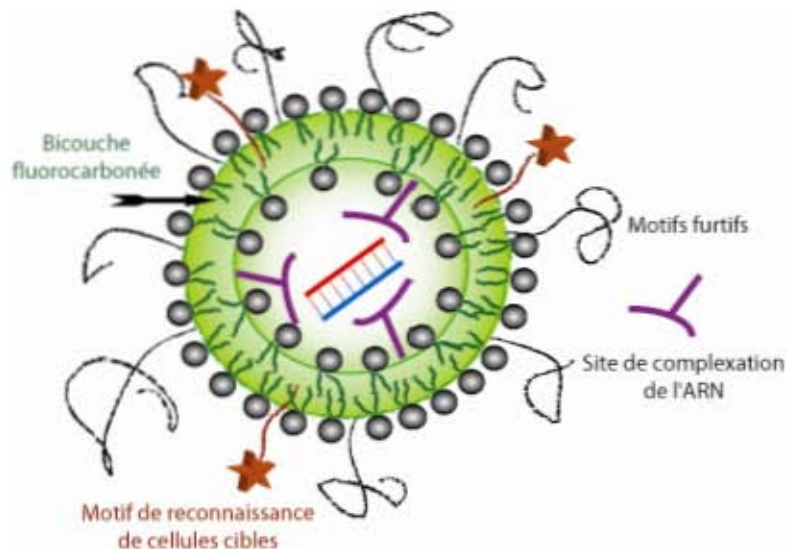


Figure 14 : illustration des nanovecteurs cibles

Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes intéressés à la synthèse et à la caractérisation des propriétés physicochimiques de molécules fluorocarbonées amphiphiles permettant d'obtenir des modèles pour établir dans un premier temps les relations entre la structure des molécules et l'interaction avec un fragment nucléotique.

Le design moléculaire des différentes structures cibles est présenté sur la figure 15. Nous avons envisagé, sur la base de l'expertise de l'équipe dans le domaine des tensioactifs fluorocarbonés, de concevoir deux types de molécules : des composés de type géminis d'une part et leurs homologues monocaténaire d'autre part.

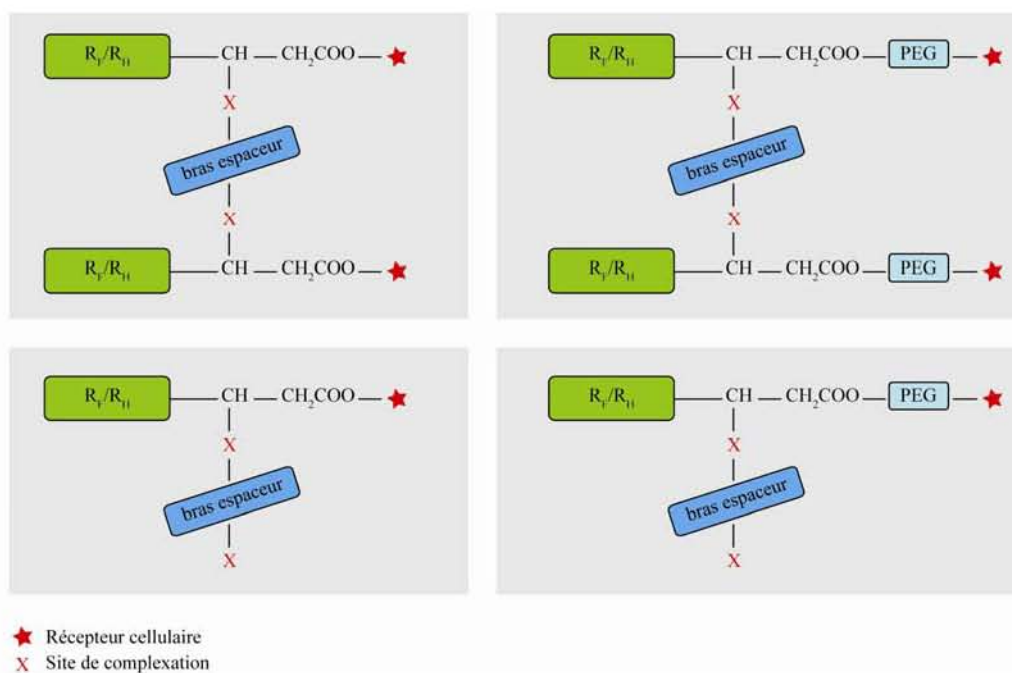


Figure 15 : Molécules cibles schématisées

La partie hydrophobe de ces molécules cibles se compose d'une ou deux chaînes grasses fluorées et/ou hydrogénées pour permettre une modulation de l'hydrophobie des molécules et de la formation d'agrégats de type vésicules ou la formation de films de Langmuir. La partie hydrophile quant à elle, comporte une fonction carboxylique permettant l'introduction de différents modules fonctionnels par un lien de type ester. Ces modules peuvent ainsi correspondre à des motifs polyoxyéthyléniques, bien connus pour permettre d'obtenir des vecteurs fusogènes non reconnus par les macrophages et ainsi d'augmenter la durée de vie du vecteur *in vivo*¹³¹⁻¹³³, et/ou des acides aminés pour la reconnaissance et le ciblage de certaines cellules ou certains tissus. Le bras espaceur constitue le point d'accroche pour l'oligonucléotide et peut être de plusieurs types : cationique, neutre ou encore de type aminoacide afin d'évaluer la complexation du matériel génétique par différents types d'interactions.

Chapitre 1 : Mise au point bibliographique

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés aux molécules bicaténaires géminis¹³⁴⁻¹³⁶ et monocaténaires comportant uniquement des chaînes hydrophobes fluorocarbonées et sans motif d'adressage. La synthèse d'homologues hydrogénés n'est pas présentée ici.

La synthèse de ces tensioactifs s'appuie sur l'expérience du laboratoire dans le domaine des composés fluorocarbonés et correspond à des méthodes simples à mettre en œuvre qui permettent d'obtenir une large gamme de produits à partir d'une structure de base modulable et par le biais d'une synthèse modulaire. Cette synthèse repose sur des intermédiaires hydrophobes obtenus à partir des acides 3-fluoro-prop-2-énoïques et qui offrent de nombreux sites réactionnels.

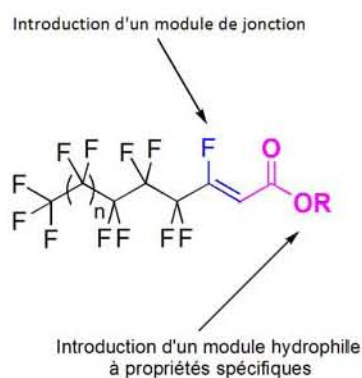


Figure 16 : Sites de réactivité potentiels des intermédiaires de synthèse

Nous avons également choisi de préparer des molécules polycationiques afin de permettre une complexation du matériel génétique, chargé négativement, par interactions électrostatiques principalement, hydrophobes ou encore par liaisons hydrogènes.

II. Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

A. Synthèse

1. Structure des molécules cibles et stratégie de synthèse

Les composés envisagés présentent un bras espaceur entre deux chaînes fluorocarbonées et correspondent à la formule ci-après (schéma 1). La stratégie de synthèse envisagée consiste à condenser une diamine sur les esters dérivés des acides 3-fluoro-prop-2-énoïques pour obtenir des béta-aminoacides.

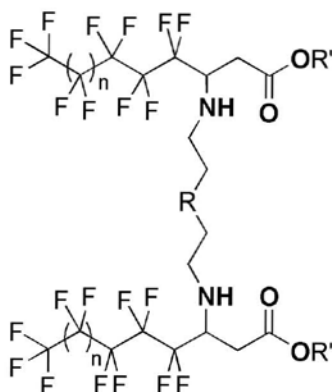


Schéma 1 : Structure des molécules géminis cibles

2. Synthèse des intermédiaires hydrophobes

La synthèse des intermédiaires hydrophobes est réalisée à partir d'alcools fluorés commerciaux de différentes longueurs de chaîne par des méthodes simples. Ces alcools fluorés sont généreusement fournis par la société Dupont de Nemours.

Synthèse industrielle des 2-perfluoroalkyléthanol :

Peu de méthodes permettent d'accéder à ces dérivés. Parmi les principales nous pouvons citer la fluoration électrochimique¹³⁷, la télomérisation du tétrafluoroéthylène¹³⁸ et l'oligomérisation¹³⁹ de ce même dérivé, ainsi que la fluoration directe à l'aide du difluor¹⁴⁰.

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

Parmi ces procédés, la télomérisation est la plus importante pour la production de dérivés perfluorés car les rendements sont bons et le produit de départ est simple d'accès puisqu'il est aussi utilisé pour la préparation de polymères fluorés comme le Teflon.

La synthèse consiste en deux étapes réactionnelles :

- Préparation d'un iodure de perfluoroéthyle par addition de iodomonofluorure (IF, obtenu in situ par réaction de IF₅ sur I₂) :

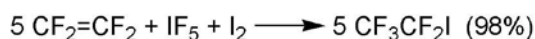


Schéma 2 : Préparation d'un iodure de perfluoroéthyle

- Télomérisation du tétrafluoroéthylène avec cet iodure de perfluoroéthyle :

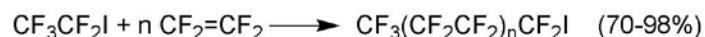


Schéma 3 : Etape de télomérisation du tétrafluoroéthylène

Cette seconde étape est réalisée sous pression, à 165°C en présence de radicaux libres comme le peroxyde de ditertiobutyle.

L'addition radicalaire des iodures de perfluoroalkyle sur l'éthylène permet ensuite d'obtenir les 2-perfluoroalkyliodoéthanes en plusieurs étapes :

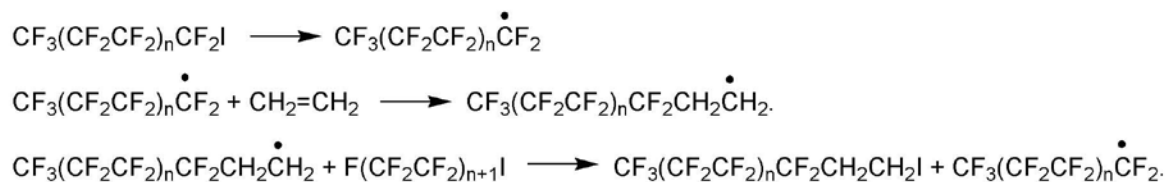


Schéma 4 : Etapes d'addition radicalaire

Ces composés sont plus facilement utilisables grâce au groupement CH₂CH₂ séparant la chaîne perfluorée de l'iode.

Les 2-perfluoroalkyliodoéthanes peuvent ensuite être transformés en 2-perfluoroalkyléthanol par différents procédés industriels. Les procédés les plus courants consistent à traiter l'iode, soit à chaud par un mélange de diméthylformamide et d'eau, soit à température ambiante par de l'oléum sulfurique :



Schéma 5 : Préparation des 2-perfluoroalkyléthanol

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

La synthèse des intermédiaires hydrophobes est ensuite réalisée en trois étapes à partir de ces alcools fluorés. La première étape consiste à oxyder l'alcool, grâce au réactif de Jones, pour obtenir l'acide carboxylique correspondant. Le mode opératoire a été mis au point au laboratoire en 1991 avec des conditions précises de dilution acétone/éther¹⁴¹. La réaction offre de bons rendements quelque soit la longueur de la chaîne fluorée:

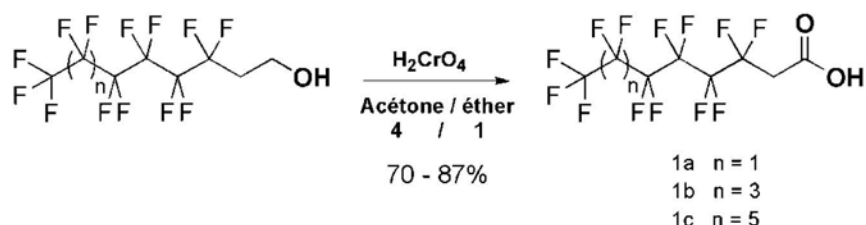


Schéma 6 : Oxydation des 2-perfluoroalkyléthanol

Les produits sont purifiés facilement par recristallisation dans l'hexane et peuvent être préparés simplement en quantités importantes de l'ordre de 15 – 20 grammes. Les produits obtenus sous forme de solides présentent des points de fusion variant de 55 à 113°C.

La deuxième étape de synthèse est la deshydrofluoruration des acides obtenus précédemment en milieu basique fort (soude 2N). Cette deshydrofluoruration s'accompagne d'un dégagement d'HF ce qui nécessite un ajout de soude en excès. Cette étape est possible grâce à la présence de la chaîne fluorée et de la fonction acide qui ont un effet attracteur fort qui rendent les protons en α de ces motifs suffisamment acides pour qu'un simple traitement par de la soude aqueuse provoque, à température ambiante, l'élimination d'une molécule de HF et conduise au dérivé insaturé. Cette réaction est simple à mettre en œuvre et conduit à des rendements de l'ordre de plus de 85%. Enfin, on peut noter que d'un point de vue stéréochimique, il a été montré au laboratoire¹⁴¹ que seul l'isomère le plus stable, c'est-à-dire l'isomère Z, est obtenu.

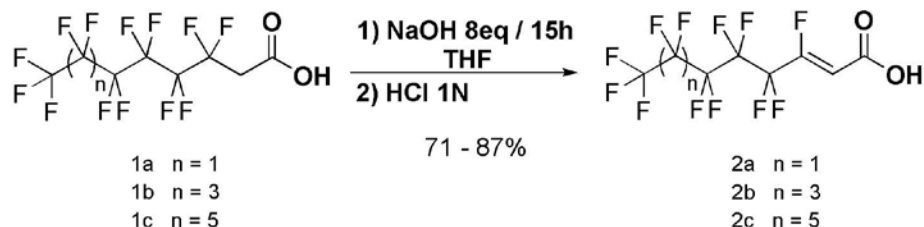


Schéma 7 : Déshydrofluoruration des acides 2-perfluoroalkyléthanoïques

Pour cette étape aussi, les produits sont facilement purifiables par recristallisation dans l'hexane. Ce sont également des solides dont le point de fusion varie entre 78 et 128°C.

A partir de ces composés, différentes voies de synthèse sont alors possibles. Les stratégies que nous avons envisagées passent par une étape préalable d'estérification. Nous avons choisi trois types d'alcool: éthanol, polyéthylèneglycols et alcools gras hydrogénés. Cette étape d'estérification est réalisée dans les conditions classiques de Fisher. L'acide fluoré et l'alcool sont dissous dans le toluène avec une quantité catalytique d'acide sulfurique. Le mélange est alors porté à reflux azéotropique pendant 24 h. Les esters obtenus sont purifiés sur gel de silice avec des rendements très corrects.

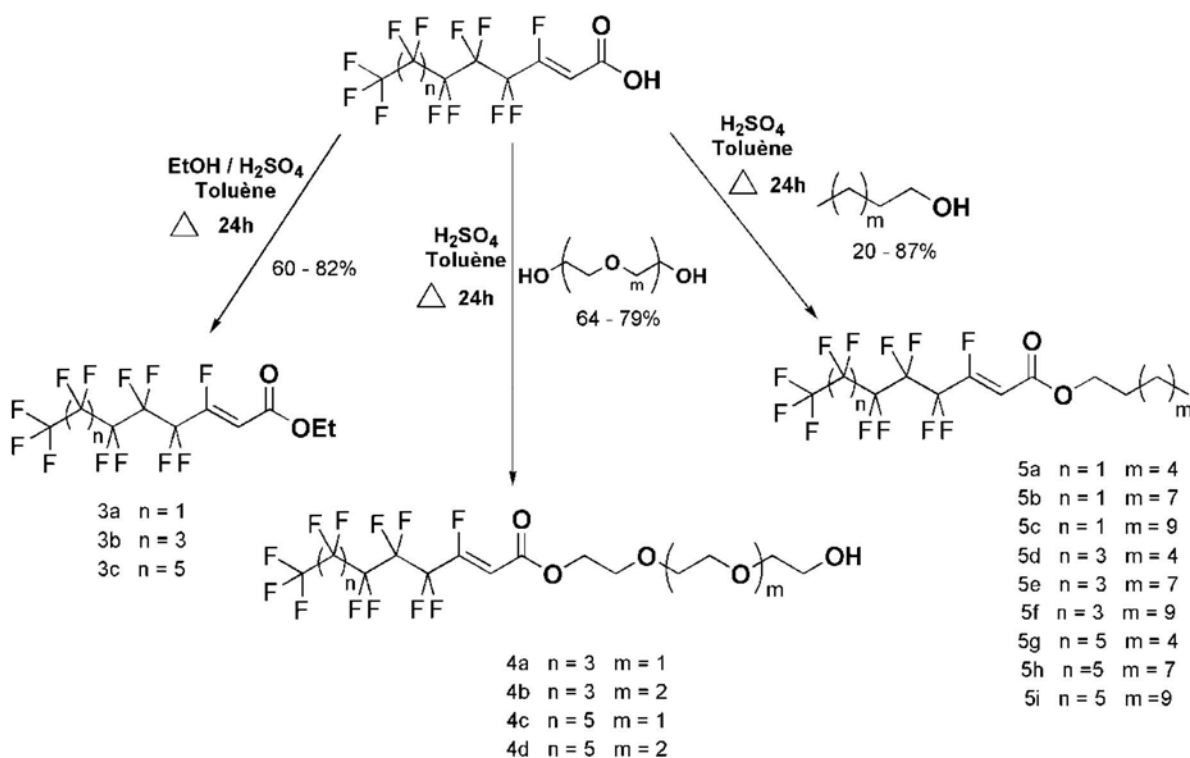


Schéma 8 : Estérification des acides 2-perfluoroalkyléthanoïques

3. Synthèse de tensioactifs géminis

A partir des intermédiaires **3** et **4** précédents, les tensioactifs géminis ont été synthétisés par des réactions simples à mettre en œuvre et avec des rendements intéressants. Il s'agit d'introduire un bras espaceur, entre deux motifs hydrophobes, contenant des motifs polyaminés capables de complexer les oligonucléotides par des interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes. C'est une étape clé de ces synthèses.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que ces intermédiaires pouvaient réagir avec différents nucléophiles oxygénés pour former des éthers d'énols ou des acétals¹⁴².

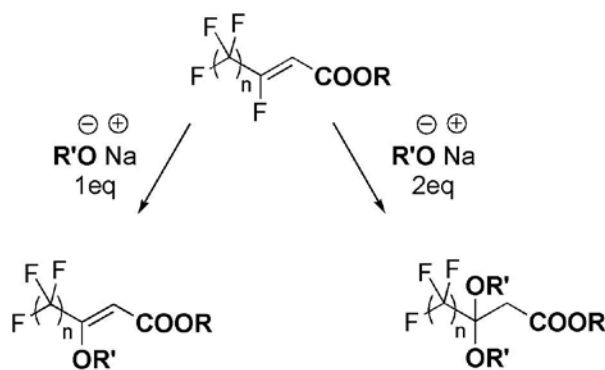


Schéma 9 : Formation d'éthers d'énols et d'acétals

Ils peuvent également réagir avec des nucléophiles de type azoture ou amine pour former des énamines^{143,144}. C'est ce type de nucléophiles qui a été choisi pour notre étude car les motifs amines peuvent se protonner à pH physiologique et interagir avec les charges négatives de l'ADN.

a) Synthèse des diénamines

Le fluor vinylique peut en effet être substitué également par une amine primaire. Les esters α,β éthyléniques conduisent ainsi à une énamine par réaction de substitution du fluor vinylique.

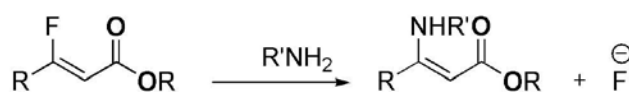


Schéma 10 : Schéma général

Le mécanisme supposé de cette réaction correspond à une addition de type Michaël sur la double liaison suivie d'une élimination de fluorure (schéma 11).

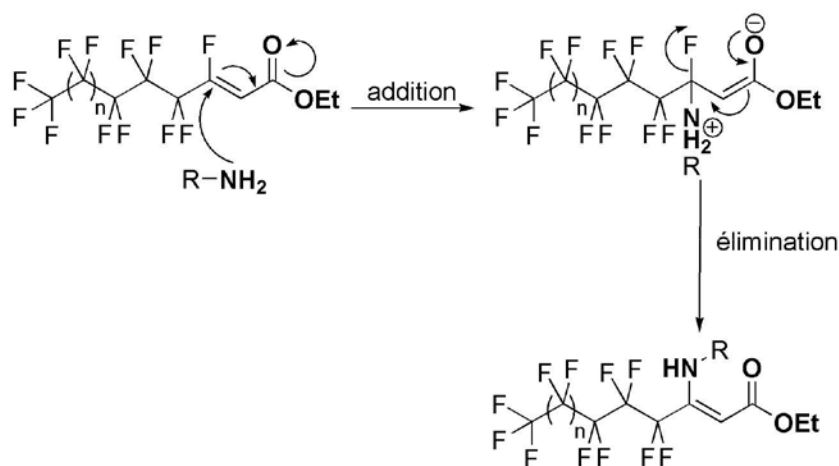


Schéma 11 : Mécanisme supposé de la réaction de type Michaël

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

Cette réaction d'addition d'un nucléophile en 1,4 sur un carbonyle α,β insaturé a été découverte au début du 20^{ème} siècle par A.Michaël¹⁴⁵. C'est une des méthodes les plus simples pour construire des β -aminoacides¹⁴⁶ qui sont des intermédiaires importants dans les produits biologiques naturels.

Nous avons testé plusieurs diamines afin d'obtenir différents bras espaceurs et donc pouvoir comparer les différences d'interactions avec le matériel génétique.

Pour obtenir les diénamines géminis, le mode opératoire consiste à ajouter la diamine en défaut (0.5eq) sur l'ester dilué dans l'éther en présence de triéthylamine et de porter le mélange à reflux. La formation des produits est facilement observée par RMN et aucun produit résultant de l'addition de l'amine sur la fonction carboxyle de l'ester n'est observée. La première série de molécules a été préparée à partir des esters **3**.

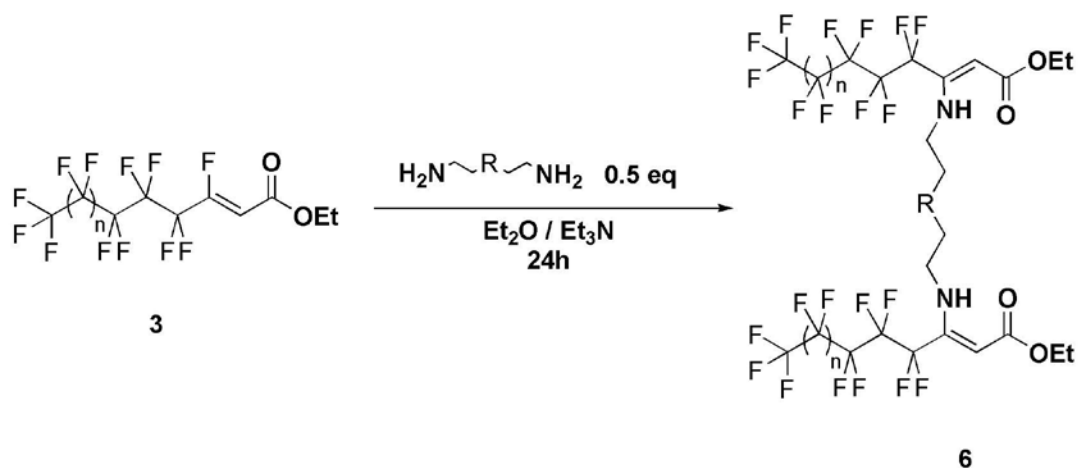


Schéma 12 : Synthèse des diénamines à partir des esters **3**

Produit	R	n	Rendement (%)
6a	o o	1	65
6b	o o	3	67
6c	o o	5	53
6d	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{N} \\ \text{H} \end{array}$	3	52
6e	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \text{H} \end{array}$	3	57
6f		3	63

Tableau 7 : Résultats pour la synthèse des diénamines à partir des produits **3**

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

Les rendements obtenus dans ce cas sont moyens à bons. Ceci peut s'expliquer, entre autre, par la difficulté rencontrée lors des lavages de la phase organique. En effet, l'apparition d'une forte émulsion dense rend la séparation des phases difficile.

Le même mode opératoire est utilisé à partir des esters **4** pour former des tensioactifs géminis avec une partie polaire plus importante que les produits précédents. La réaction a été réalisée seulement avec la 2,2'-(éthylènedioxy)bis-(éthylamine) et deux longueurs de chaîne fluorée.

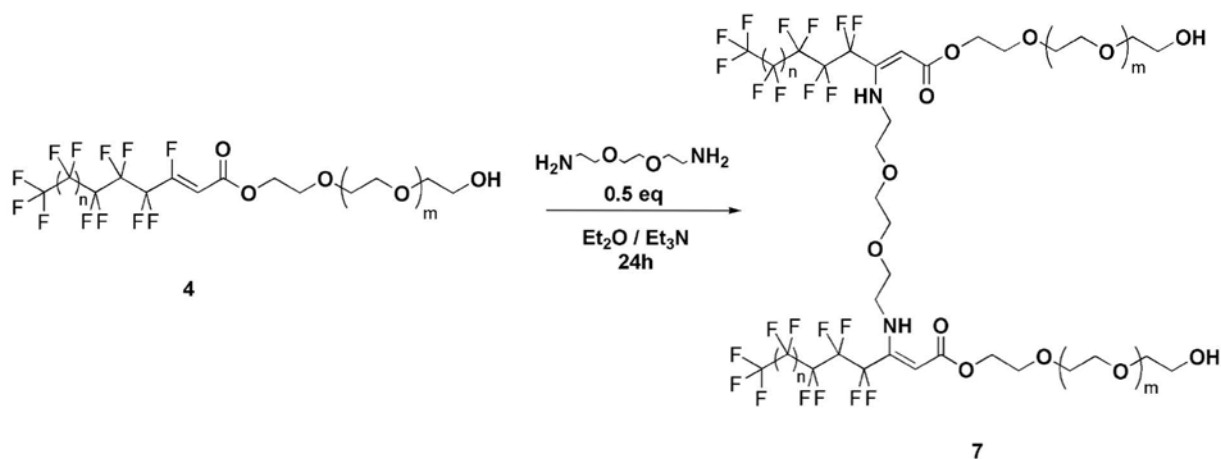


Schéma 13 : Synthèse des diénamines à partir des esters **4**

Produit	m	n	Rendement (%)
7a	1	3	93
7b	2	3	70
7c	1	5	50
7d	2	5	68

Tableau 8 : Résultats pour la synthèse des diénamines obtenues à partir des produits **4**

Dans ce cas, les rendements sont nettement plus élevés grâce à des lavages plus performants et une purification efficace sur gel de silice.

b) Réduction des diénamines

La réduction est effectuée par hydrogénation catalytique. Les conditions nécessaires sont relativement dures (80 bars à 50 °C pendant 24 h), en raison de la présence de l'amine, poison de catalyseur. La réduction totale des énamines est facilement suivie par la disparition du pic RMN ^1H du proton vinylique et de la bande de vibration de la double liaison C=C en infra-rouge. Les produits obtenus ne nécessitent pas de purification particulière.

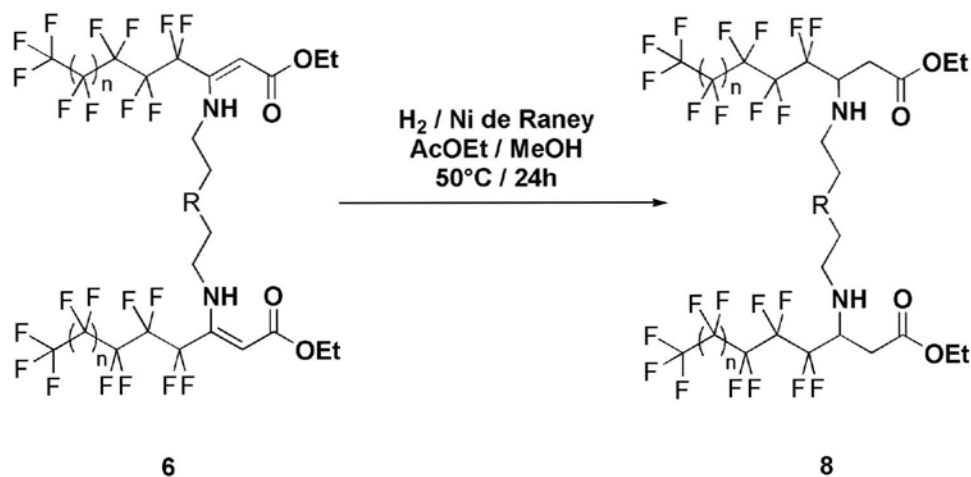


Schéma 14 : Hydrogénation des diénamines obtenues à partir des esters 3

Produit	R	n	Rendement (%)
8a	o o	1	83
8b	o o	3	93
8c	o o	5	94
8d	$\begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$	3	60
8e	$\begin{matrix} \text{H} \\ \\ \text{N} \end{matrix}$	3	88
8f		3	97

Tableau 9 : Résultats pour la réduction des diénamines obtenues à partir des produits 3

Les rendements sont quasiment quantitatifs pour la plupart de ces synthèses exceptées dans le cas où le bras espaceur est une tétraamine. Ceci s'explique également par la présence d'amines qui empoisonnent le catalyseur.

Les composés 7 sont réduits avec le même mode opératoire suivant le schéma suivant :

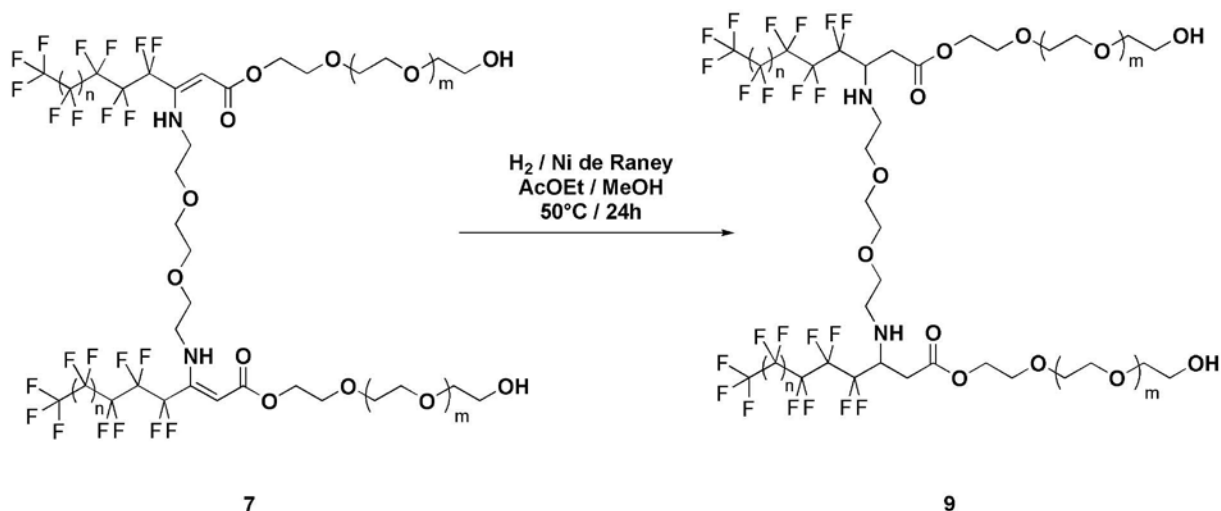


Schéma 15 : Hydrogénation des diénamines obtenues à partir des esters 4

Produit	m	n	Rendement (%)
9a	1	3	70
9b	2	3	60
9c	1	5	60
9d	2	5	52

Tableau 10 : Résultats pour la réduction des diénamines obtenues à partir des produits 4

Les rendements observés sont plus faibles que pour la famille de diénamines précédente. En effet, lors des lavages, une partie des produits se solubilise dans l'eau de lavage malgré les tentatives de relavage. On remarque ainsi que plus le nombre de motifs oxyéthyléniques augmente, plus le rendement de la réaction diminue pour une même longueur de la chaîne fluorée.

c) Saponification des diesters d'éthyle

Afin d'étudier l'influence de la présence ou non de la fonction acide carboxylique sur l'interaction avec l'ADN, les diesters d'éthyle sont saponifiés, en milieu basique dans un mélange THF, eau et méthanol pendant 4h puis acidifié à pH = 1, pour obtenir les diacides correspondants. Les produits obtenus sont purifiés et isolés sous forme chlorhydrate d'ammonium.

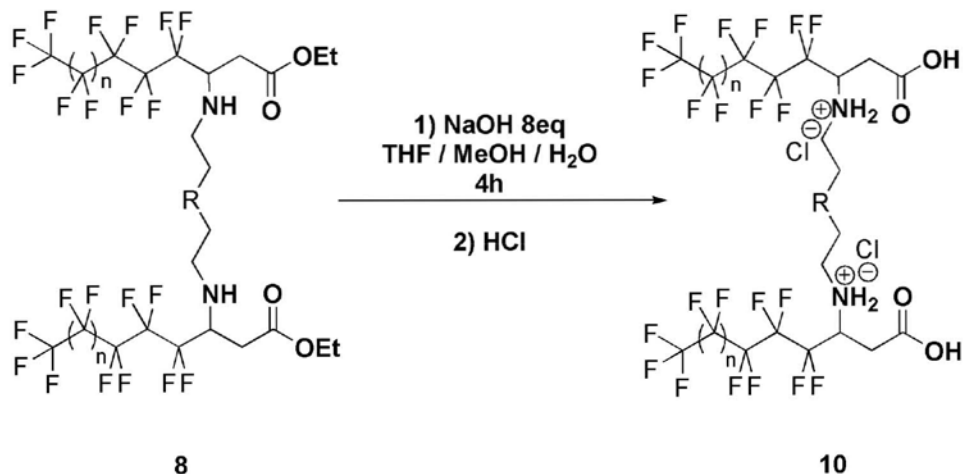


Schéma 16 : Saponification des diesters d'éthyle

Produit	R	n	Rendement (%)
10a	o o	1	84
10b	o o	3	84
10c	o o	5	87
10d	N H ₂	3	61

Tableau 11 : Résultats pour la saponification des diesters

Les rendements obtenus sont bons pour les composés avec le bras espaceur oxyéthylénique. Dans le cas du bras espaceur aminé, le rendement est plus faible certainement en raison de la ionisation de sa fonction amine.

B. Propriétés physico-chimiques à l'interface air/eau

Des études physico-chimiques ont été réalisées sur les diesters (**produit 8**) et sur les diacides (**produit 10**). Ces produits ont une solubilité, dans l'eau, inférieure à 10^{-7} M et leurs propriétés physico-chimiques ont été étudiées en monocouche à l'interface eau / air à l'aide d'une balance de Langmuir¹⁴⁷. Dans le cas des autres composés synthétisés, la monocouche est instable mais leur solubilité dans l'eau reste insuffisante pour étudier leurs propriétés physico-chimiques en solution aqueuse.

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

C'est à I. Langmuir (1881-1957) que l'on doit le premier modèle de membrane dans les années 1930¹⁴⁸. Ses études sur des films d'huile à la surface de l'eau l'ont amené à formuler une théorie générale sur la chimie surfacique qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1932. Avec sa collaboratrice K. B. Blodgett (1898-1979), ils introduisent la notion de monocouches^{149,150}, films de surface d'épaisseur atomique ou moléculaire possédant des propriétés bidimensionnelles.

1. Interface eau / air – tension superficielle

Les molécules au sein d'un liquide s'attirent les une les autres, elles subissent donc une force attractive égale dans toutes les directions. Les forces subies par les molécules à l'interface ne sont donc pas compensées. Le système évoluant de façon à minimiser son énergie libre, tendra donc à diminuer son aire interfaciale. La tension de surface d'un liquide correspond au travail nécessaire pour créer une unité d'aire interfaciale. On définit ainsi la tension superficielle (γ) d'une interface plane comme étant la dérivé partielle suivante :

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n}$$

Où G est l'énergie de Gibbs du système de composition constante n, à la température T et à la pression P, A étant l'aire à l'interface.

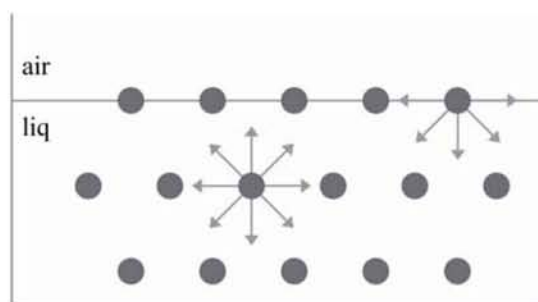


Figure 17 : Schématisation des forces intermoléculaires s'exerçant au sein d'un liquide et à sa surface

2. Présentation de la balance de Langmuir

La balance de Langmuir est utilisée pour étudier des composés insolubles dans l'eau qui forment des monocouches organisées à l'interface air/eau. Elle est constituée par une cuve thermostatée en Téflon équipée de deux barrières mobiles en Téflon également et d'une lame de platine reliée à une balance de précision permettant de mesurer la force exercée sur la lame plongée dans la solution à étudier.

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

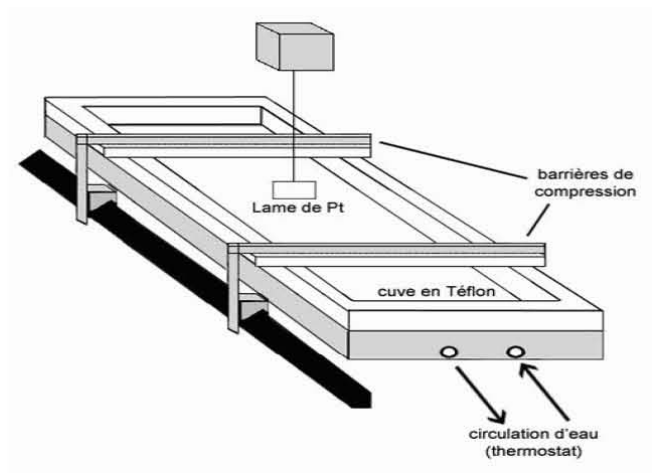


Figure 18 : Schéma de la balance de Langmuir

Les films étalés dits de Langmuir :

À l'interface eau/air, les films monomoléculaires étalés, également appelés films de Langmuir, sont des monocouches formées par des molécules amphiphiles insolubles dans l'eau. La formation d'un film monomoléculaire est réalisée en déposant à la surface une faible quantité de la solution du tensioactif dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau, tel que le chloroforme. La solution s'étale pour couvrir l'ensemble de la surface disponible et, après évaporation du solvant, les molécules s'auto-organisent pour former la monocouche. Le film étalé sur la sous phase diminue la tension de surface de celle-ci et on définit ainsi la pression de surface Π :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

Où γ_0 est la tension du liquide pur et γ celle du liquide recouvert par le film.

Compte tenu de la faible quantité de matière mise en jeu, la propreté de l'environnement des expériences et la qualité de l'eau sont des conditions cruciales à la bonne reproductibilité des mesures.

Isothermes de compression :

Les molécules amphiphiles qui forment les films monomoléculaires sont agencées d'une manière bien définie. Différentes informations concernant leur taille, leur forme et leur organisation à l'interface peuvent être obtenues à partir des études du film. Les films monomoléculaires peuvent exister dans différents états physiques, qui dépendent essentiellement des interactions intermoléculaires.

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

La compression latérale du film permet d'obtenir l'isotherme Π - A (pression de surface en fonction de l'aire par molécule), considérée comme l'analogie bidimensionnelle de l'isotherme pression-volume des systèmes tridimensionnels.

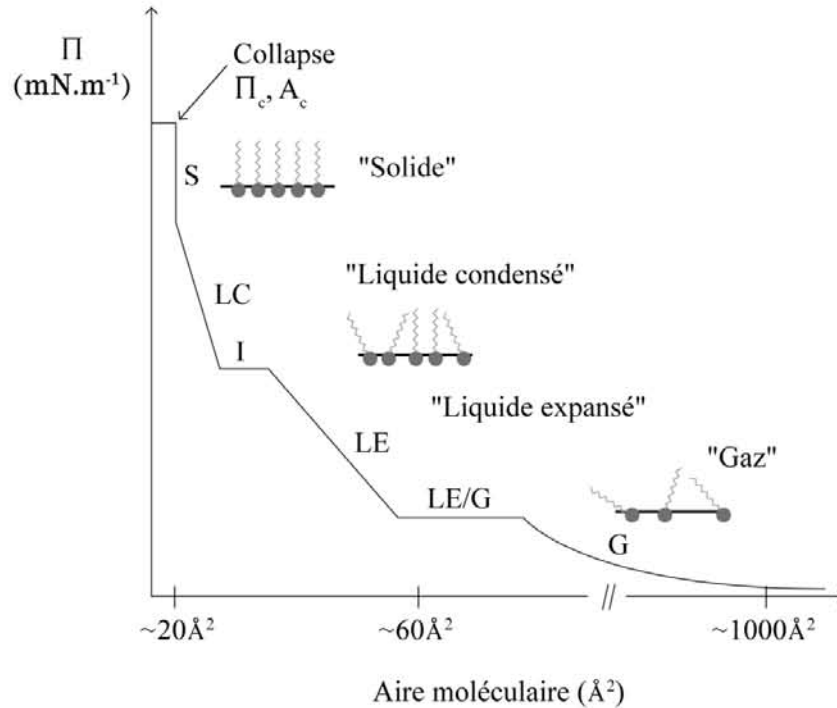


Figure 19 : Isotherme de compression idéale. G : phase gazeuse. LE/G et I : transitions de phase. LE : phase liquide expansé. LC : phase liquide condensé. S : phase solide

Les molécules du film à l'état dit gazeux, sont séparées par de grandes distances, les forces d'interactions intermoléculaires sont alors négligeables. Par compression latérale du film, l'aire disponible est réduite, ce qui conduit à la formation de phases plus condensées, caractérisées par des interactions intermoléculaires croissantes (phase liquide expansé, phase liquide condensé, phase solide). Lorsque l'entassement des molécules est maximal, une faible variation de l'aire conduit à la destruction du film et à la formation d'agrégats tridimensionnels. Ce point est appelé point de collapse du film. L'aire moléculaire mesurée au collapse représente l'aire par molécule minimale occupée par chaque molécule à l'interface eau / air. Le profil des isothermes de compression dépend des conditions dans lesquelles elles sont réalisées : températures, nature de la sous phase, pH...

La compressibilité du film, qui correspond à la variation relative de l'aire par molécule selon la pression de surface, dans un état donné peut être calculée à partir de la tangente à l'isotherme de compression grâce à l'équation suivante :

$$C_s = -\frac{1}{A_0} \left(\frac{\partial A}{\partial \Pi} \right)_T$$

Avec A_0 l'aire moléculaire de la phase considérée, extrapolée à $\Pi = 0$ mN/m.

La compressibilité est plus élevée dans les états les moins condensés du film. Les correspondances, généralement admises, des valeurs du module de compressibilité (C_s^{-1}) pour les différentes phases sont données dans le tableau suivant :

Phase	C_s^{-1} (mN/m)
LE	12.5 à 50
LC	100 à 250
S	1000 à 2000

Tableau 12 : Correspondance des phases en fonction du coefficient de compressibilité

3. Isothermes de compression des diesters d'éthyle 8

Après des essais de réétalement des monocouches qui confirment leur stabilité (cycle d'hystérésis), des mesures ont été réalisées sur les diesters d'éthyle (**produits 8**) avec différentes sous phases pour évaluer l'influence de plusieurs paramètres : le pH, la force ionique... Les résultats sont regroupés dans le tableau 13.

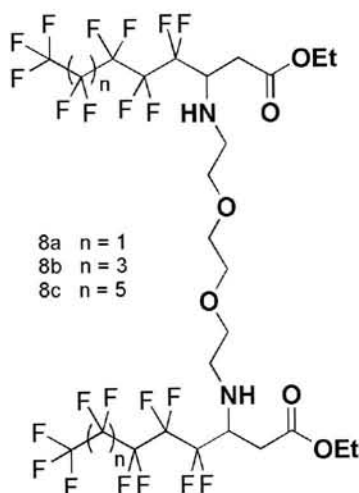


Schéma 17 : Diesters 8

a) Influence de la longueur de la chaîne fluorée

Des isothermes de compression ont été réalisées tout d'abord sur les trois longueurs de chaîne fluorée dans l'eau pure. La température est fixée à 20°C et la vitesse de compression des barrières est de 20mm par minute. Les mêmes mesures ont ensuite été réalisées dans un tampon phosphate se rapprochant d'un milieu physiologique : NaCl 0.15M, TRIS 0.05M et pH = 7.4 afin d'étudier l'organisation à l'interface dans des conditions de salinité et de pH proches de celles du corps humain.

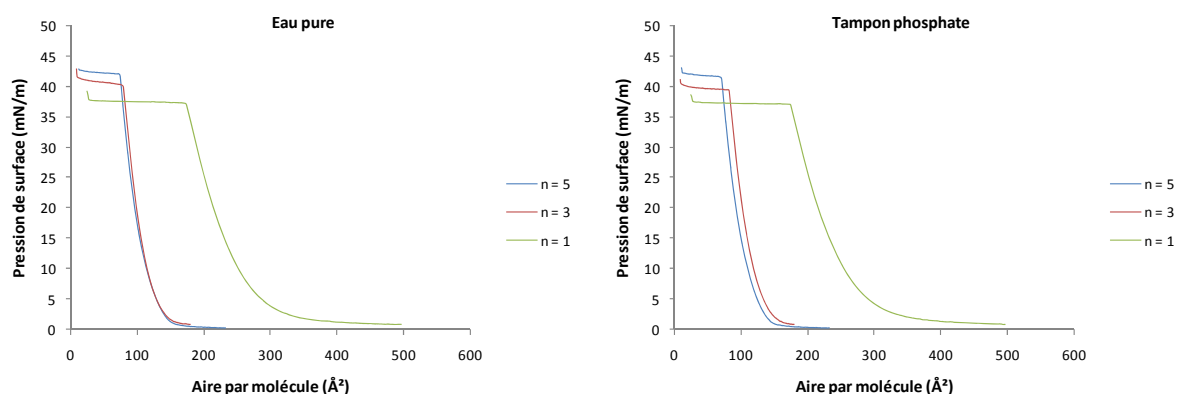


Figure 20 : Isothermes de compression pour les différentes longueurs de chaîne des diesters 8

Pour les trois longueurs de chaîne dans l'eau pure, on observe la formation d'une monocouche stable à l'interface air/eau, avec des valeurs de pression de surface au collapse pour les produits **8a**, **8b**, **8c** de 37, 40, 42 mN/m respectivement, montrant un abaissement de la tension de surface quand la longueur de la chaîne fluorée augmente. L'aire par molécule de 169, 78, 74 Å² respectivement, plus de deux fois l'aire moléculaire d'une chaîne fluorée (27-30 Å²) semble gouvernée par le bras espaceur éthoxylé ou par la partie polaire des molécules. Habituellement, à cause de leur rigidité intrinsèque et en l'absence d'effets gauches, les chaînes fluorées compressées à l'interface air/eau présentent une orientation quasi-orthogonale par rapport à la surface et sont dans un état liquide-condensé. Or dans notre cas, le module de compressibilité calculé (voir tableau des résultats) révèle une phase liquide-expansée qui montre encore l'influence du bras espaceur sur la distance entre les segments fluorés. L'aire par molécule diminue également avec l'allongement de la chaîne fluorée car les interactions entre les chaînes « fluorophiles » augmentent. Cette interaction devient vraisemblablement trop faible pour la longueur de chaîne la plus courte (6 carbones) et permet au bras espaceur de dominer encore plus l'organisation à l'interface d'où une forte augmentation de l'aire par molécule. En ce qui concerne l'effet de la salinité du milieu tamponné, il

n'affecte que très peu les résultats obtenus dans l'eau pure et l'organisation à l'interface semble inchangée d'après la forme des isothermes et les valeurs des coefficients de compressibilité.

b) Influence du pH

Des mesures ont ensuite été réalisées en changeant le pH de la sous phase aqueuse sur les trois longueurs de chaîne fluorées. La sous phase aqueuse contient du NaCl 0.15M pour ce rapprocher du tampon. Ceci permet d'observer les changements d'organisation suivant que les motifs aminés sont ou non protonés afin d'évaluer l'influence du bras espaceur pour ces différents pH.

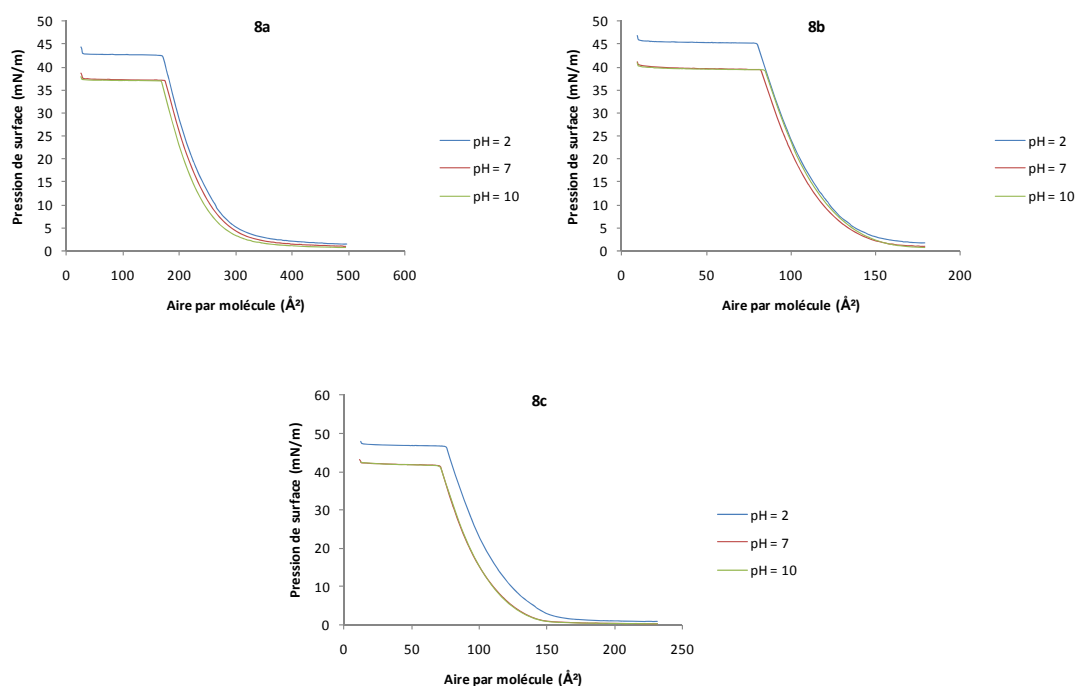


Figure 21 : Isothermes de compression pour différents pH dans une solution aqueuse NaCl 0.15M

Les variations de pH n'ont pas d'influence sur la stabilité des monocouches formées. Même à pH acide, sous forme ammonium, les molécules ne se solubilisent pas dans l'eau et reste à l'interface.

D'après ces courbes de compression, on remarque que pour les trois longueurs de chaîne, la pression et l'aire par molécule sont sensiblement les mêmes pour des pH supérieurs à 7. Ce qui tend à dire que le pKa des amines confinées à l'interface se situe entre 2 et 7. Par exemple, dans le cas de l'octadécyl amine¹⁵¹, il a été observé une diminution d'environ 5 unités de pKa lorsque la molécule est confinée sous forme de film monomoléculaire. A un pH de 2, on observe une nette variation dans

l'allure des courbes et une activité de surface plus importante. De plus le coefficient de compressibilité est le plus important à pH acide, ce qui montre l'effet répulsif des motifs ammonium lors de la compression du film. L'effet de pH est le plus important pour le produit 8c avec la plus longue chaîne fluorée.

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant et montrent l'aire par molécule au collapse, la pression de surface au collapse, l'aire par molécule à une pression de 30 mN/m admise comme étant la pression à l'intérieur d'une vésicule et le coefficient de compressibilité du film.

Produit	Sous phase	Aire / molécule au collapse (Å ²)	Pression de surface (mN/m)	Aire / molécule à la pression de 30 mN/m (Å ²)	Coefficient de compressibilité (C _s ⁻¹)
8a	Eau pure	169	37	190	85
8a	NaCl 0.15M	169	37	190	87
8a	pH 10 NaCl 0.15M	163	37	183	85
8a	pH 2 NaCl 0.15M	165	42	196	90
8b	Eau pure	78	40	88	94
8b	NaCl 0.15M	81	40	91	96
8b	pH 10 NaCl 0.15M	82	39	93	98
8b	pH 2 NaCl 0.15M	79	45	94	100
8c	Eau pure	74	42	84	86
8c	NaCl 0.15M	69	42	81	88
8c	pH 10 NaCl 0.15M	70	41	82	84
8c	pH 2 NaCl 0.15M	73	47	91	88

Tableau 13 : Résultats pour les mesures de compression pour les diesters 8

4. Isothermes de compression des diacides 10

Les mêmes mesures ont été réalisées sur les diacides (**produit 10**) dans les mêmes conditions et après les mêmes essais de réétalement (cycle d'hystérésis).

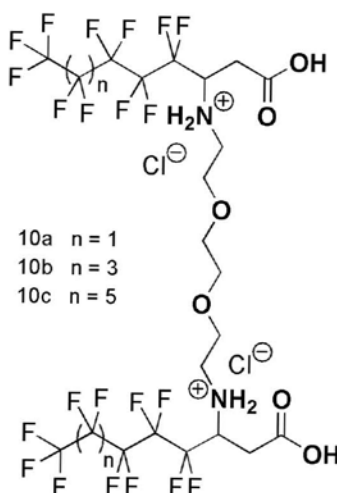


Schéma 18 : Diacide 10

L'influence des paramètres pH et salinité est également mise en avant pour cette tête polaire comportant une fonction acide carboxylique. Pour la longueur de chaîne la plus courte ($n = 1$), la formation du film monomoléculaire n'est pas observée ou le film est instable car le produit est partiellement soluble dans l'eau surtout à pH basique.

a) Influence de la longueur de la chaîne fluorée

Les mesures ont été réalisées à 20°C également et avec la même vitesse de compression (20 mm /min) dans l'eau pure et dans le même tampon phosphate.

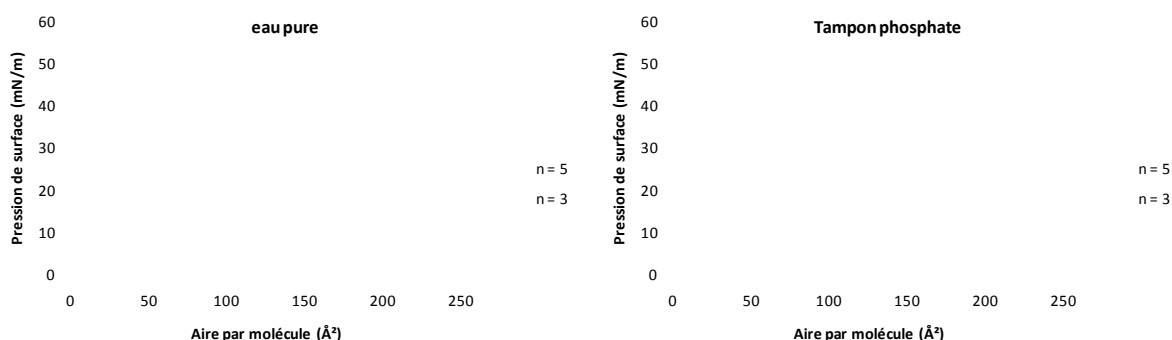


Figure 22 : Isothermes de compression pour les différentes longueurs de chaîne des diacides

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

Dans le cas des diacides aussi on observe la formation de monocouches stables, avec une activité de surface qui augmente avec la longueur de la chaîne fluorée et une aire par molécule qui évolue en sens inverse pour les mêmes raisons que précédemment.

Cependant, l'aire moléculaire, ici, est plus proche de l'aire occupée par deux chaînes fluorées ce qui laisse penser que le bras espaceur joue un rôle moindre dans l'organisation à l'interface. Une autre différence avec les diesters est que l'activité de surface est plus importante. Ceci est certainement dû au fait que les têtes polaires peuvent être ionisées ce qui entraîne de nouvelles interactions favorables au rapprochement des segments fluorés.

Pour le diacide **10b**, on observe une transition de phase et un plateau avant le collapse qui montre l'existence d'un état intermédiaire stable. Cet état disparaît lorsque la compression est réalisée sur une sous phase tamponnée.

L'influence générale de la salinité du tampon phosphate ne fait pas varier les valeurs de pression de surface et de l'aire par molécule. Le film présente également les mêmes valeurs de compressibilité.

b) Influence du pH

Comme pour les diesters, le pH de la sous phase a été changé pour observer les variations de l'aire par molécule et de l'organisation à l'interface. Pour les diacides les changements sont nettement plus visibles du fait de la présence du motif carboxylique qui peut se ioniser ainsi que comme précédemment les motifs amines. De plus les mesures ont été effectuées en présence de NaCl 0.15M pour se rapprocher du tampon physiologique.

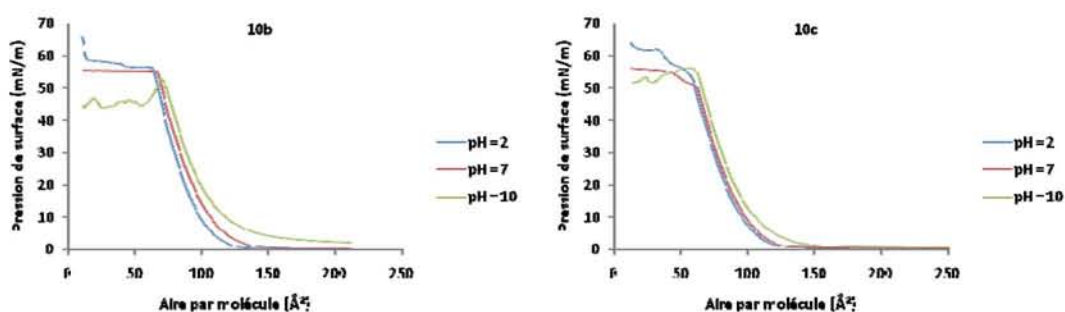


Figure 23 : Isothermes de compression pour différents pH dans une solution aqueuse NaCl 0.15M

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant, ainsi que le coefficient de compressibilité calculé comme précédemment.

Produit	Sous phase	Aire / molécule au collapse (\AA^2)	Pression de surface (mN/m)	Aire / molécule à la pression de 30 mN/m (\AA^2)	Coefficient de compressibilité (C_s^{-1})
10b	Eau pure	66	54	80	115
10b	NaCl 0.15M	66	55	84	121
10b	pH 10 NaCl 0.15M	71	52	89	114
10b	pH 2 NaCl 0.15M	62	56	80	130
10c	Eau pure	61	49	75	112
10c	NaCl 0.15M	62	50	77	106
10c	pH 10 NaCl 0.15M	63	54	81	103
10c	pH 2 NaCl 0.15M	59	53	75	101

Tableau 14 : Résultats pour les mesures de compression pour les diacides 10

C. Interactions géminis/oligonucléotides

Des mesures de compression ont été réalisées pour étudier l'interaction entre les molécules amphiphiles et des monobrin d'ADN de bas poids moléculaire. Ces monobrin d'ADN ont été choisis dans un premier temps car ils sont suffisamment représentatifs des brins d'ARN et par contre plus faciles à manipuler. Les mesures ont été effectuées comme précédemment dans un tampon phosphate mais avec l'ADN en sous phase à différentes concentrations. Seul le diester et le diacide avec la plus longue chaîne fluorée ont été étudiés (produits **10c** et **8c**) afin d'avoir les monocouches les plus hydrophobes et donc les plus stables.

1. L'ADN

L'ADN utilisé a été fourni par le Docteur R.DUVAL de la faculté de pharmacie de Nancy dans le cadre d'une collaboration. Il provient de la société Belge EUROGENTEC S.A. C'est un ADN monobrin comportant 24 bases. Le choix de cet ADN a été fait pour avoir des conditions proches d'un petit brin d'ARN susceptible d'être utilisé pour l'interférence ARN et dont la séquence est totalement définie. Cet oligonucléotide provient de sperme de saumon et il a la structure suivante :

AAC – TCG – GAA – TGG – AGA – ACA – CAG - ATC

Avec A = adenine ; T = thymine ; C = cytosine ; G = guanine.

La masse molaire de cet ADN est de $7401 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les solutions d'ADN sont préparées avec de l'eau milliQ et conservées à -15°C .

2. Etudes en films de Langmuir

a) Diester 8c

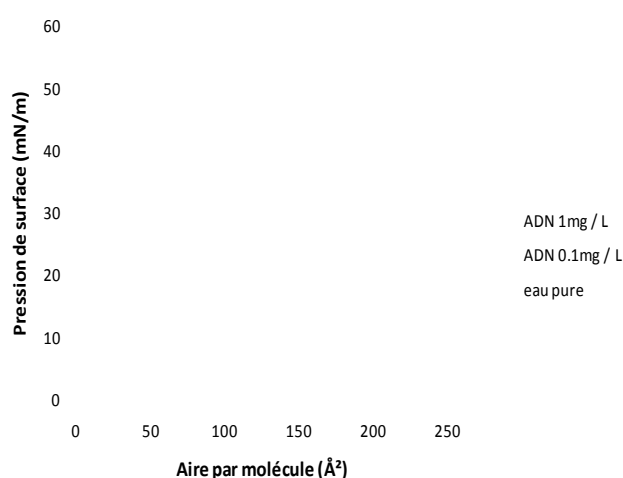


Figure 24 : Isothermes de compression du diester 8c avec différentes concentrations d'ADN en sous phase

Pour ces mesures, la quantité d'ADN introduite dans la sous phase est respectivement de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. L'isotherme avec une sous phase contenant $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ADN est sensiblement la même que celle sans ADN dans le tampon. Lorsque l'on met $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ADN en sous phase, on observe une compressibilité du film qui diminue et une aire moléculaire au collapse plus petite : 69 Å^2 contre 74 Å^2 .

Ce résultat est en contradiction avec ce qu'on observe classiquement avec l'ADN où l'interaction de l'ADN avec la monocouche de tensioactif est accompagnée d'une expansion du film moléculaire^{152,153}, comme par exemple dans des travaux de Lindman qui utilise le bromure de Dioctadecyl Dimethyl Ammonium.

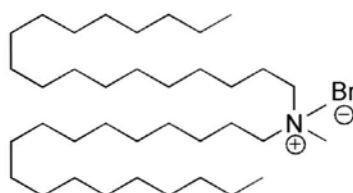


Schéma 19 : Structure du bromure de Dioctadecyl Dimethyl Ammonium

Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'à de faible densité de surface, les molécules s'organisent avec leur bras espaceur oxyéthylénique dans la sous-phase où les groupes NH peuvent être masqués par des interactions intramoléculaires de type liaisons hydrogène, avec la fonction

Chapitre 2 : Synthèse et propriétés physico-chimiques de géminis fluorocarbonés et formation de films monomoléculaires pour la caractérisation des interactions avec le matériel génétique

ester et donc aucune interaction avec l'ADN n'est observée. En augmentant la pression de surface, les molécules d'ADN peuvent interagir avec les tensioactifs stabilisant la forme ammonium et provoquer une transition de phase des têtes polaires d'une forme étendue du bras espaceur à une forme en U comme le montre la figure n° 25 :

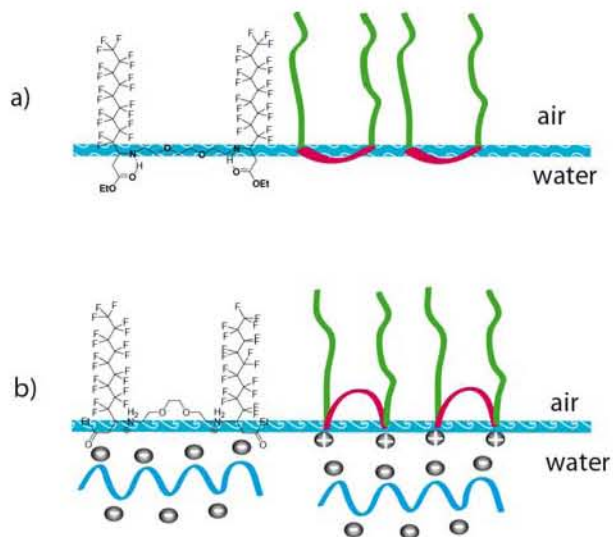


Figure 25 : Représentation de la transition de phase des bras espaceur

Cette observation n'est pas si inhabituelle¹⁵⁴, et semble dépendre de la rigidité, de la longueur et de l'hydratation du bras espaceur.

Produit	Sous phase	Aire / molécule au collapse (\AA^2)	Pression de surface (mN/m)	Aire / molécule à la pression de 30 mN/m (\AA^2)	Coefficient de compressibilité (C_s^{-1})
8c	sans ADN	74	41	82	88
8c	ADN 0.1mg / L	73	41	82	88
8c	ADN 1mg / L	69	42	82	92

Tableau 15 : Résultats des isothermes de compression des diesters en présence d'ADN

b) Diacide 10c

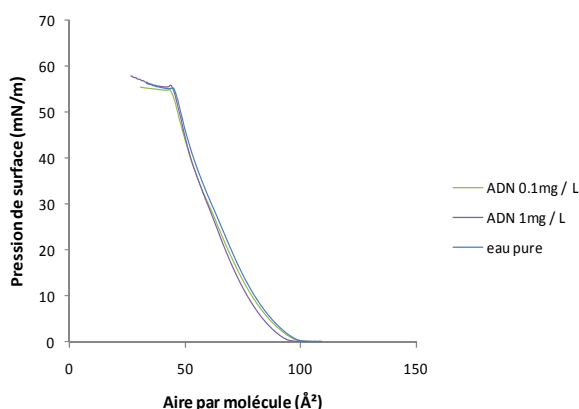


Figure 26 : Isothermes de compression du diacide 10c avec différentes concentrations d'ADN en sous phase

Les mêmes mesures ont été réalisées sur le diacide 10c, avec les mêmes conditions opératoires. Les résultats montrent des isothermes qui se superposent pratiquement. On peut noter toutefois que la compressibilité diminue très légèrement en début de compression lorsque l'on concentre la sous phase en ADN.

Produit	Sous phase	Aire / molécule au collapse (Å ²)	Pression de surface (mN/m)	Aire / molécule à la pression de 30 mN/m (Å ²)	Coefficient de compressibilité (C _s ⁻¹)
10c	Sans ADN	45	53	62	110
10c	ADN 0.1mg / L	45	53	61	110
10c	ADN 1mg / L	45	53	61	108

Tableau 16 : Résultats des isothermes de compression des diacides en présence d'ADN

D'après ces résultats, on peut dire que le diacide (10c) n'interagit pas avec l'ADN de manière significative. Le pH de la sous phase peut expliquer ce résultat. En effet, les molécules sont sous forme carboxylate à ce pH et il existe une interaction défavorable entre les charges négatives de ces fonctions et celles de l'ADN. De plus, comme pour les diesters, les motifs NH peuvent être masqués par des liaisons de type « liaisons hydrogènes » avec les motifs carboxylates. Ces résultats seront confirmés dans le chapitre suivant avec les homologues monocaténaire de ces diacides.

III. Vecteurs modèles pour le transport d'oligonucléotides

A. Synthèse de tensioactifs monocaténares

Des tensioactifs monocaténares ont ensuite été synthétisés afin d'obtenir des composés ayant une solubilité dans l'eau plus importante. Deux types de molécules ont été envisagés. Le premier correspond aux homologues monocaténares des bêta-aminoacides cités dans le chapitre précédent; ces composés ont été synthétisés suivant les mêmes protocoles expérimentaux. Le deuxième type de molécules correspond à des amines secondaires obtenues directement à partir des acides 3-fluoroprop-2-énoïques.

1. Synthèse de la partie hydrophobe

La synthèse des parties hydrophobes pour les tensioactifs monocaténares utilise donc les mêmes alcools de départ et les trois premières étapes sont similaires à celles de la synthèse des amphiphiles géminis.

2. Synthèse de tensioactifs monocaténares

a) *Tensioactifs de type bêta-aminoacides : par formation d'énamines*

Les tensioactifs monocaténares de type bêta-aminoacides sont préparés à partir des esters dérivés des acides 3-fluoroprop-2-énoïques.

La différence avec la synthèse des tensioactifs géminis se situe au niveau de l'introduction du motif polyaminé. Ici elle est introduite en large excès (10 eq) pour déplacer la réaction vers la formation du produit monocouplé.

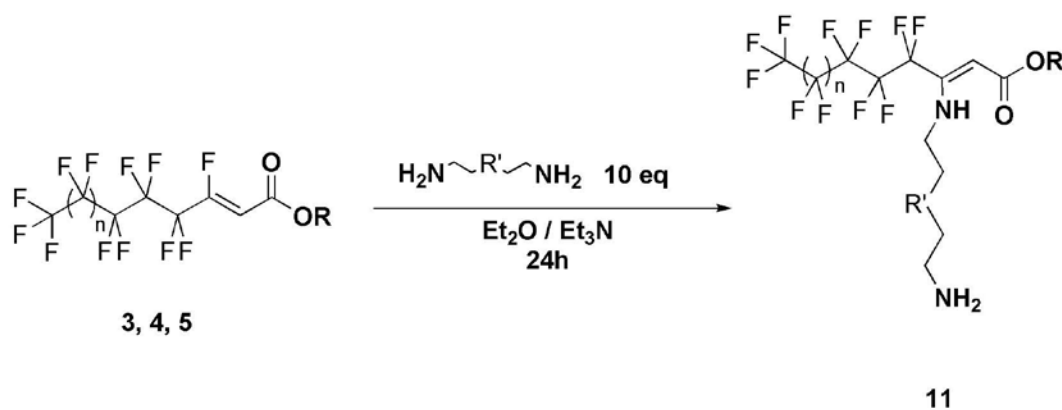


Schéma 20 : Synthèse d'énamines monocaténares à partir des esters 3, 4 et 5

Ces synthèses offrent de meilleurs rendements que pour les amphiphiles géminis et permettent une manipulation facilitée (solubilité, purification...).



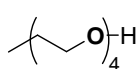

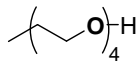

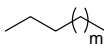

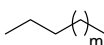

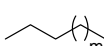

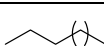

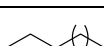

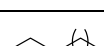

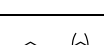

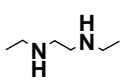
Produit	R	R'	n	m	Rendement
11a	Et		3	/	84
11b	Et		5	/	90
11c			3	/	50
11d			5	/	63
11e			3	9	81
11f			3	7	85
11g			3	4	90
11h			5	9	91
11i			5	7	93
11j			5	4	81
11k			1	7	80
11l	Et		3	/	40

Tableau 17 : Résultats pour la synthèse des énamines monocaténares

b) Tensioactifs de type amines secondaires : par formation d'imines

Une autre possibilité pour greffer une diamine éthoxylée ou une polyamine sur la chaîne fluorocarbonée est d'envisager la formation d'imines. Nous avons ainsi souhaité mettre à profit la réactivité des acides insaturés en présence d'amines. Une étude précédente réalisée au laboratoire a en effet, montré que l'action d'une amine primaire sur ces acides conduisait après chauffage à une imine^{62,155}, mise en évidence par IR et par RMN ¹H et ¹³C.



Schéma 21 : Schéma général de formation des imines

Cette réaction permet d'obtenir une imine après décarboxylation des acides. Le mécanisme proposé pour cette étape de décarboxylation est le suivant :

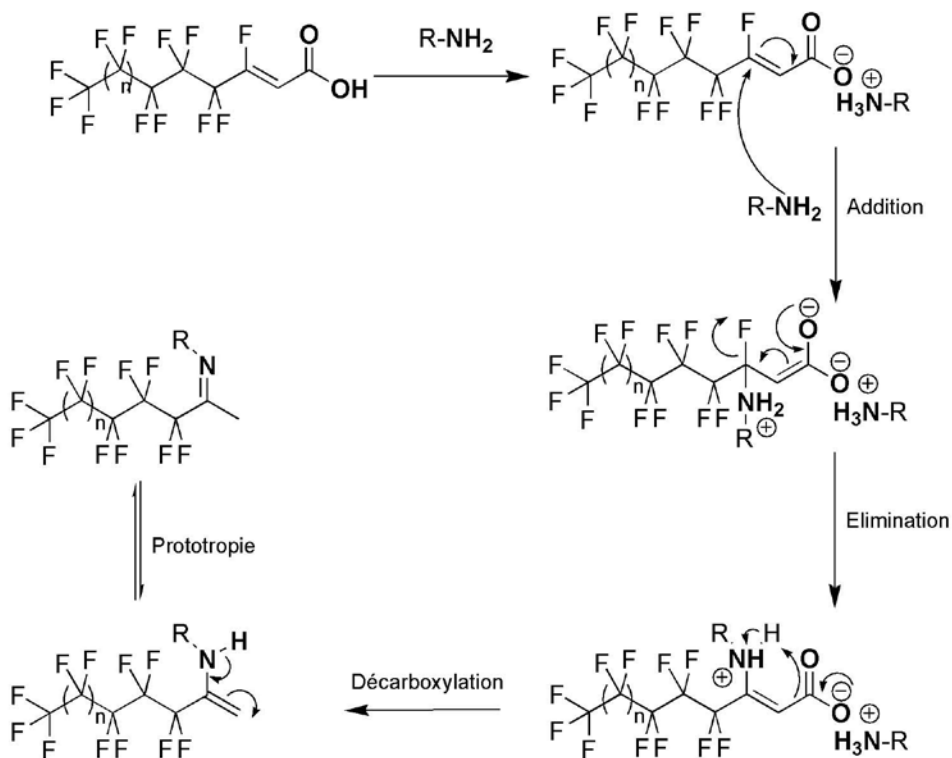


Schéma 22 : Mécanisme proposé pour la formation des imines

La première étape correspond à la formation d'un carboxylate d'ammonium. L'amine s'additionne alors selon un mécanisme d'addition-élimination pour former une énamine. Cette dernière joue alors le rôle de donneur de proton pour aider à la décarboxylation. La dernière étape est une prototropie selon le schéma d'équilibre classique imine-énamine. Il est à noter que l'équilibre est largement déplacé vers la forme imine.

Cette étude a été complétée et différentes amines primaires ont été testées. La réaction a ainsi été appliquée à des diamines éthoxylées. La partie polaire des molécules obtenues correspond au motif diamine éthoxylée. L'acide est solubilisé dans le toluène et la diamine est ajoutée en excès. Le mélange est alors porté à reflux pendant 48h. Les rendements obtenus sont bons, autour de 80%.

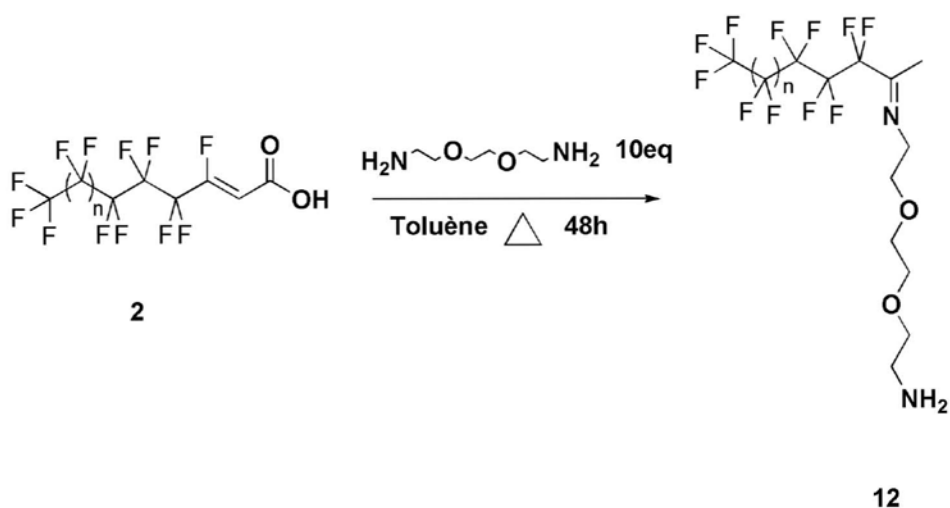


Schéma 23 : Synthèse des imines à partir des alcools 2

Produit	n	Rendement
12a	3	83
12b	5	85

Tableau 18 : Résultats pour la synthèse des imines monocaténares 12

La réaction a aussi été étendue à des amines fonctionnalisées telles que la lysine. Il a tout d'abord été nécessaire d'estérifier la lysine. Nous avons choisi comme produit de départ la lysine protégée par un motif BOC au niveau de l'amine α et Z au niveau de l'amine ϵ de la chaîne latérale. Cette réaction est réalisée en milieu acide et par reflux azéotropique. Ces conditions conduisent en même temps à la déprotection de l'amine α et permettent ainsi de limiter le nombre d'étapes.

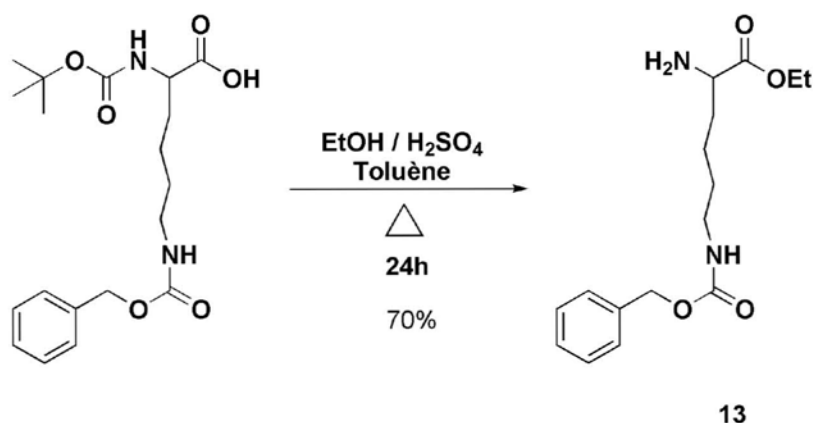


Schéma 24 : Estérification de la lysine protégée

Les rendements sont relativement bons et les produits ne nécessitent pas de purification particulière.

Ce composé a ensuite été condensé sur des acides fluorocarbonés de différentes longueurs de chaîne. Nous avons appliqué le même mode opératoire que celui utilisé précédemment avec des amines non fonctionnelles. La seule différence réside dans l'excès d'amine introduite, puisque nous avons utilisé dans ce cas 1,1 équivalent. En effet, dans ce cas il est préférable de n'utiliser qu'une quantité stoechiométrique de lysinate afin de faciliter la précipitation.

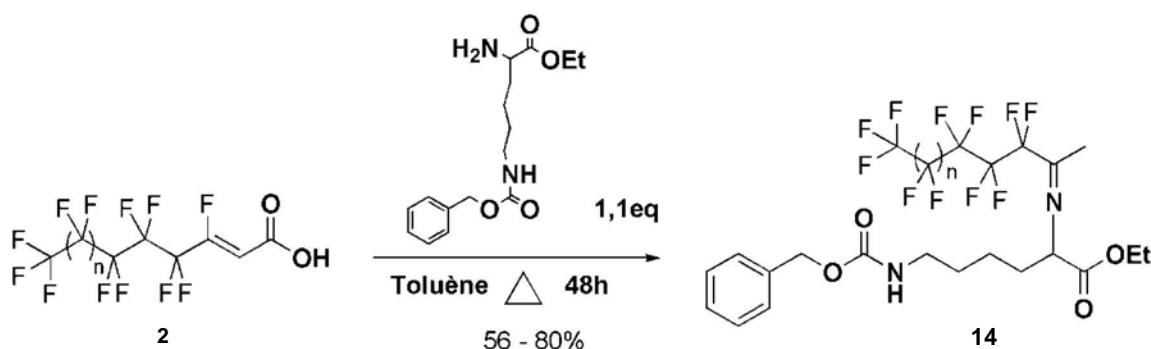


Schéma 25 : Formation d'imines à partir de la lysine estérifiée protégée en position ϵ

Produit	n	Rendement
14a	1	56
14b	3	75
14c	5	80

Tableau 19 : Résultats pour la formation des imines à partir de la lysine estérifiée protégée en position ϵ

Les produits sont purifiés par une chromatographie sur gel de silice par élution graduée hexane/AcOEt. Les rendements sont bons. Ils augmentent avec la longueur de la chaîne fluorée certainement grâce à l'effet électronique attracteur des atomes de fluor qui facilite l'étape de décarboxylation.

c) *Hydrogénation des énamines et des imines monocaténares*

La réduction des énamines est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment dans le cas des énamines géminés, c'est-à-dire par hydrogénation à 80 bars, en présence de Ni de Raney et à 50 °C pendant 24 h. Les rendements sont excellents et les produits obtenus ne nécessitent aucune purification.

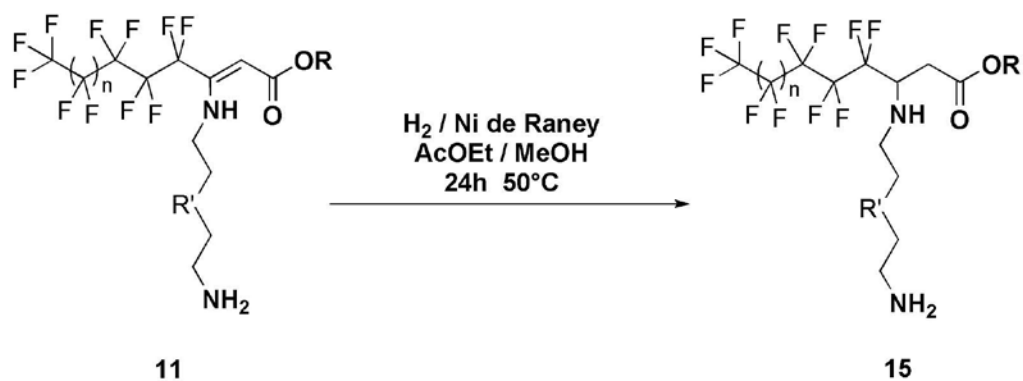


Schéma 26 : Réduction des énamines monocaténaïres

Produit	R	R'	n	m	Rendement
15a	Et	O O	3	/	92
15b	Et	O O	5	/	87
15c	O H 4	O O	3	/	94
15d	O H 4	O O	5	/	70
15e	m	O O	3	7	85
15f	m	O O	3	4	71
15g	m	O O	5	9	92
15h	m	O O	5	4	80
15i	Et	N H H N	3	/	60

Tableau 20 : Résultats pour la réduction des énamines monocaténaïres

Les imines sont également réduites en amines secondaires par le même procédé.

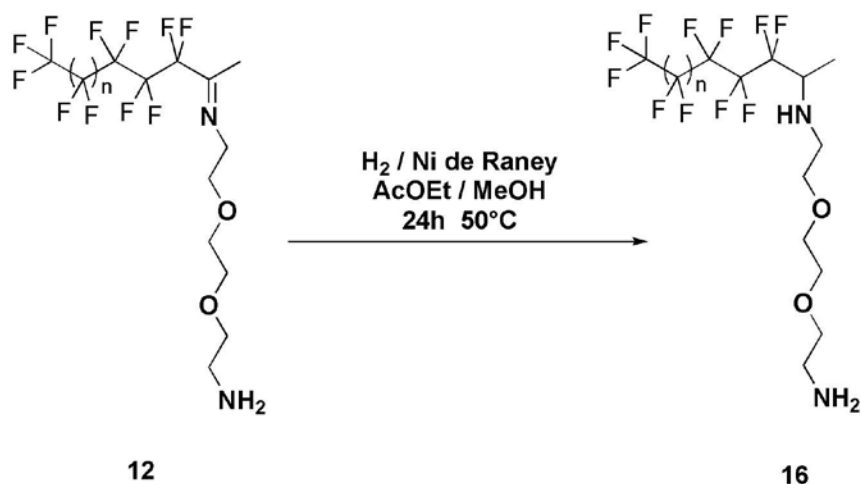


Schéma 27 : Réductions des imines monocaténares

Produit	n	Rendement
16a	3	90
16b	5	70

Tableau 21 : Résultats pour la réduction des imines monocaténares 16

En ce qui concerne les imines formées à partir de la lysine, cette étape de réduction permet dans un même temps de déprotéger le motif Z. Ces produits sont conservés sous forme de sels d'ammonium.

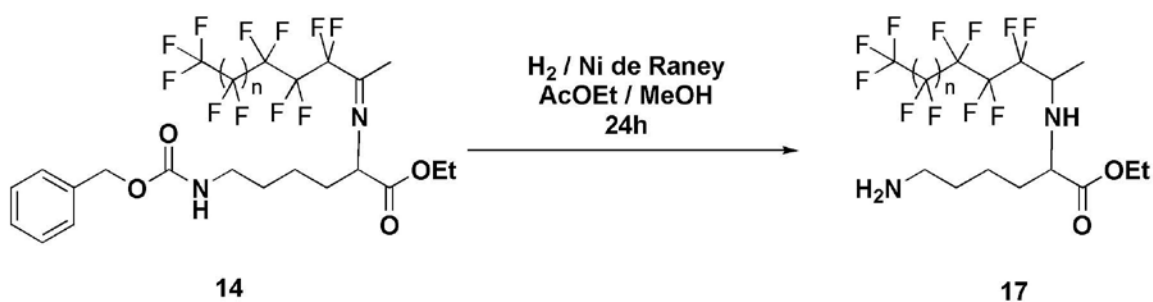


Schéma 28 : Réduction des imines 14

Produit	n	Rendement
17a	1	94
17b	3	92
17c	5	91

Tableau 22 : Résultats pour la réduction des imines 17

d) Saponification des esters monocaténares

Cette étape également se déroule avec le même mode opératoire que celui utilisé dans le cas des diesters. La saponification est effectuée sur les esters **15a** et **15b**. Ici encore les rendements sont bons et les produits sont isolés sous forme de chlorhydrate d'ammonium.

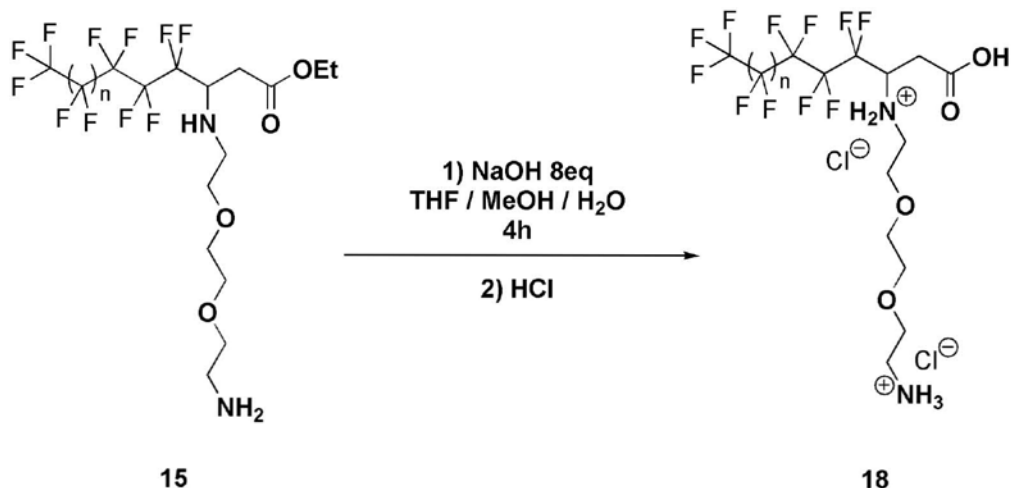


Schéma 29 : Saponification des esters d'éthyle monocaténares

Produit	n	Rendement
18a	3	75
18b	5	89

Tableau 23 : Résultats pour la saponification des esters monocaténares 15

B. Propriétés physico-chimiques en solution aqueuse

Les tensioactifs synthétisés ont une solubilité dans l'eau relativement élevée (saturation entre 10⁻³ M et 10⁻² M) et leurs propriétés physico-chimiques ont été étudiées en solution, dans l'eau dans un premier temps puis dans un tampon phosphate mimant le milieu physiologique : TRIS 0,05M, NaCl 0,15M et pH = 7,4 dans un second temps. Ces études ont été réalisées pour déterminer les concentrations d'agrégation critique, le type d'agrégat et leur taille afin d'obtenir un aperçu de leur organisation à l'interface air/eau et en solution.

1. Dans l'eau

Des solutions de différents tensioactifs ont été préparées avec de l'eau milliQ ultrapure à des concentrations autour de 10⁻³M proche de leur solubilité maximale.

a) Mesure de tension superficielle

Principe de la tensiométrie :

Cette technique permet une mesure directe de la concentration agrégative critique par mesure de la tension superficielle γ . La technique utilisée ici est celle dite de « la lame de Wilhelmy »¹⁵⁶.

Le dispositif est constitué d'une lame de platine dépolie reliée à une balance de précision électromagnétique. La lame est plongée dans la solution à étudier puis remontée jusqu'à ce que le bord inférieur affleure la surface et provoque un ménisque. A ce moment, la force mesurée pour compenser le poids du ménisque est :

$$F = 2 \cdot l \cdot \gamma \cdot \cos \theta$$

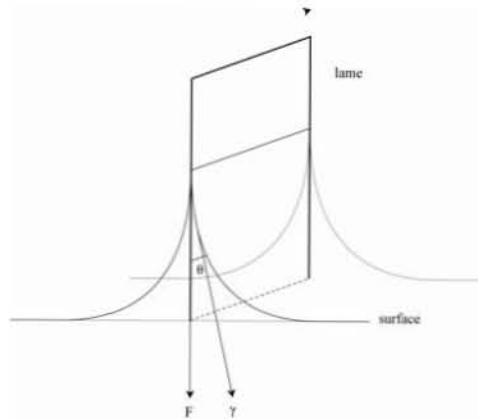


Figure 27 : Schéma des forces appliquées à la lame dans la méthode de Wilhelmy

L'équation précédente ne peut être utilisée en réalité que si θ est nul, car il est impossible de le mesurer. Si le mouillage de la lame est total on a alors : $\gamma = F/(2 \cdot l)$.

Gibbs a étudié les variations¹⁵⁷ de tension superficielle causées par de faibles ajouts de tensioactifs. Il a établi une relation à partir de l'expression de l'énergie libre de surface qui après simplification conduit à l'équation suivante :

$$A \cdot d\gamma + \sum n_i \cdot d\mu_i = 0$$

Avec **A** : aire de la surface ;

n_i : nombre de moles de l'espèce i à la surface ;

$\mu_i = \mu_i^0 + 2,303 \cdot R \cdot T \cdot \log C$: potentiel chimique de l'espèce i ;

γ : tension superficielle ;

L'équation de Gibbs permet de relier la quantité de tensioactif adsorbée à la surface et l'effet produit sur la tension superficielle :

$$\Gamma = - \frac{1}{2.3 \cdot R \cdot T} \frac{d\gamma}{d \log C}$$

Avec **C** : concentration totale en tensioactif en mol·L⁻¹

R : constante des gaz parfaits = 8,314 J·K⁻¹·mol⁻¹

T : température en Kelvin

$\Gamma = n / A$: concentration d'excès de surface du tensioactif

Cette relation montre que l'augmentation de la concentration en tensioactifs provoque une saturation progressive de la surface qui se traduit par un abaissement de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration.

Pour les tensioactifs ioniques, il faut tenir compte des contre ions associés en ajoutant un facteur (z+1) dans le membre de droite de l'équation précédente, z étant égal à la charge du tensioactif.

- Lorsque le tensioactif est non ionique on retrouve l'équation, z = 0
- Lorsque le tensioactif porte une charge, z = 1, il faut alors ajouter un facteur 2 et ainsi de suite. Toutefois, dans une solution dont la force ionique est supérieure à la concentration en tensioactif z=1, les charges partielles du tensioactif étant écrantées par les sels présents.

L'inverse de la concentration d'excès de surface Γ est égal à la surface occupée par une mole de tensioactif. On en déduit ainsi la surface par tête polaire minimum σ en divisant par le nombre d'Avogadro \mathcal{N}

$$\sigma = 10^{20} / \mathcal{N} \cdot \Gamma \quad \text{avec } \sigma \text{ en } \text{Å}^2 / \text{molécule}$$

Les variations de la tension superficielle d'une solution aqueuse de tensioactif obéissent à l'équation de Gibbs jusqu'à la concentration agrégative critique. Au delà de cette concentration, il y a une rupture de pente suivi d'un plateau qui montre qu'il n'y a plus de changement à l'interface air / eau. L'interface est saturée par un film monomoléculaire.

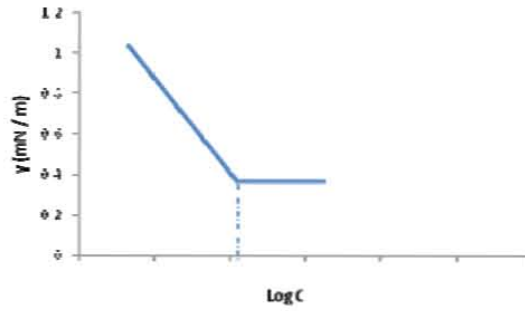


Figure 28 : Représentation d'une courbe de tensiométrie $\gamma = f(\log C)$

Résultats expérimentaux :

Les mesures de tensiométrie demandent un grand nombre de mesures et une quantité importante de produit. De plus pour obtenir une courbe il faut souvent plusieurs jours. Huit produits monocaténaire ont été étudiés par tensiométrie en solution dans l'eau à 22°C. Ces produits présentent différentes longueurs de chaîne et des variations au niveau de leurs têtes polaires.

Les courbes de tension superficielle en fonction de la concentration ont été établies pour déterminer la concentration d'agrégation de chaque produit testé et leur pouvoir tensioactif. Elles permettent également le calcul de l'aire par molécule.

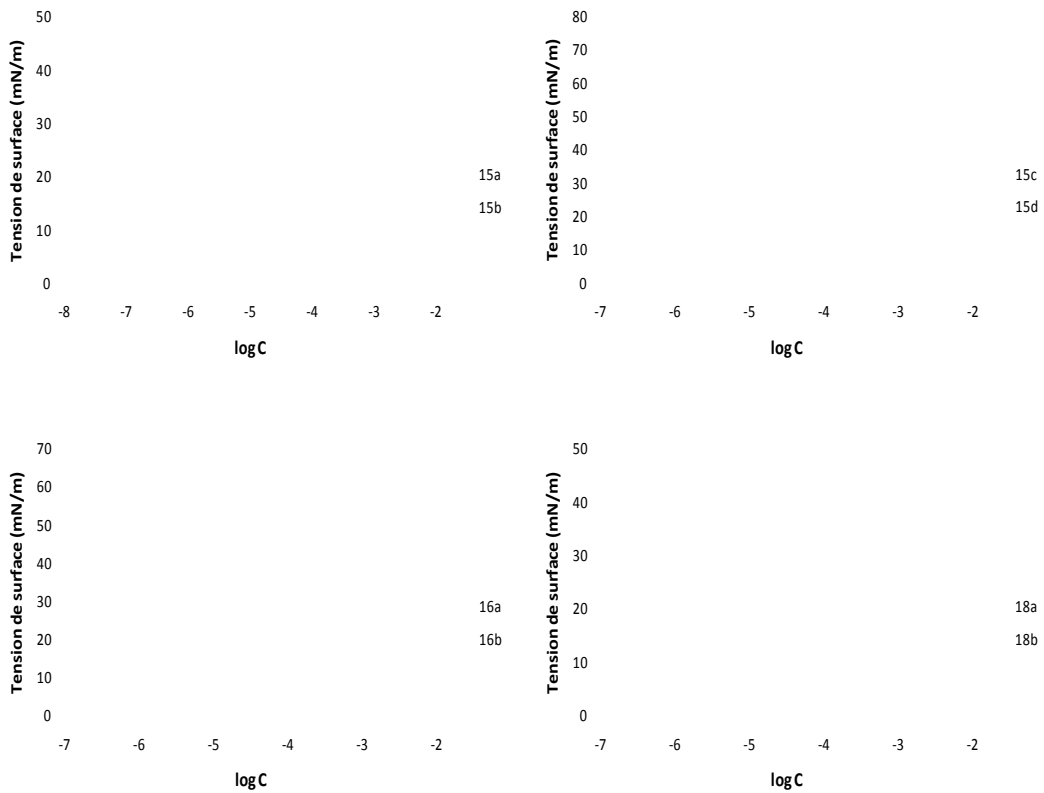


Figure 29 : Etude tensiométrique des produits 15, 16 et 18 dans l'eau

Produit	CAC (mol·L ⁻¹)	Aire par molécule calculée (Å ²)	Tension superficielle minimale (mN/m)
15a	8·10 ⁻⁶	27	19
15b	8·10 ⁻⁷	37	19
15c	3·10 ⁻⁵	37	19
15d	1·10 ⁻⁵	51	18
16a	6·10 ⁻⁵	34	20
16b	2·10 ⁻⁵	32	20
18a	5·10 ⁻⁵	35	18
18b	7·10 ⁻⁶	30	19

Tableau 24 : Résultats obtenus par tensiométrie pour les tensioactifs monocaténaires en solution dans l'eau

Dans tous les cas, l'abaissement de la tension de surface jusqu'à un palier semble indépendant de la longueur des chaînes fluorées. On observe un palier identique pour les chaînes contenant 7 motifs CF₂ et les chaînes contenant 9 motifs CF₂. De plus, ces différentes familles de molécules abaissent toutes la tension superficielle de l'eau autour de 18-20 mN/m. Ceci laisse penser que l'activité de surface est peu dépendante de la tête polaire des molécules contrairement aux tensioactifs bicaténaires précédemment étudiés dans un modèle 2D, à l'aide de la cuve de Langmuir, où la partie polaire était prépondérante sur l'organisation à l'interface. Comme pour les homologues bicaténaires le bras espaceur est suffisamment flexible pour s'aligner linéairement avec le segment hydrophobe.

Les concentrations agrégatives critiques sont relativement basses ; la CAC diminue avec l'augmentation de la longueur des chaînes hydrophobes. Pour les produits **16**, **15c** et **15d**, l'écart entre les CAC pour les différents segments fluorés est moindre que pour les esters **15a**, **15b** et les acides **18**.

Les aires par molécule, calculées à partir des pentes des courbes de tensiométrie, en considérant une charge par molécule, sont relativement proches de l'aire d'une section de chaîne fluorée, autour de 30 Å² et correspondent à la moitié de l'aire moléculaire de leurs homologues bicaténaires. Il est connu dans la littérature que le comportement thermodynamique des

monocouches adsorbées de Gibbs est similaire avec celui des monocouches épanchées de Langmuir^{158,159}. Malgré les différences entre les mécanismes de formations des deux films, leurs paramètres caractéristiques sont identiques ce qui permet de comparer directement l'aire par molécule au collapse et l'aire par molécule minimale adsorbée.

D'autres mesures de tensiométrie ont été effectuées dans l'eau sur des intermédiaires hydrophobes contenant un motif PEG, car ceux-ci présentent une solubilité dans l'eau suffisante. Ces résultats permettent d'étudier les différences de propriétés physico-chimiques avant et après l'introduction de la diamine et donc d'en étudier l'influence sur l'organisation en solution des tensioactifs.

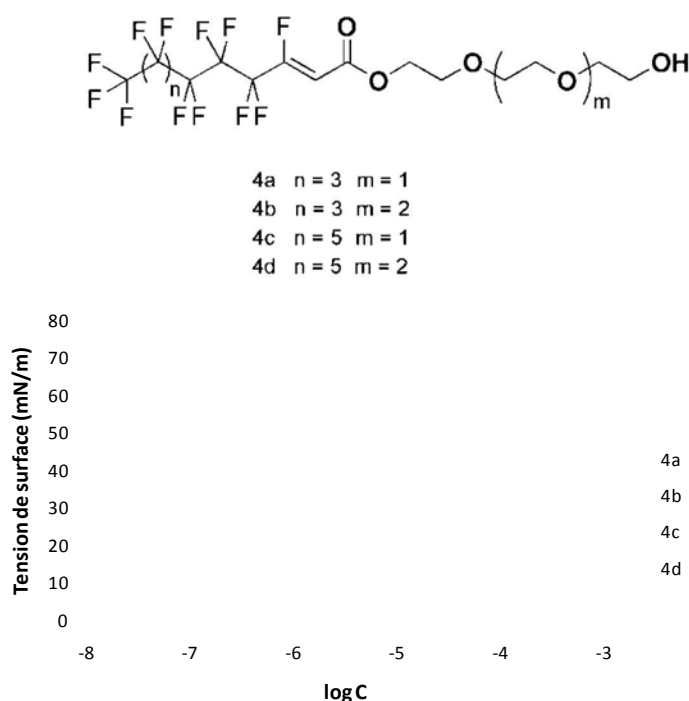


Figure 30 : Etude tensiométrique des produits 4a, 4b, 4c, 4d dans l'eau

Produit	CAC (mol.L ⁻¹)	Aire par molécule calculée (Å ²)	Tension superficielle minimale (mN/m)
4a	6·10 ⁻⁶	25	16
4b	1·10 ⁻⁵	36	16
4c	1·10 ⁻⁶	15	18
4d	2·10 ⁻⁶	15	15

Tableau 25 : Résultats obtenus par tensiométrie pour les tensioactifs monocaténaires 4 en solution dans l'eau

De manière générale, ces molécules abaissent encore plus la tension superficielle de l'eau que les tensioactifs monocaténaux précédents 15 – 18 mN/m du fait de leur plus grande hydrophobie. Leur CAC est également plus petite pour la même raison. Au niveau de l'aire moléculaire elle est du même ordre de grandeur qu'une chaîne fluorée sauf pour les produits 4c et 4d où l'hydrophobie importante et une solubilité faible peuvent être responsables de ce résultat peu cohérent.

b) La diffusion de la lumière

La technique de la diffusion de la lumière est basée sur la déviation de la lumière incidente par les particules, c'est cette lumière déviée qui est ensuite analysée. Le niveau de diffusion dépend de plusieurs facteurs comme la longueur d'onde, la densité de particules et de molécules, et l'épaisseur de l'échantillon que le rayonnement doit franchir. La lumière sera diffusée si elle passe dans un milieu polarisable ou qui a une constante diélectrique différente de l'unité. Il y a deux types de diffusion de lumière, la diffusion statique et la diffusion dynamique de la lumière. Ces deux techniques utilisent une source laser (le plus souvent un laser hélium : néon émettant à 633 nm).

(1) Mesure de diffusion statique de la lumière

Cette méthode permet de déterminer la concentration agrégative critique d'un produit en repérant la rupture de pente dans la courbe reliant la concentration et l'intensité de la diffusion de la lumière à chaque concentration. Cette technique possède plusieurs avantages. La quantité de produit nécessaire est négligeable par rapport à la tensiométrie et la mesure est nettement plus rapide et permet d'obtenir des résultats reproductibles avec une faible marge d'erreur. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière (paragraphe suivant) ont montré des agrégats d'une taille adéquate pour pouvoir utiliser la technique de diffusion statique de la lumière et de vérifier l'approximation RGD¹⁶⁰⁻¹⁶² (Rayleigh-Gans-Debye). Cette approximation repose sur deux hypothèses pour les propriétés des agrégats: (1) l'indice de réfraction des agrégats en solution est proche de celui du solvant utilisé (ici l'eau) et (2) la taille des agrégats est plus petite que la longueur d'onde de la lumière utilisée^{163,164}. Ces deux conditions sont souvent exprimées par les deux inégalités suivantes :

$$\left| \frac{n_a}{n_p} - 1 \right| \ll 1 \quad (1)$$

$$\frac{4\pi a}{\lambda} \ll 1 \quad (2)$$

Chapitre 3 : Vecteurs modèles pour le transport d'oligonucléotides

Où n_1 est l'indice de réfraction de la membrane lipidique, n_0 est l'indice de réfraction du solvant, λ est la longueur d'onde de la lumière et a est la taille caractéristique de l'objet diffusant. Ces mesures ont été réalisées sur les mêmes solutions dans l'eau et à 22°C également. Les résultats sont présentés ci-dessous.

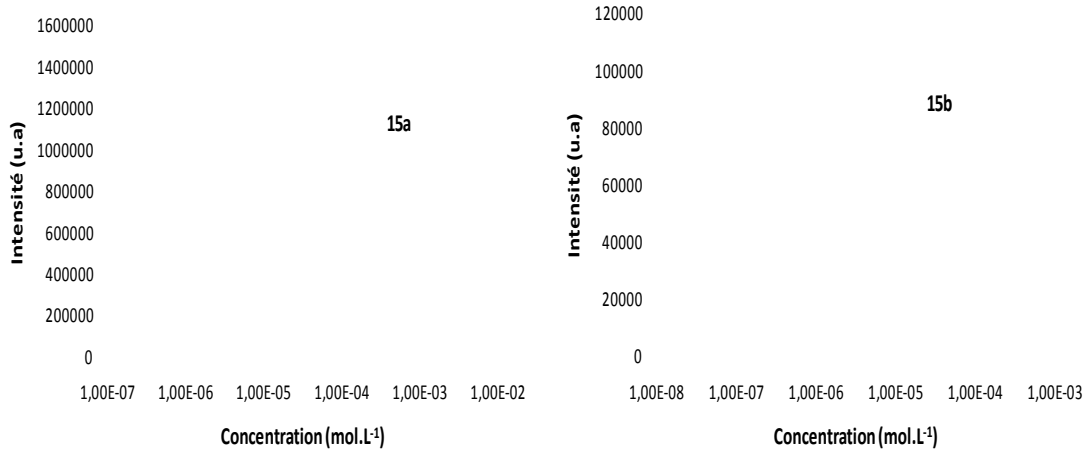


Figure 31 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 15a et 15b dans l'eau

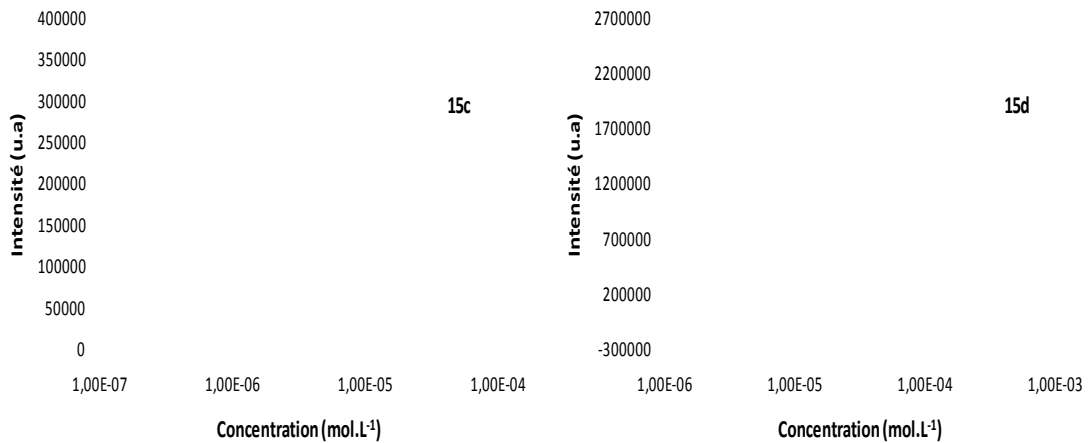


Figure 32 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 15c et 15d dans l'eau

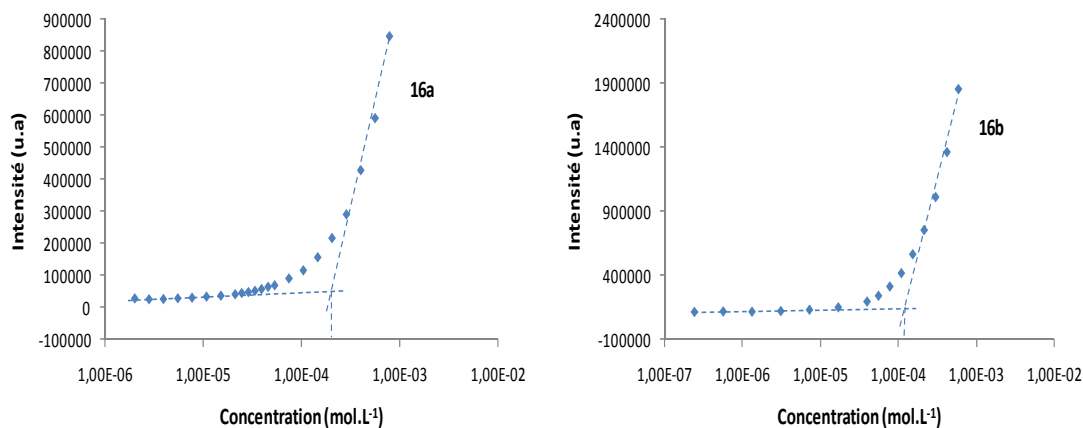


Figure 33 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 16a et 16b dans l'eau

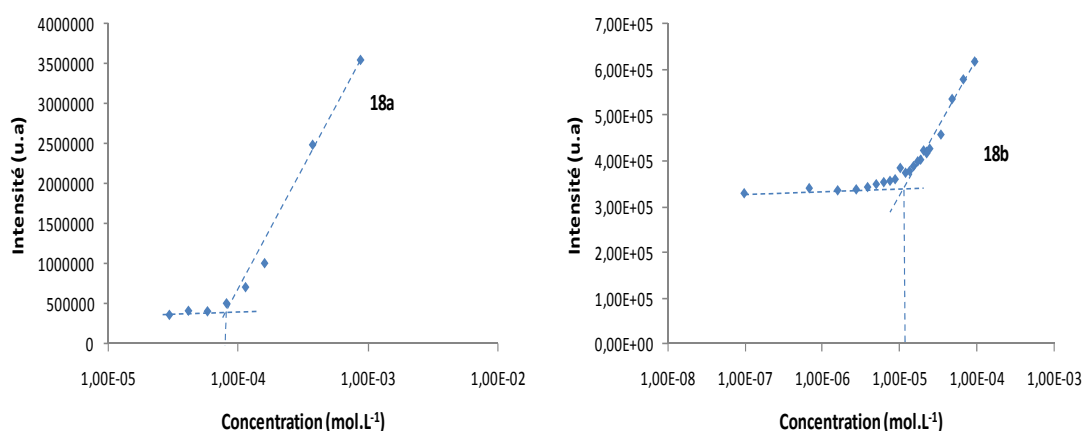


Figure 34 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 18a et 18b dans l'eau

Résultats :

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant ainsi que les résultats de tensiométrie.

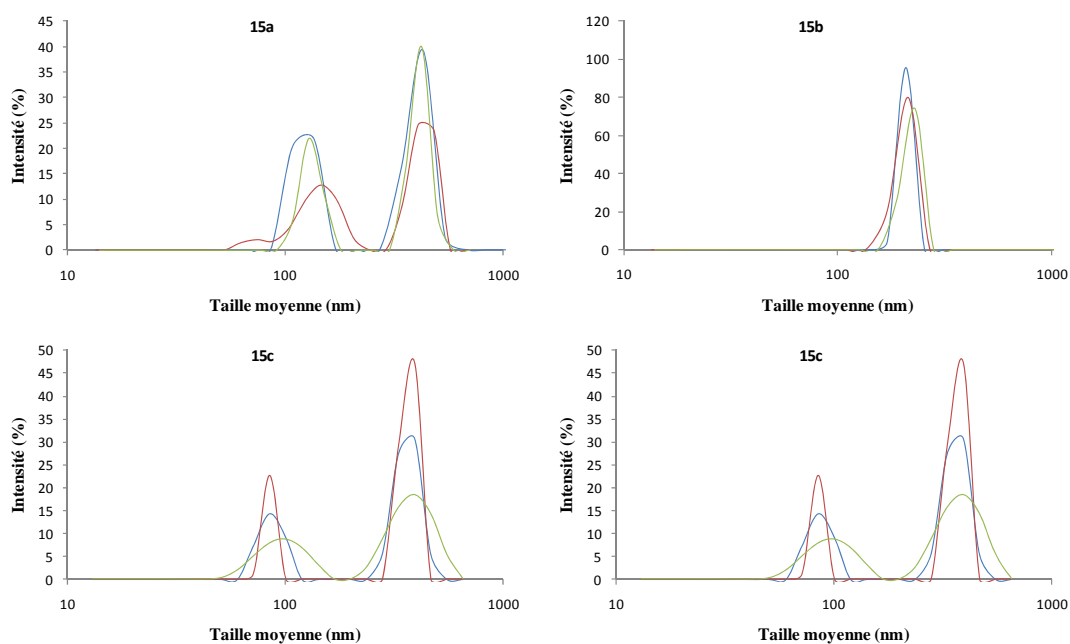
Produit	CAC (mol·L ⁻¹) diffusion	CAC (mol·L ⁻¹) tensiométrie
15a	6·10 ⁻⁵	8·10 ⁻⁶
15b	4·10 ⁻⁶	8·10 ⁻⁷
15c	7·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁵
15d	4·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵
16a	2·10 ⁻⁴	6·10 ⁻⁵
16b	1·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁵
18a	8·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵
18b	1·10 ⁻⁵	7·10 ⁻⁶

Tableau 26 : Résultats pour les CAC des différents tensioactifs en diffusion et en tensiométrie dans l'eau

On observe une seule inflexion dans la courbe de diffusion de chaque produit correspondant à la CAC. Cette méthode permet, d'après ces résultats, de confirmer les valeurs de CAC obtenues par tensiométrie pour la plupart des produits.

(2) Mesure de diffusion dynamique de la lumière

Dans cette partie, le but était de déterminer la taille et la distribution de taille des agrégats formés spontanément. La technique de diffusion quasi élastique de la lumière¹⁶⁵ permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique d'une particule dans une solution de viscosité donnée et à température connue, en fonction de son coefficient de diffusion selon la relation de Stockes – Einstein. Un des principaux avantages de la diffusion dynamique de la lumière est l'obtention de mesures absolues, en effet cette technique est calibrée automatiquement. La calibration est en fait déterminée par la longueur d'onde du laser utilisée, la période d'une horloge contrôlée par un cristal, l'angle d'observation, et les paramètres physiques du solvant (viscosité et indice de réfraction); tous ces paramètres étant connus. Ces mesures ont été réalisées à 25°C. Les résultats sont présentés ci-dessous.



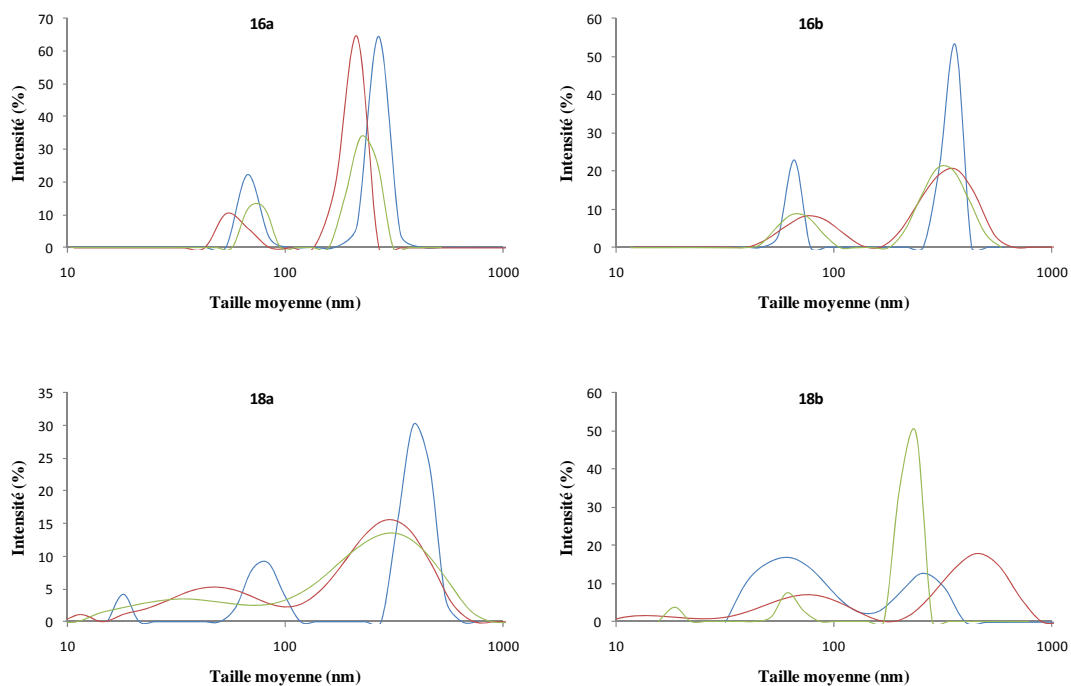


Figure 35 : Taille et répartition des agrégats formés par les différents tensioactifs

On observe pratiquement pour chaque tensioactif une répartition en deux familles. Les valeurs de la taille des agrégats des différents tensioactifs sont données en (nm) dans le tableau suivant :

Produit	Diamètre hydrodynamique (nm)
15a	130 et 400
15b	215
15c	80 et 300
15d	120 et 250
16a	60 et 250
16b	70 et 320
18a	30 et 300
18b	50 et 270

Tableau 27 : Taille moyenne des particules formées par les différents tensioactifs

La taille des agrégats et la distribution de taille sont stables à température ambiante pendant au moins 48h pour chaque composé.

c) Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique utilise un faisceau accéléré d'électrons qui lorsqu'il interagit avec un échantillon, donne naissance à une image sur un écran fluorescent. La résolution peut atteindre 0,8 Å. La caractérisation des agrégats dans l'eau a été confirmée par une technique de microscopie électronique à transmission (MET) avec contrastant¹⁶⁶. Cette technique est dite de coloration négative où le contrastant, le phosphomolybdate de tungstène a une affinité pour les parties polaires et permet ainsi d'opacifier ces parties de l'espace.

En ce qui concerne les vésicules, le développement de méthodes sophistiquées de formation a permis d'arriver à contrôler les caractéristiques des vésicules obtenues, distinguées selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques :

- les vésicules multilamellaires appelées MLVs pour "multilamellar vesicles" (200 nm à 1 µm de diamètre)
- les vésicules unilamellaires de petite taille, appelées SUVs pour "small unilamellar vesicles" (20 à 200 nm de diamètre)
- les vésicules unilamellaires de grande taille, appelées LUVs pour "large unilamellar vesicles" (200 nm à 1 µm de diamètre)

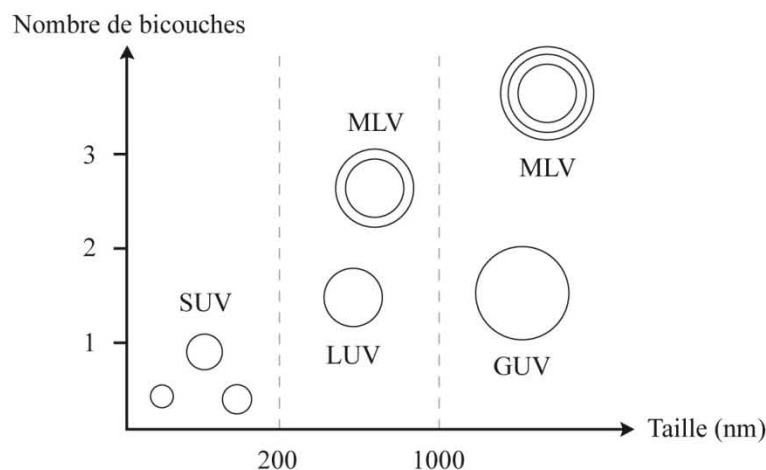


Figure 36 : Classification des liposomes

Les SUVs et LUVs, souvent considérées de manière indiscernée sous le terme de liposomes ont permis de faire des avancées importantes en biophysique et en biochimie des membranes. Les MLVs relèvent d'une utilisation marginale et sont beaucoup moins utilisées.

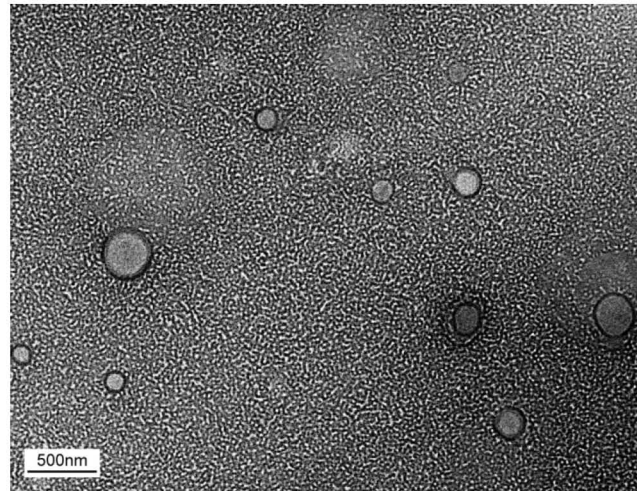
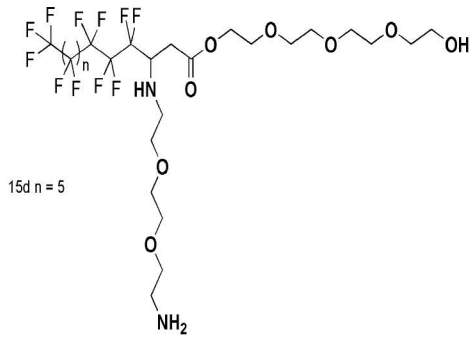


Figure 40 : Micrographie électronique du produit 15d

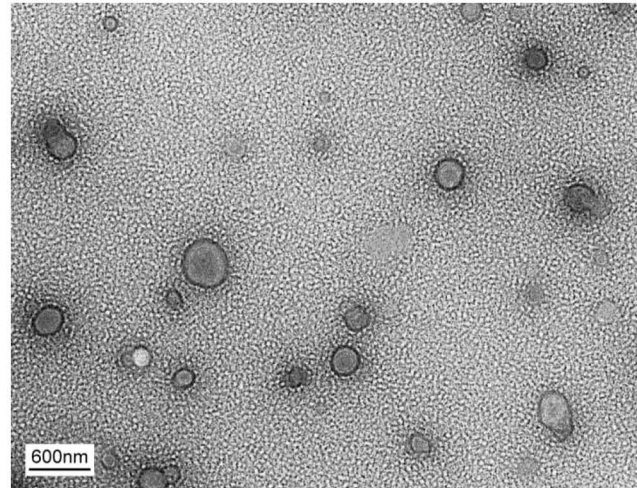
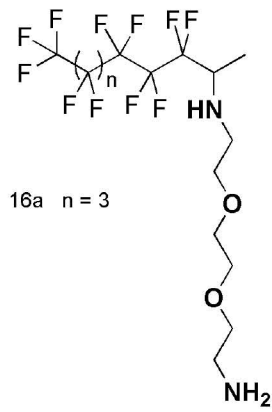


Figure 41 : Micrographie électronique du produit 16a

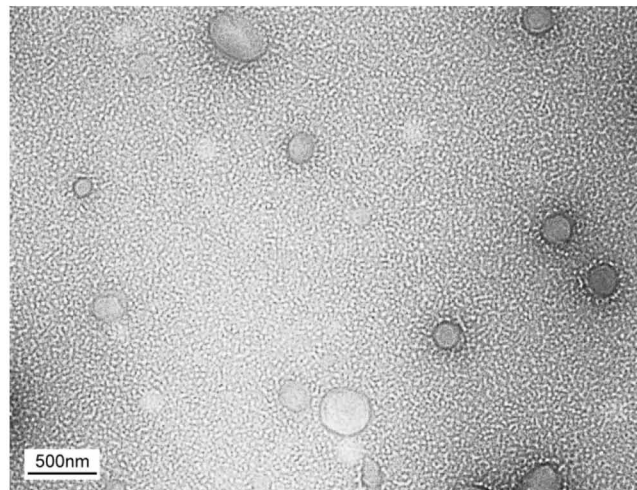
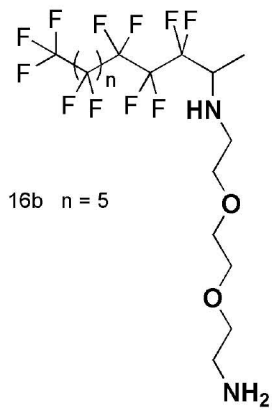


Figure 42 : Micrographie électronique du produit 16b

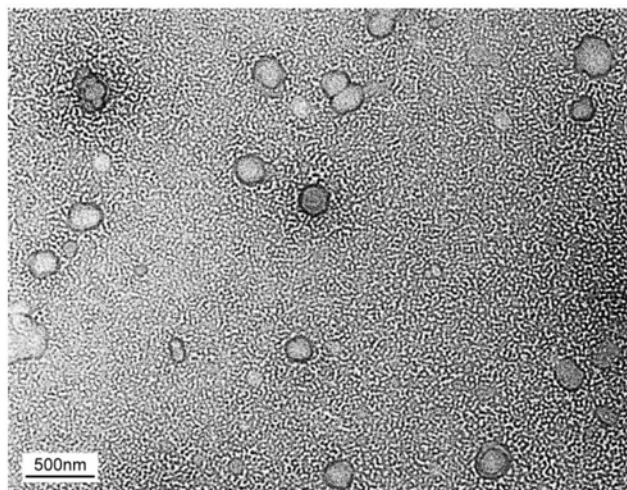
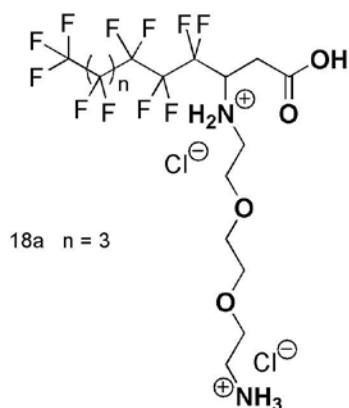


Figure 43 : Micrographie électronique du produit 18a

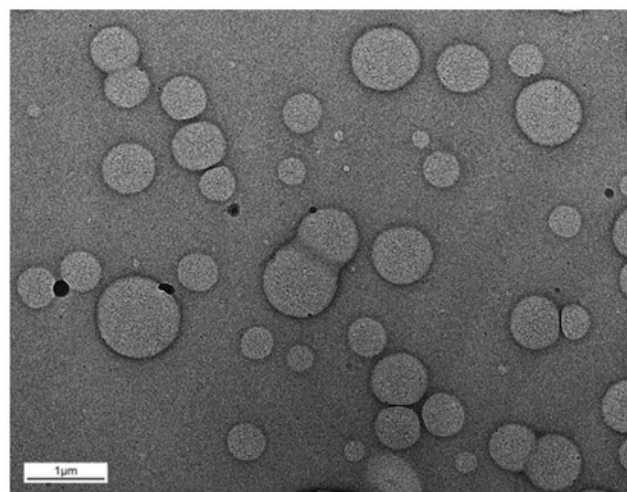
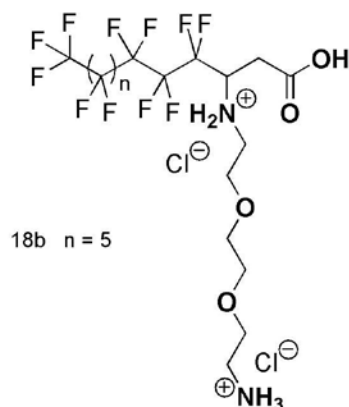


Figure 44 : Micrographie électronique du produit 18b

Ces microphotographies MET montrent que tous les produits testés semblent former spontanément des vésicules unilamellaires de grandes tailles (autour de 350nm) dans l'eau. Cette organisation forte dépend peu de la tête polaire des molécules et est probablement due à la présence de chaînes fluorées fluorophiles. Les vésicules fluorées, comparées à leurs homologues hydrogénées, sont connues pour être plus stables et moins perméables aux principes actifs grâce à leur meilleur caractère hydrophobe et à la rigidité des chaînes fluorocarbonées¹⁶⁷. Dans la littérature, on trouve peu d'exemples de tensioactifs monocaténaire qui s'auto-organisent spontanément en vésicules^{125,168,169}, ce qui montre déjà l'intérêt de ces amphiphiles pour la vectorisation d'oligonucléotides. Toutefois, cette étude va être complétée par d'autres mesures de microscopie, en particulier par cryofracture (cryoTEM) afin de confirmer le type de modèle membranaire que l'on obtient et d'évaluer leurs caractéristiques exactes.

2. Dans un tampon phosphate pH = 7.4

a) Mesure de tension superficielle

Les mêmes mesures de tensiométrie ont été effectuées sur les mêmes produits mais dans un tampon phosphate, mimant le milieu physiologique, afin d'évaluer les éventuelles différences d'auto-organisation. Seule la température n'est pas changée pour pouvoir comparer seulement la différence de milieu et permettre d'établir des relations entre l'architecture des agrégats et les structures des molécules. Les résultats sont présentés ci-dessous.

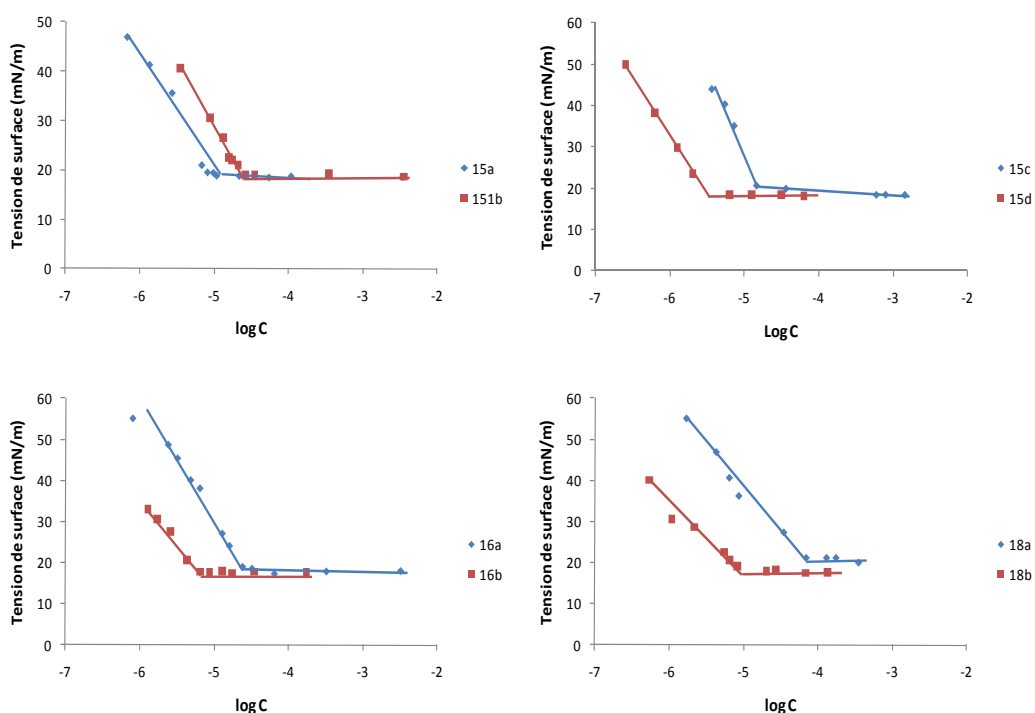


Figure 45 : Etude tensiométrique des produits 15, 16 et 18 dans un tampon phosphate

En général, les valeurs de CAC mesurées dans le tampon phosphate par tensiométrie sont plus élevées que celles mesurées dans l'eau. Habituellement, il est décrit dans la littérature que la CAC des tensioactifs diminue lorsque la force ionique augmente^{170,171}. Toutefois, dans certains travaux, on peut noter qu'il n'y a pas de différence entre les valeurs mesurées en présence ou non de sels¹⁷², due à une bonne tolérance à la force ionique des surfactants utilisés. Dans notre cas, l'augmentation des valeurs de CAC mesurées dans la solution tampon reflète une agrégation plus difficile avec une force ionique élevée.

Dans ce cas aussi, comme pour l'eau pure, le plateau atteint pour la tension superficielle est du même ordre pour tous les produits (18-20 mN/m). L'aire par molécule calculée est sensiblement la même que précédemment autour de 30-40 Å² à part pour les acides 18a et 18b où il y a apparition

d'un groupement carboxylate. Cette aire par molécule se rapproche de l'aire d'une section fluorée et représente la moitié de l'aire mesurée pour les homologues bicaténaires précédents. L'aire à l'interface semble donc gouvernée par la partie fluorée et le motif oxyde d'éthylène est suffisamment flexible pour être aligné à la partie hydrophobe.

Produit	CAC (mol·L ⁻¹)	Aire par molécule (Å ²)	Tension superficielle minimale (mN/m)
15a	1·10 ⁻⁵	38	19
15b	2·10 ⁻⁵	36	19
15c	3·10 ⁻⁵	38	18
15d	6·10 ⁻⁶	32	18
16a	3·10 ⁻⁵	38	18
16b	6·10 ⁻⁶	42	18
18a	7·10 ⁻⁵	45	20
18b	9·10 ⁻⁶	53	18

Tableau 28 : Résultats de tensiométrie pour les tensioactifs monocaténaires

Pour le calcul de l'aire par molécule, on est dans le cas d'une forte concentration en électrolyte et les charges partielles des tensioactifs sont écrantées. Comme les valeurs sont sensiblement les mêmes dans le tampon phosphate et dans l'eau pure, on peut d'après l'équation de Gibbs en déduire que les tensioactifs dans l'eau pure ont une seule charge et que seul le motif NH₂ est protonné.

Au pH physiologique du tampon utilisé et d'après les pKa issus de la simulation (ACDsketch) pour les motifs amine primaire (8,7) et secondaire (3,8), seulement le motif NH₂ se protonne dans ces conditions. Les valeurs de ces pKa tiennent compte des effets électroniques de la chaîne fluorée et des groupements carbonyle qui stabilise la forme NH en β du segment fluoré. De plus, pour certains des produits, cette forme est stabilisée par liaisons hydrogènes intramoléculaire.

b) Mesure de diffusion statique de la lumière

De la même façon, des mesures de diffusion statique de la lumière ont été réalisées sur les produits solubilisé dans le tampon phosphate. Les résultats sont présentés ci-dessous.

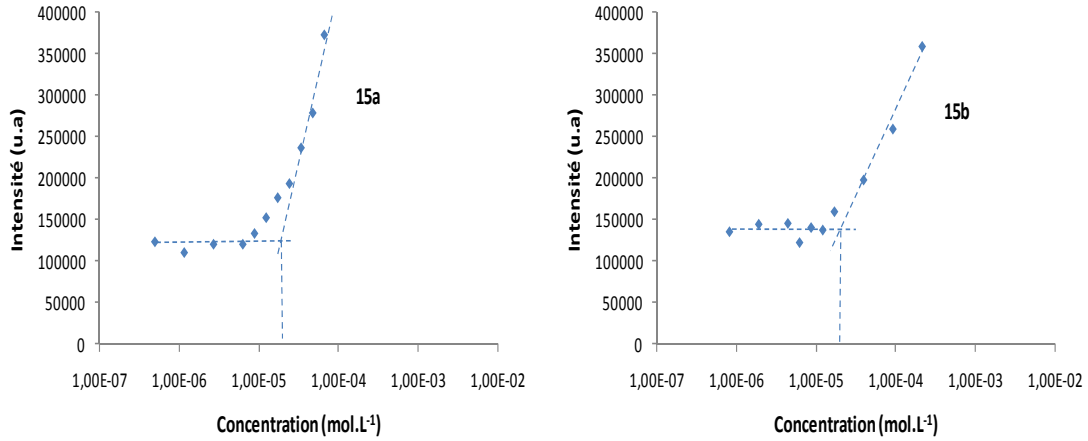


Figure 46 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 15a et 15b dans un tampon phosphate

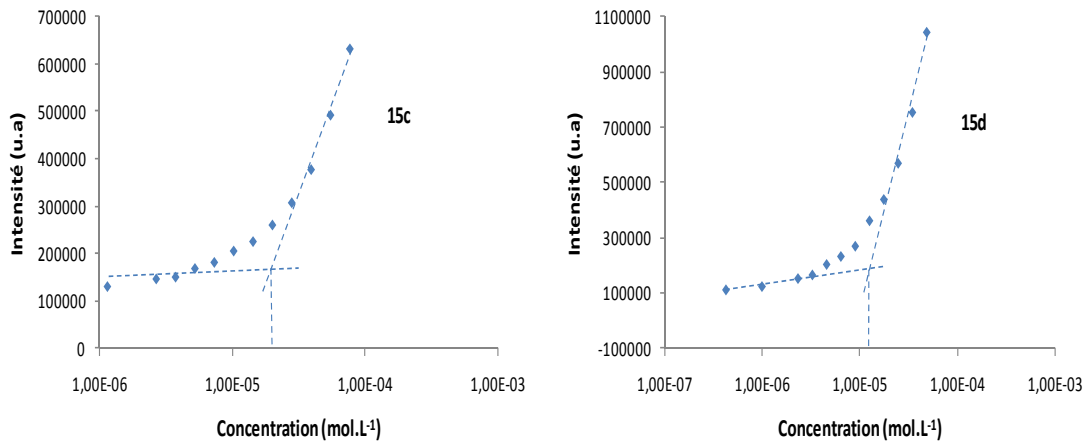


Figure 47 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 15c et 15d dans un tampon phosphate

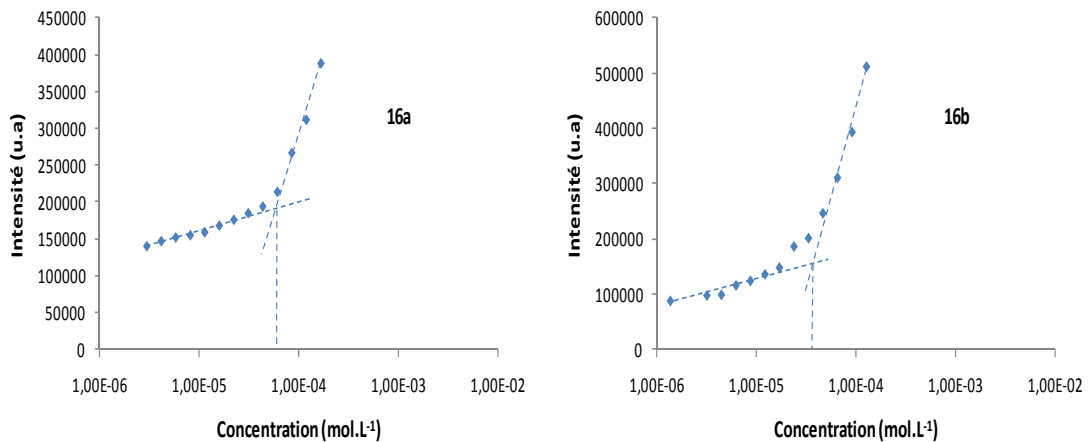


Figure 48 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 16a et 16b dans un tampon phosphate

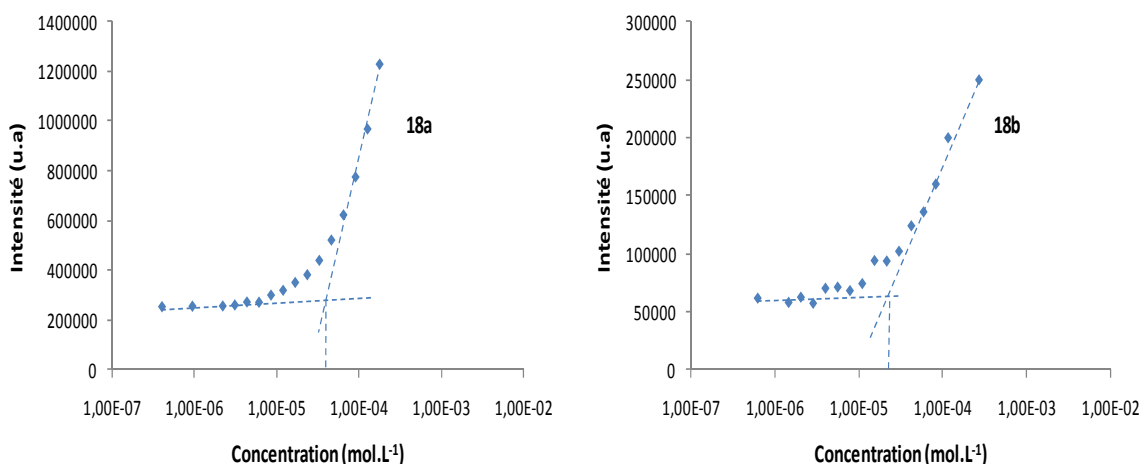


Figure 49 : Etude de diffusion statique de la lumière pour les produits 18a et 18b dans un tampon phosphate

Résultats :

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant ainsi que les résultats de tensiométrie.

Produit	CAC (mol·L ⁻¹) SLS	CAC (mol·L ⁻¹) TS
15a	2·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵
15b	1·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵
15c	3·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵
15d	1·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁶
16a	7·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵
16b	3·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁶
18a	5·10 ⁻⁵	7·10 ⁻⁵
18b	2·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁵

Tableau 29 : Résultats pour les CAC des différents tensioactifs en diffusion et en tensiométrie dans le tampon phosphate

On observe encore une seule inflexion pour ces courbes de diffusion de la lumière. Ces valeurs confirment les valeurs obtenues en tensiométrie dans le tampon phosphate.

c) Mesure de diffusion dynamique de la lumière

D'autres mesures de diffusion quasi élastique de la lumière ont été effectuées afin de déterminer la taille des agrégats formés mais en milieu tamponné et de les comparer aux valeurs obtenues dans l'eau.

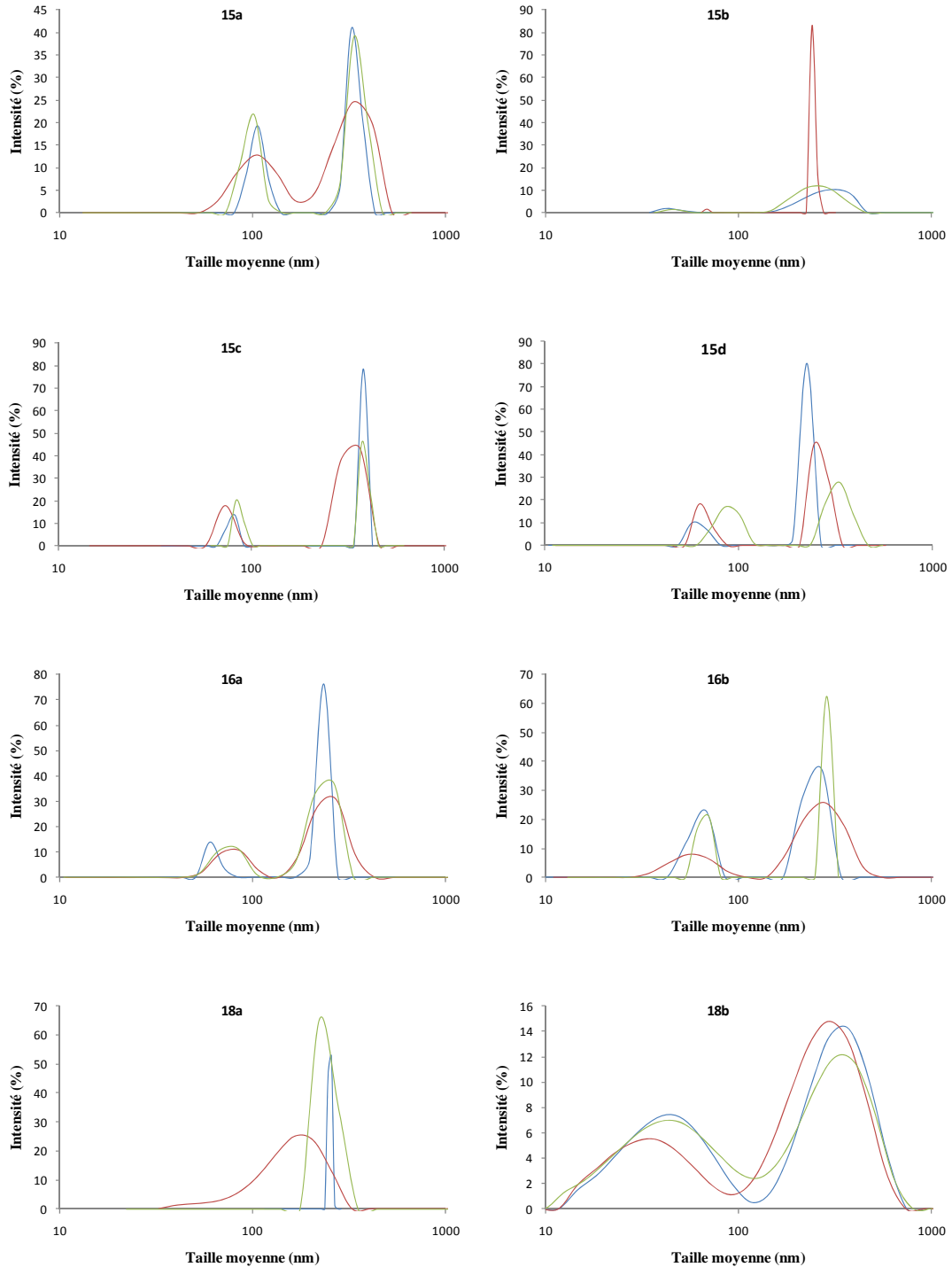


Figure 50 : Taille et répartition des agrégats formés par les différents tensioactifs

Produit	Diamètre hydrodynamique (nm)
15a	100 et 360
15b	50 et 250
15c	80 et 350
15d	70 et 260
16a	75 et 230
16b	65 et 200
18a	240
18b	45 et 340

Tableau 30 : Taille moyenne des particules formées par les différents tensioactifs

On observe de manière générale deux tailles de particule, peu différentes des valeurs obtenues dans l'eau, qui semble suffisante pour l'encapsulation de notre monobrin d'ADN. La taille des vésicules et la distribution de taille est stable pendant 48h à température ambiante. Ces résultats montrent une certaine stabilité des vésicules fluorées formées vis-à-vis de différents paramètres comme la concentration en sels et le temps. Cette observation est un argument de plus pour l'emploi de ces tensioactifs comme vecteurs d'oligonucléotides.

C. Interactions tensioactifs synthétisés / ADN

1. Introduction

L'objectif de cette partie est d'étudier l'interaction entre les tensioactifs et l'ADN afin de pouvoir évaluer s'ils sont de bons vecteurs. Pour ces études, l'ADN utilisé est le même que précédemment, monobrin comportant 23 bases phosphates. Ces études sont réalisées en tenant compte du ratio entre le nombre de motif azoté et le nombre de bases phosphate (N/P). Avant toute mesure, un spectre d'absorbance de l'ADN a été effectué afin de déterminer la longueur d'onde d'absorbance maximale : ici 260nm.

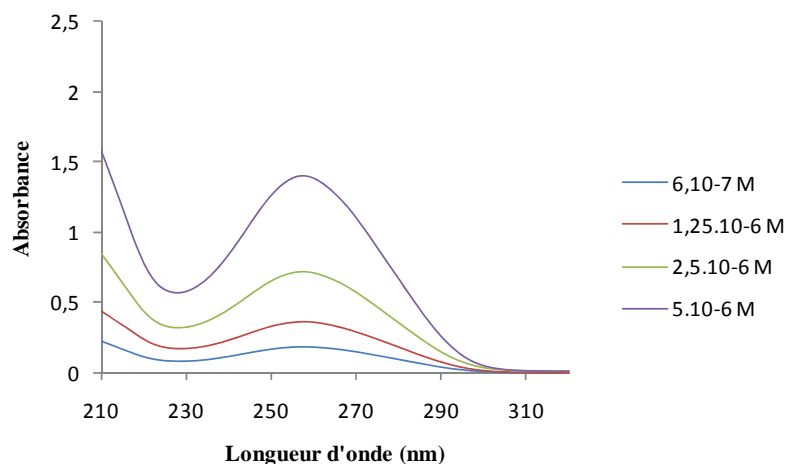
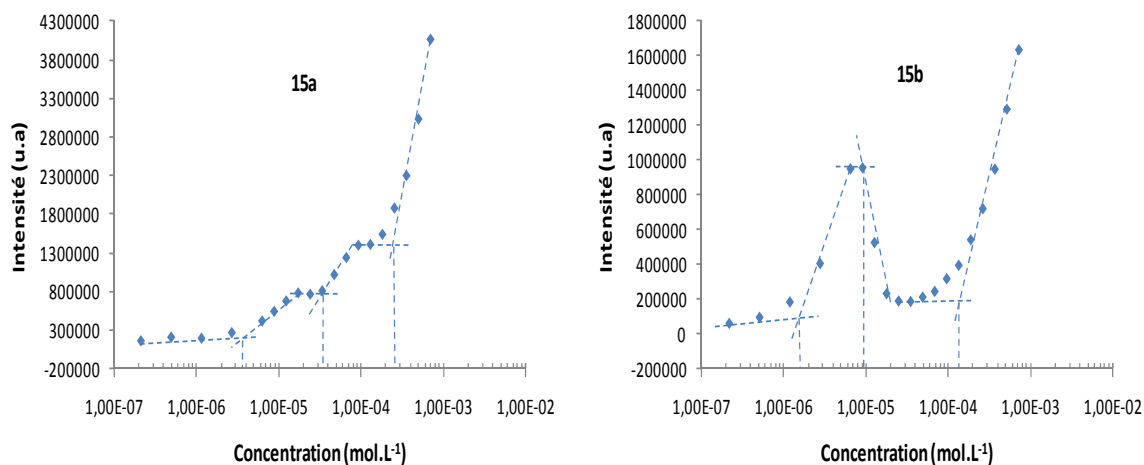


Figure 51 : Spectre d'absorbance de l'ADN

2. Etude par diffusion de la lumière

Cette méthode nous est apparue très intéressante pour évaluer et étudier l'interaction ADN / TA car c'est une méthode rapide, reproductible et qui ne demande pas de grandes quantité de produit. Les mesures consistent, comme précédemment, à mesurer l'intensité de diffusion de solutions de TA dans le tampon phosphate en fonction de la concentration en tensioactif et en ajoutant une quantité fixe d'ADN. Des mesures ont ainsi été réalisées avec les différents tensioactifs monocaténaire, étudiés en physico-chimie, à partir de deux concentrations différentes en ADN : $2 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-7} M. Cette analyse permet de déterminer les concentrations en TA et donc les ratios de charges où il y a des changements rapides de diffusion : en particulier la CAC en présence d'ADN, ainsi que la formation de complexes ADN/TA et d'évaluer ainsi l'influence de la concentration en ADN en comparant avec les expériences initiales sans ADN. Ces mesures ont également été réalisées à 22°C, les résultats sont présentés dans la figure 52.



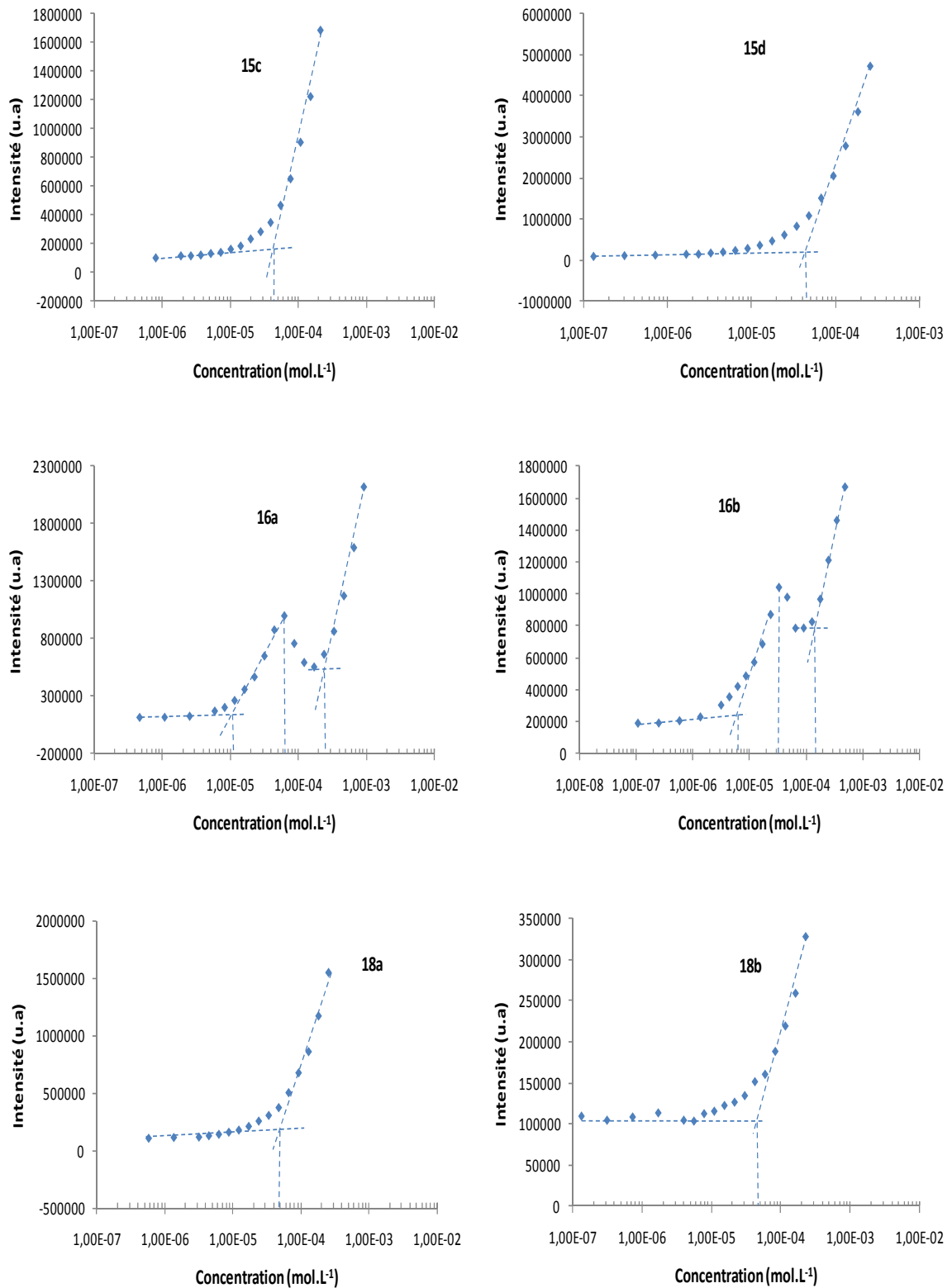


Figure 52 : Etude de diffusion de la lumière pour une concentration en ADN de 10^{-7} M

Les courbes de diffusion de la lumière de cette figure établies en fonction de la concentration en tensioactif, montrent des changements brusques de l'intensité de diffusion. Pour les esters **15a** et **15b** et les produits **16**, on observe plusieurs paliers, alors que les produits **18**, **15c** et **15d** ne présentent qu'un seul plateau.

Pour les mesures avec une concentration d'ADN de $2 \cdot 10^{-6}$ M, seuls les produits avec la chaîne fluorée la plus longue ont été testés. On observe (figure 53) des profils de courbes de diffusion similaires mais avec un décalage de la courbe vers les fortes concentrations et des plateaux plus étroits. Les composés ne présentant qu'une seule inflexion précédemment présentent également une seule inflexion à cette concentration.

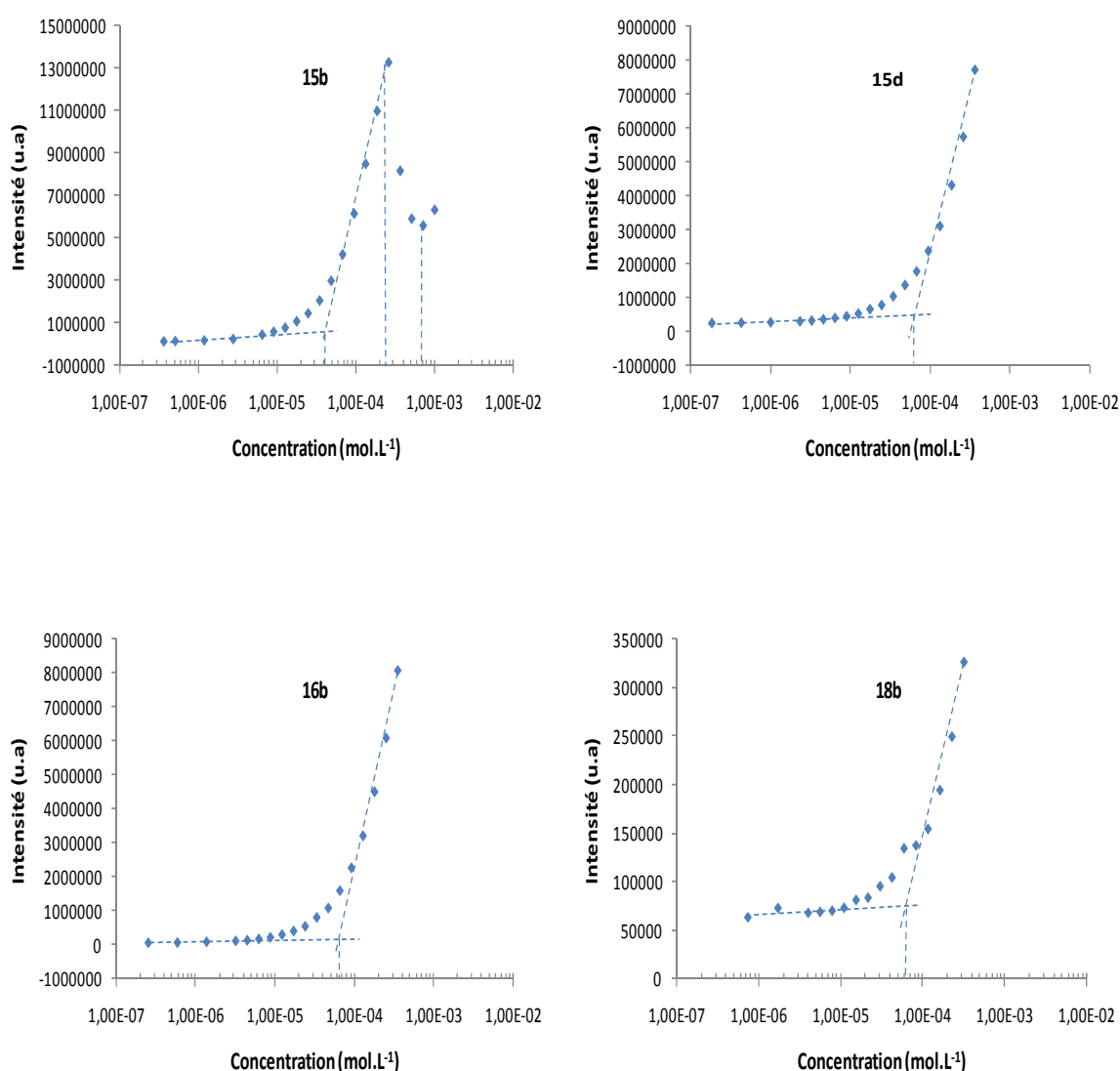


Figure 53 : Etude de diffusion de la lumière pour une concentration en ADN de 2.10^{-6} M

Discussion :

Compte-tenu de ces courbes, il faut tout d'abord noter que la diffusion de la lumière évolue d'une manière significative en fonction de la concentration en ADN. Ces mesures se situent donc dans la deuxième partie du diagramme théorique de complexation ADN/TA (voir chapitre interactions ADN/TA). Pour les produits ne montrant qu'une seule inflexion, il n'y a formation d'agrégats qu'à une concentration proche de la CAC du composé dans le tampon sans ADN. On peut envisager que ces composés (**18**, **15c** et **15d**) ont une interaction faible avec l'ADN ou pas d'interaction.

Pour les autres, une interprétation possible de ces résultats est illustrée par les schémas suivants :

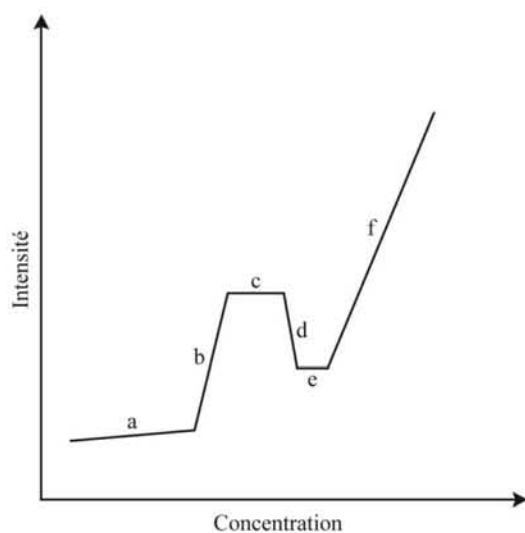


Figure 54 : Représentation schématisée de la diffusion de la lumière en présence d'ADN

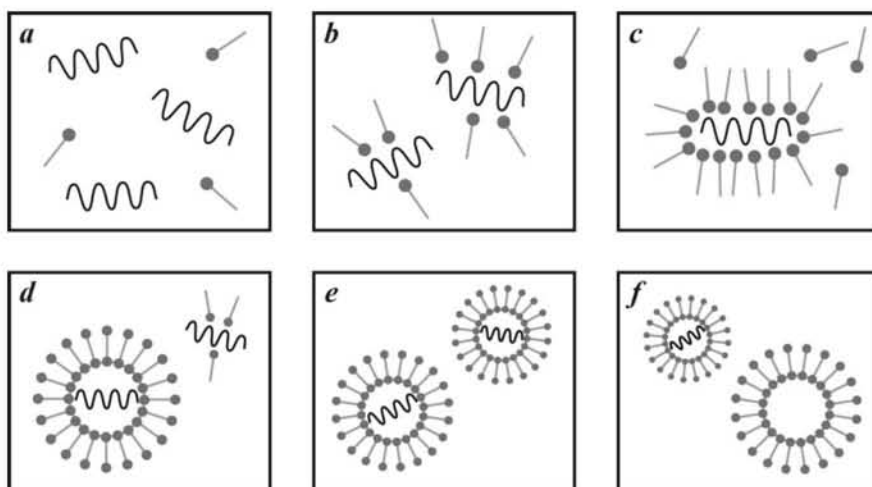
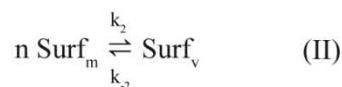
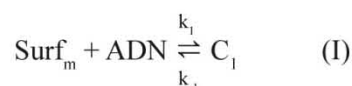


Figure 55 : Proposition théorique pour les différentes agrégations

A faible concentration, **(a)** le tensioactif est présent sous forme monomère dilué et les interactions ADN / TA sont rares. Lorsque la concentration augmente, **(b)** il y a micellisation du surfactant sur la matrice ADN. L'inflexion à ce niveau correspond à la concentration d'agrégation du TA sur la matrice ADN (CAC_{mADN}). Un palier est alors atteint **(c)** correspondant au maximum de monomère pouvant micelliser sur l'ADN. Cette interprétation se rapproche des résultats obtenus en tensiométrie par Lindman¹⁷³. Théoriquement, la concentration au niveau de l'inflexion entre **(b)** et **(c)** doit vérifier le rapport des charges négatives et positives soit 23 charges négatives pour le monobrin et 1 charge positive par TA. Si la concentration en TA augmente encore, il y a une diminution de l'intensité de la lumière diffusée. Ceci peut s'expliquer par une demicellisation des monomères de la matrice ADN pour former des vésicules encapsulant ou complexant l'ADN. La formation d'une vésicule demandant un nombre beaucoup plus important de monomère, il y a une disparition rapide des « micelles » sur la matrice ADN et formation de peu de vésicules. On peut également décrire ce phénomène grâce aux vitesses de formation des différents complexes et agrégats. On peut définir plusieurs équilibres comme suit :



(I) Le tensioactif sous forme monomère interagit avec l'ADN pour former un complexe noté C_1 avec une vitesse notée k_1 .

(II) Le tensioactif sous forme monomère s'agrège pour former des vésicules avec une vitesse k_2 .

(III) Le tensioactif sous forme de vésicules interagit avec l'ADN pour former un complexe noté C_2 .

Si la vitesse de formation du complexe C_2 (k_2 puis k_3) est plus lente que la vitesse de demicellisation des monomères de la matrice ADN (k_1), la disparition des ces agrégats sera majoritaire alors que la formation de vésicules contenant l'ADN sera en nombre insuffisant pour avoir une intensité de diffusion qui augmente. A l'inverse si la vitesse k_1 est plus faible que les vitesses k_2 et k_3 , on observera une augmentation de la diffusion de la lumière car la formation de vésicules complexantes sera majoritaire. L'inflexion entre **(c)** et **(d)** correspond à la concentration d'agrégation du tensioactif sous forme de vésicules en présence d'ADN (CAC_{vADN}).

Un autre palier est alors atteint **(e)**, où la totalité de l'ADN est complexé par des vésicules de TA. Des monomères peuvent cependant exister en solution mais sans interactions avec l'ADN. En

continuant à augmenter la concentration en TA, il y a formation de vésicules « vides » ce qui correspond à la concentration agrégative du tensioactif seul dans cette solution (CAC_v).

Lorsque la concentration en ADN augmente, on observe un décalage de la courbe vers les fortes concentrations en tensioactif. La concentration d'agrégation des monomères sur la matrice ADN (CAC_{mADN}) est plus élevée car cela demande un plus grand nombre de monomères et les plateaux sont réduits car les concentrations CAC_{vADN} et CAC_v sont déjà atteintes.

Les différentes concentrations observées pour les mesures avec une concentration en ADN de 10^{-7} M sont regroupées dans le tableau ci-dessous avec la CAC mesurée dans le tampon par SLS sans ADN:

Produit	CAC_{mADN} ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CAC_{vADN} ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CAC_v ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CAC_{SLS} ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
15a	$4\cdot 10^{-6}$	$3\cdot 10^{-5}$	$3\cdot 10^{-4}$	$2\cdot 10^{-5}$
15b	$2\cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}
15c	/	/	$5\cdot 10^{-5}$	$3\cdot 10^{-5}$
15d	/	/	$4\cdot 10^{-5}$	10^{-5}
16a	$1\cdot 10^{-5}$	$6\cdot 10^{-5}$	$3\cdot 10^{-4}$	$7\cdot 10^{-5}$
16b	$6\cdot 10^{-6}$	$3\cdot 10^{-5}$	$2\cdot 10^{-4}$	$3\cdot 10^{-5}$
18a	/	/	$5\cdot 10^{-5}$	$5\cdot 10^{-5}$
18b	/	/	$4\cdot 10^{-5}$	$2\cdot 10^{-5}$

Tableau 31 : Résultats pour la SLS en présence d'ADN 10^{-7} M pour les différents tensioactifs

Cette technique est donc très intéressante pour l'étude des interactions entre les TA et un brin d'ADN car elle est rapide et ne demande qu'une faible quantité de produit. De plus elle permet de mettre en évidence les différentes concentrations où on observe des changements de diffusion de la lumière.

3. Etude par dichroïsme circulaire

a) Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est l'étude de l'absorption d'une lumière émise dans le visible et dans l'ultra-violet sur une gamme comprise entre 180 et 300 nm là où les bases de l'ADN absorbent

la lumière. Cette méthode s'appuie sur la capacité des molécules qui ont une activité optique¹⁷⁴ (donc les molécules biologiques du fait de leur chiralité ou de leur structure secondaire) d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite (PCD) et la lumière polarisée circulairement à gauche (PCG).

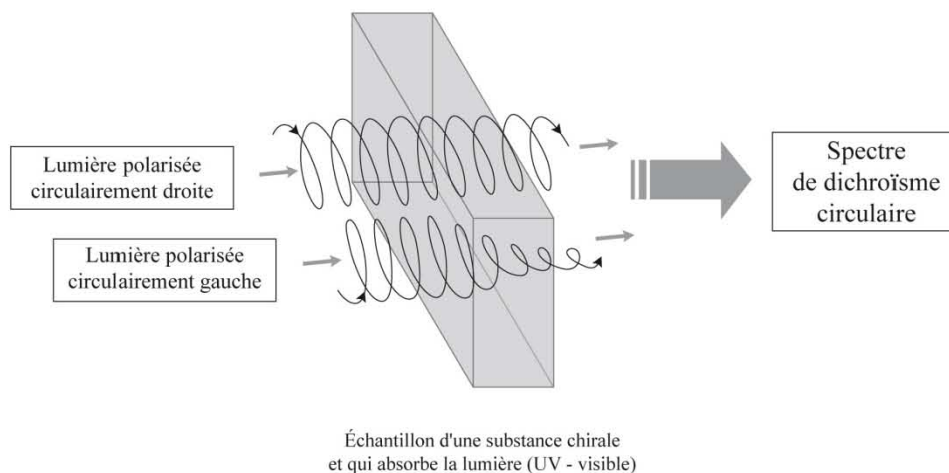


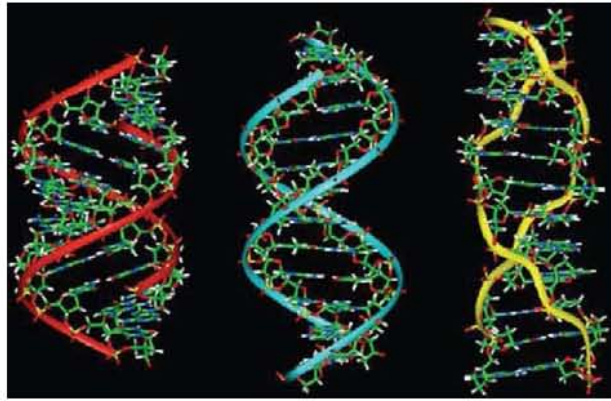
Figure 56 : Schéma de principe du dichroïsme circulaire

La différence d'absorption mesurée (en mdeg) pour chaque longueur d'onde s'appelle dichroïsme circulaire.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$$

La quantité utilisée pour décrire ce phénomène est appelé ellipticité. Les pics et les vallées observés sur le tracé sont appelés « effets Cotton » et peuvent être positifs ou négatifs. Leur position sur le spectre dépend du type de transition électronique impliquée dans l'effet ($n \rightarrow \pi^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$...). Les bases de l'ADN présentent ce genre de transitions qui donnent des bandes d'absorption vers 260 nm. Les sucres et les phosphates n'absorbent pas dans l'UV proche et le visible. Les bases planes ne sont pas optiquement active mais la perturbation due au sucre asymétrique fait que les nucléosides ont eux une activité optique. L'introduction d'un phosphate pour donner un nucléotide modifie très peu le signal dichroïque.

Le dichroïsme circulaire est une technique non destructive qui permet d'étudier les changements de conformations et la structure secondaire (feuilletés, hélices, coude) des protéines ou des oligonucléotides dans différents environnements (sels, pH, température, dénaturation par d'autres molécules...). En ce qui concerne l'ADN double brin, il existe plusieurs structures d'hélices possibles : type A, type B et type Z.



A

B

Z

Chaque forme montre un spectre dichroïque caractéristique^{175,176}. Les différentes caractéristiques pour chaque type d'hélice des ADN double brin sont présentées dans le tableau ci-dessous. Nous ne développerons pas ici ces trois types de structure et dans quels cas elles sont observées. Les spectres dichroïques caractéristiques de ces trois structures peuvent être décrits de cette manière : pour l'hélice A, il y a une bande positive centrée sur 260 nm et une bande négative centrée sur 210 nm. Pour la forme B, la bande positive est centrée sur 275 nm et celle négative sur 245 nm. Enfin, la forme Z montre un effet Cotton positif à 260 nm et un effet négatif à 290 nm¹⁷⁷.

	A	B	Z	
Nt / tour	11	10	12	
Sens hélice	Droit	Droit	gauche	
Conformation sucre	3' endo	2' endo	3' endo	
Diamètre	26 Å	20 Å	18 Å	
Liaisons glycosidiques	Anti	Anti	Anti	
Déplacement bp/axe	4 Å	Aucun		
Sillon majeur	Largueur	3 Å	12 Å	Plat
	Profondeur	13.5 Å	9 Å	
Sillon mineur	Largueur	11 Å	6 Å	Etroit
	Profondeur	3 Å	7.5 Å	Profond

Tableau 32 : Caractéristiques des hélices A, B et Z

Pour les protéines, on peut dire d'une manière générale que l'on observe un spectre dichroïque caractéristique de la structure étudiée. Selon qu'il s'agisse d'une hélice α , d'un coude ou encore d'un feuillet β , les effets Cotton ont un déplacement et une intensité bien précis. Les courbes suivantes montrent les spectres des différentes structures. Lorsqu'il y a un mélange de structure on peut décomposer le spectre en ces trois composantes.

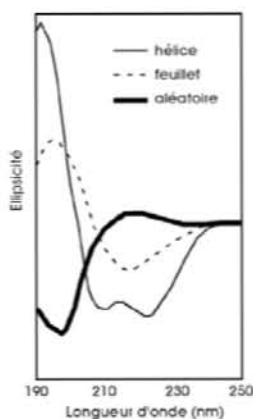


Figure 57 : Courbes spectrales caractéristiques pour les différentes structures des protéines

En ce qui concerne les ARN et les monobrin d'ADN, il n'y a pas de spectre caractéristique car il dépend de l'enchaînement des bases et il est donc spécifique à chaque oligonucléotide. Cependant, le dichroïsme circulaire est un outil largement utilisé¹⁷⁸ pour voir les changements de conformations de l'ADN lors de l'intercalation de molécules complexantes¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Les déplacements ou les variations d'intensité des bandes positives et négatives renseignent sur la complexation ADN/TA et la structure adoptée par l'ADN. C'est une technique simple, rapide et qui demande de petites quantités de produit¹⁷⁷.

b) Résultats

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées à 22°C avec une concentration fixe en ADN : $2 \cdot 10^{-6}$ M déterminée par des essais préliminaires pour avoir un signal suffisant et des concentrations en tensioactif qui varient pour avoir différents ratios de charges. Les résultats sont présentés ci-après. Le spectre du monobrin utilisé ici montre une bande DC positive de 210 nm à 230 nm et une autre de 260 nm à 300 nm. On observe également une bande négative entre 230 nm et 260 nm. Ces bandes sont caractéristiques d'une hélice B pour un ADN double brin, la forme la plus étendue où la bande positive est représentative de l'empilement des bases et la bande négative de l'hélicité droite¹⁸². On peut donc envisager que la structure de notre monobrin d'ADN se rapproche d'une hélice B.

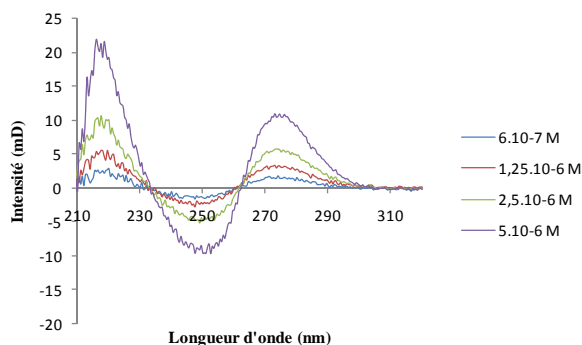


Figure 58 : Spectre dichroïque de l'ADN seul à différentes concentrations. Détermination de la concentration minimum en ADN pour les mesures.

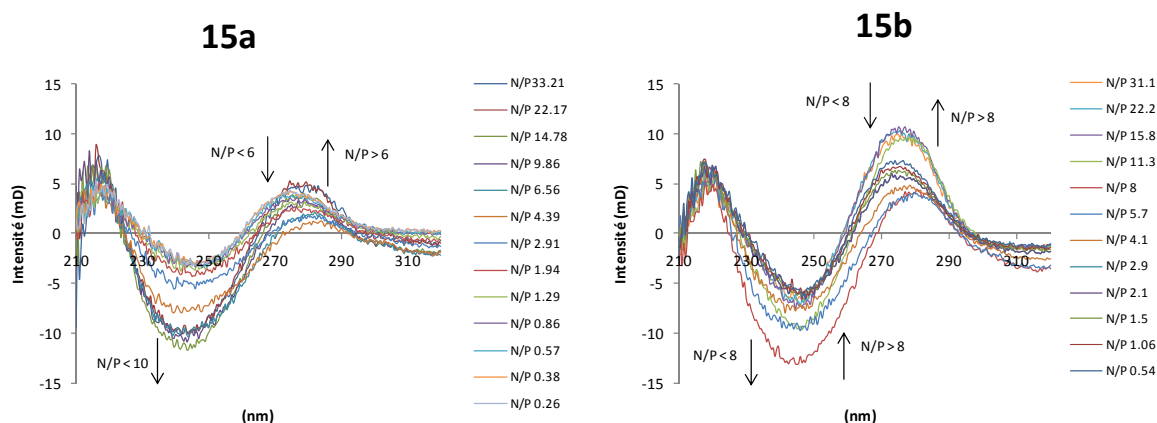


Figure 59 : Spectres dichroïques des esters 15a et 15b pour différents ratio N/P

Pour l'ester **15a**, on observe un élargissement de la bande négative jusqu'à un rapport $N/P = 6$ et après cette valeur, la largeur de la bande diminue. En ce qui concerne la bande positive, on observe l'inverse : un rétrécissement jusqu'à $N/P = 6$ puis un élargissement pour des ratios plus élevés. Au niveau des intensités, il y a une forte augmentation de l'intensité négative jusqu'à un ratio $N/P = 10$ puis elle reste sensiblement la même pour des ratios plus élevés. L'intensité positive diminue pour atteindre un minimum pour une valeur $N/P = 6$ puis elle augmente et stabilise pour des concentrations élevées en tensioactif.

Le produit **15b**, avec une chaîne fluorée plus longue, montre également des changements caractéristiques dans son spectre dichroïque. Comme précédemment, on observe un élargissement de la bande négative, ici jusqu'à un ratio $N/P = 8$ accompagnée d'une forte augmentation de l'intensité négative. Pour des ratios plus élevés, il y a diminution de l'intensité et rétrécissement de la bande négative. En ce qui concerne la partie positive, c'est l'inverse qui se produit. La bande se rétrécit et diminue en intensité jusqu'au ratio $N/P = 8$ puis elle s'élargit et l'intensité augmente à des valeurs plus élevées. L'intensité positive atteint un maximum à partir de la valeur $N/P = 10$.

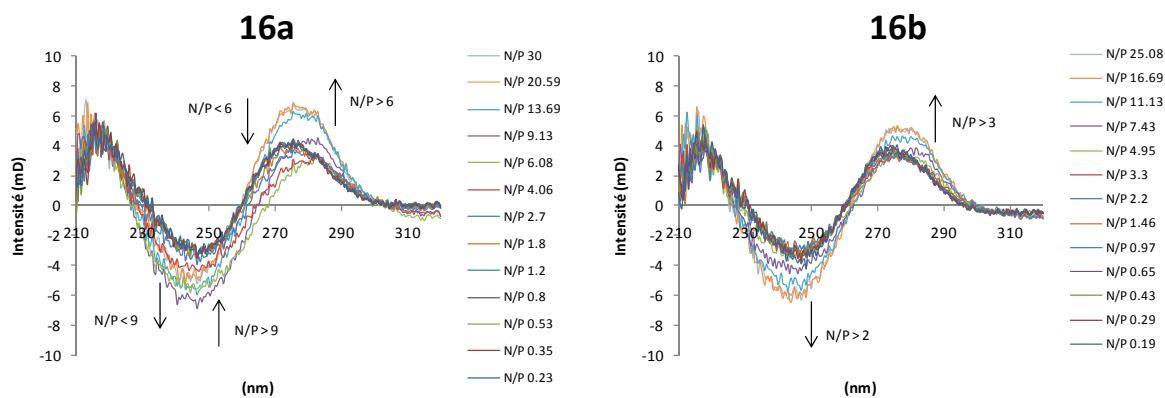


Figure 60 : Spectres dichroïques des produits 16 pour différents ratio N/P

Le produit **16a** présente un maximum d'intensité négative pour un ratio N/P = 9 et un élargissement maximum pour une valeur N/P = 6. A des concentrations en tensioactif plus élevées, l'intensité diminue et la bande se rétrécit. Du côté des valeurs positives, l'intensité et la largeur de la bande diminue jusqu'à un ratio N/P = 6. Après elles augmentent et stabilisent aux ratios plus grands.

Le produit **16b** lui présente un léger élargissement de la bande négative quand N/P augmente. L'intensité augmente également aux ratios élevés. La bande positive ne s'élargie que très peu et son intensité augmente aussi aux ratios élevés.

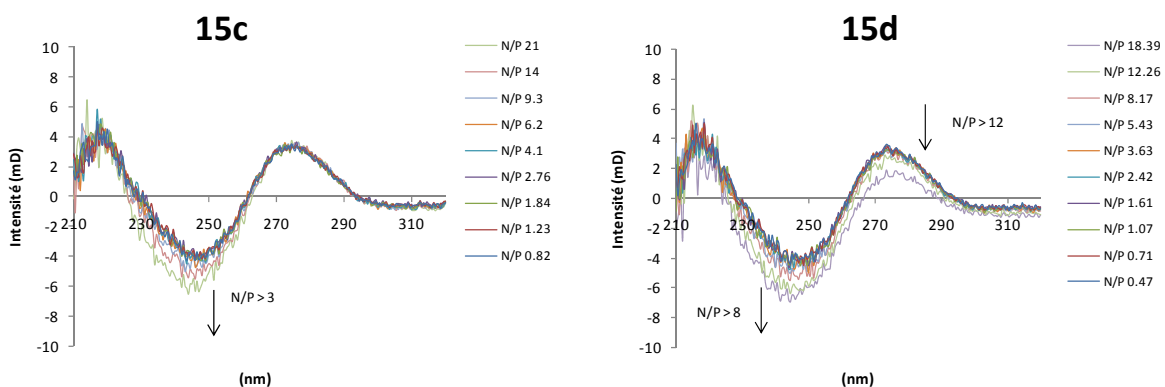


Figure 61 : Spectres dichroïques des esters 15c et 15d pour différents ratio N/P

Pour l'ester **15c**, on remarque peu de changement dans le spectre dichroïque sauf à forte concentration en tensioactif où l'intensité négative augmente légèrement.

Le produit **15d** montre des changements plus importants mais qui reste faibles. L'élargissement de la bande négative et le rétrécissement de la bande positive ne se produit qu'à des ratios élevés. L'intensité négative augmente et la positive diminue à ces ratios élevés.

Les spectres des acides **18a** et **18b** présentent des changements encore plus minimes (résultats non présentés ici).

c) Discussion

Tout d'abord on remarque que seuls les produits **15a**, **15b** et **16** montrent un changement significatif dans leur spectre dichroïque. Pour les produits **18**, **15c** et **15d** où l'on n'observe pas ou peu de changements, on peut envisager deux interprétations : soit il y a interaction mais sans changements de structure, soit il n'y a pas d'interaction ce qui est plus probable au vu des autres résultats.

Ceci laisse penser que le motif amine primaire présent sur chaque molécule n'intervient pas dans la complexation de l'ADN mais qu'elle est due uniquement à l'amine secondaire proche de la chaîne fluorée. Si tel est le cas, on peut expliquer pour les produits **18** la très faible interaction avec l'ADN, à ce pH physiologique, en envisageant une interaction intramoléculaire de type liaison hydrogène entre le motif carboxylate et l'amine secondaire comme montré ci-dessous.

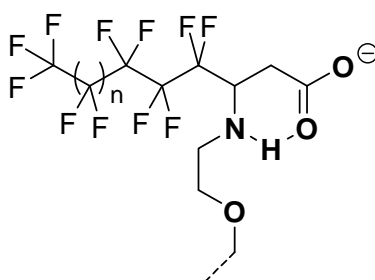


Figure 62 : Représentation d'une liaison hydrogène intramoléculaire pour les produits **22**

D'autre part, le motif carboxylate avec une charge négative exerce une répulsion électrostatique avec les charges négatives de l'ADN empêchant ainsi l'approche du tensioactif vers les bases de l'ADN. Pour les produits **15c** et **15d**, la faible complexation peut s'expliquer par l'encombrement stérique du motif PEG qui rend l'approche des tensioactifs difficile. Enfin l'interaction la plus significative est observée avec les esters **15a** et **15b** qui peuvent former des liaisons hydrogènes, qui n'existent pas pour les molécules **16**, du fait de la présence du carbonyle.

d) Conclusion

Cette technique a permis de voir rapidement si les différentes molécules pouvaient perturber la structure de l'ADN. Ces résultats montrent que sur les quatre familles de tensioactifs, seulement deux familles ont une interaction significative avec notre ADN monobrin. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les phénomènes observés et d'autres études ont été réalisées pour les

confirmer ou les affiner, telle que la mesure de la tension superficielle de solutions de tensioactifs en présence d'ADN¹⁷³, technique qui nécessite une quantité de produit assez importante.

4. Etude par mesure fluorimétrique

a) La fluorimétrie

L'absorption de photon par les molécules, donc leur excitation, s'accompagne de désexcitation qui peut être radiative. C'est ce rayonnement de fluorescence envoyé dans toutes les directions que l'on analyse en fluorimétrie. Cette technique peut être appliquée à des molécules naturellement fluorescentes ou rendues fluorescentes par adjonction d'un réactif.

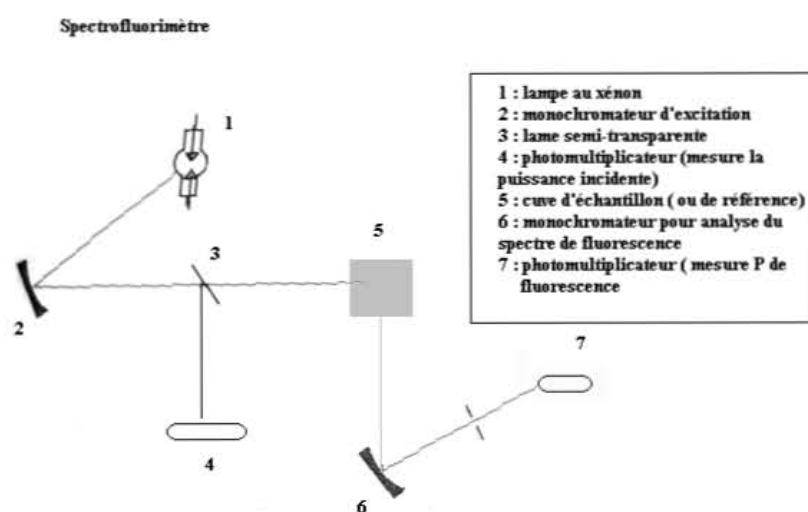


Figure 63 : Schéma d'un spectrofluorimètre

b) Déplacement du bromure d'éthidium

Nous avons choisi dans cette partie d'utiliser la technique de déplacement du bromure d'éthidium (EtBr)^{183,184} qui est un intercalant classique de l'ADN. C'est une technique simple et reproductible pour étudier la complexation avec l'ADN. Lorsqu'EtBr est ajouté à une solution d'ADN, il s'intercale entre deux paires de bases de celui-ci. Le complexe formé émet alors une forte fluorescence à 610 nm¹⁸⁵ lorsqu'il est excité à 270 nm.

La formation de complexes ADN/TA est suivie d'une diminution de l'intensité de fluorescence lorsque les molécules de tensioactif remplacent les molécules de EtBr entre les bases de l'ADN. Cette diminution est proportionnelle à la quantité d'EtBr remplacé par le tensioactif¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. Des mesures ont donc été effectuées à 22°C en mesurant la fluorescence de solution ADN/EtBr où l'on ajoute du

tensioactif pour obtenir différents ratios de charges (N/P). La concentration en ADN est fixée à 5.10^{-7} M et celle de EtBr à $1,15.10^{-5}$ M (soit un par base) et chaque point est exprimé en pourcentage de la fluorescence maximum de la solution ADN/EtBr seul.

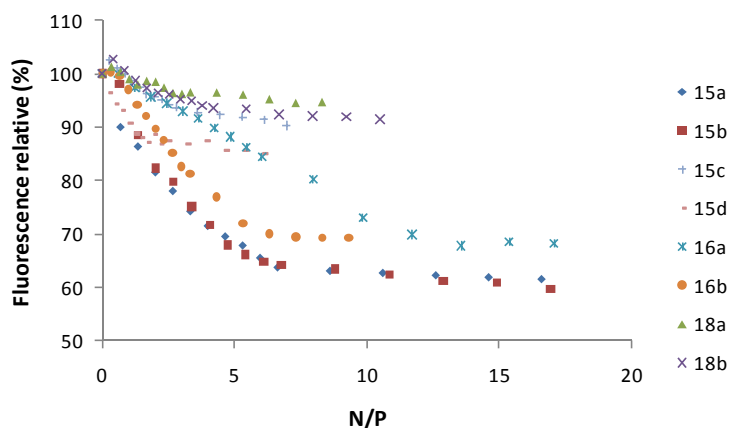


Figure 64 : Etude fluorimétrique du déplacement d'EtBr par les tensioactifs 15 à 18

c) Discussion

Comme pour les études en dichroïsme circulaire, on remarque que les acides **18** et les esters **15c** et **15d** ont une interaction faible avec l'ADN car ils arrivent à déplacer à peine 10% des molécules d'EtBr complexées à l'ADN pour les acides et 15% pour les esters **15c** et **15d**. Ces résultats confirment donc la deuxième hypothèse proposée précédemment c'est-à-dire qu'ils ne complexent pas l'ADN ou si peu qu'il n'y a pas de changements dans la structure de l'ADN. En revanche, les molécules **15a**, **15b** et **16**, elles, déplacent respectivement 40% et 30% des molécules d'EtBr intercalées. La complexation la plus forte est observée pour les produits **15a** et **15b**, ce qui est en accord avec les résultats précédents où on pouvait voir une plus importante déstructuration de l'ADN avec ces mêmes produits.

Les esters **15a** et **15b** montrent quasiment la même diminution de fluorescence. A des ratios N/P inférieurs à 6, la diminution est rapide puis un plateau est atteint pour des ratios supérieurs. Quelque soit la longueur de la chaîne fluorée, l'intercalation entre les bases de l'ADN des molécules de tensioactif **15a** et **15b** est la même pour chaque ratio N/P, ce qui prouve pour ces produits que l'effet hydrophobe ne joue aucun rôle dans la complexation du monobrin d'ADN. En revanche, pour les produits **16**, on observe deux courbes bien distinctes. La molécule **16a**, avec la plus petite chaîne fluorée présente une diminution de fluorescence moins rapide que son homologue **16b** et le plateau atteint l'est à des ratios deux fois plus grands : 12 contre 6 pour le produit **16a**. On remarque toutefois que la fluorescence relative au niveau des plateaux est la même pour les deux longueurs de

chaîne fluorée. Pour ces produits, le rôle de la chaîne fluorée semble plus important que pour les esters **15a** et **15b** mais joue seulement au niveau des ratios N/P des plateaux atteint.

A tous ces résultats, il faut ajouter qu'il a été montré que la diminution de l'intensité de fluorescence est fonction de la concentration en sels de la solution^{183,190,191}. A forte concentration en sel, EB n'est pas capable de se déplacer entièrement ce qui est expliqué par l'agrégation du complexe ADN/TA avant le déplacement total de EB. Ces résultats peuvent être responsables de la faible diminution de fluorescence des différents TA testés.

D. Evaluation des propriétés biologiques : viabilité cellulaire

Des essais préliminaires de viabilité cellulaires ont été effectués sur une partie des différentes molécules utilisées pour l'étude de la complexation avec l'ADN. Ces essais sont une étape importante pour valider la préparation de nouveaux vecteurs non-viraux. Ils ont été réalisés en collaboration avec R. Duval de la faculté de pharmacie de Nancy. Ces tests sont des tests colorimétriques au MTT, effectués sur des cellules eucaryotes MRC5 qui est une lignée de fibroblastes embryonnaires de poumon humain, basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de MTT jaune en un sel de formazan insoluble bleu-pourpre. La quantité de formazan formée est alors mesurée par absorbance à des longueurs d'onde de 540 nm et 690 nm par rapport à un échantillon témoin préparé dans les mêmes conditions. Ces essais sont réalisés avec une gamme de concentration en produit à tester allant de 10^{-3} M à 10^{-12} M et permettent de mesurer la concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) qui est la concentration nécessaire pour inhiber de façon apparente 50% de l'activité deshydrogénase des cellules.

Les résultats obtenus pour les différentes molécules testées sont présentés dans le tableau ci-après et montrent la CI_{50} exprimée en mol/l, pour des temps d'incubation de 24h, 48h et 168h. Les produits montrent tous des CI_{50} supérieure à $3 \cdot 10^{-5}$ M et ces concentrations sont toutes supérieures à la CAC de chaque produit. Les vecteurs non-viraux commerciaux actuels sont utilisés pour des applications cliniques à des doses de l'ordre du micromolaire. Les CI_{50} mesurées montrent que l'utilisation des molécules testées présente une bonne viabilité cellulaire à ces concentrations. De plus, la viabilité cellulaire reste du même ordre de grandeur dans le temps entre 24h et 168h d'incubation.

Produit	Viabilité cellulaire		
	24h	48h	168h
15b	$4 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$
15c	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$
16a	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
16b	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$
18a	$> 10^{-3}$	$9,8 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$
18b	$> 10^{-3}$	$> 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$

Tableau 33 : Résultats des tests de viabilité cellulaire

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail était de concevoir et d'étudier de nouveaux systèmes amphiphiles dans le but de déterminer les qualités requises pour un transporteur synthétique d'oligonucléotides afin d'en faire un transporteur efficace et non toxique dans le domaine de l'interférence ARN.

Après avoir examiné les nombreux travaux relevés dans la littérature dans ce domaine et en nous basant sur l'expertise du laboratoire dans la synthèse et l'étude de tensioactifs fluorocarbonés, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nanovecteurs d'ARN modèles sur la base de lipides cationiques fluorocarbonés permettant la complexation de l'oligonucléotide par formation de complexes de type lipoplexe. L'objectif principal était donc d'exploiter la capacité à l'autoorganisation de composés amphiphiles en particulier fluorés afin d'obtenir de nouveaux vecteurs multifonctionnels permettant de déterminer les paramètres indispensables à une vectorisation efficace.

Notre objectif principal était d'établir des relations entre la structure des molécules, en particulier au niveau de la tête polaire et les propriétés physico-chimiques et biologiques des systèmes obtenus.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de tensioactifs géminis comportant deux chaînes fluorocarbonées, deux têtes polaires dérivées d'acides et un bras espaceur de type oxyéthylénique ou polyamine. Les molécules de cette famille qui ont été étudiées d'un point de vue physico-chimique, se sont révélées être de bons modèles pour étudier la complexation avec l'ADN. En effet, ils forment pour la plupart des monocouches de Langmuir stables à l'interface air/eau aux différents pH et températures utilisées. Pour les diesters d'éthyle, les observations montrent que c'est le bras espaceur qui dirige principalement l'organisation à l'interface surtout dans le cas de la molécule comportant la chaîne la plus courte à 6 atomes de carbone pour laquelle l'aire par molécule augmente fortement. La tension de surface diminue logiquement avec l'augmentation de la longueur de chaîne ainsi que l'aire par molécule en raison des interactions fluorophiles entre les chaînes. Pour ces produits la salinité n'affecte pas la monocouche. Les variations de pH de la sous phase montrent que le pKa des amines confinées à l'interface est compris entre 2 et 7 et que l'effet répulsif des ammoniums est le plus fort pour la chaîne de carbones la plus longue. En ce qui concerne les diacides, l'aire par molécule et la tension de surface évoluent dans le même sens que précédemment en fonction de la longueur du segment fluoré. Cependant le bras espaceur joue un rôle moindre certainement dû au fait que les têtes polaires sont ionisables.

Dans ce cas aussi la salinité ne joue aucun rôle. Lors des changements de pH de la sous phase, des variations plus importantes que pour les diesters sont observées à cause du motif carboxylate qui apporte une interaction électrostatique supplémentaire. Nous avons ensuite étudié les variations des isothermes de compression en introduisant de l'ADN en sous phase pour ces deux familles de produits. Dans le cas des diesters, à une concentration suffisante en ADN on remarque une diminution de la compressibilité et de l'aire par molécule qui peut être expliquée par une transition de phase des têtes polaires. Dans le cas des diacides, les isothermes sont sensiblement identiques aux courbes obtenues sans ADN, ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas d'interactions avec l'oligonucléotide.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes orientés vers la synthèse des homologues ne comportant qu'une seule chaîne fluorocarbonée. Ces composés correspondent soit à des béta-aminoacides, soit à des amines secondaires. Enfin, l'introduction d'acide aminé comme tête polaire a été réalisée. Les produits sont solubles dans l'eau contrairement à leurs homologues bicaténaires. Leurs propriétés physicochimiques ont été déterminées dans l'eau et dans un tampon phosphate mimant le milieu physiologique. Tous les produits étudiés montrent une forte activité de surface et abaissent la tension superficielle de l'eau autour de 18 mN/m indépendamment de la longueur de la chaîne fluorocarbonée. De plus, ils présentent une aire par molécule comparable à une section de chaîne fluorée. Dans ce cas, contrairement aux composés bicaténaires, le bras espaceur est suffisamment flexible pour s'aligner au segment hydrophobe. Une autre propriété de ces molécules est de former spontanément des vésicules dans l'eau avec des tailles autour de 300 nm.

Nous avons ensuite étudié les interactions de ces produits avec de l'ADN monobrin par plusieurs techniques : fluorimétrie, DC, diffusion de la lumière... Sur les huit produits étudiés, seulement quatre ont montré une interaction relativement forte avec l'ADN. C'est le cas des esters d'éthyle et les molécules sans motif carboxylique (amines secondaires). Pour les acides, le motif carboxylate en milieu tamponné crée une interaction défavorable avec les groupements phosphate de l'ADN alors que pour les molécules comportant un groupement polyoxyéthylénique, c'est certainement l'encombrement stérique qui est responsable de la faible interaction.

Enfin, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés à la Faculté de Pharmacie de Nancy sur ces mêmes produits. Ils montrent une bonne viabilité cellulaire pour des concentrations d'utilisation clinique classique de l'ordre du micromolaire et une bonne stabilité dans le temps entre 24h et 168h. L'ensemble de ces résultats apportent donc un certain nombre d'informations concernant les

interactions entre ce type de composés et l'oligonucléotide. De plus, ils montrent que les molécules préparées peuvent devenir de bons candidats pour la préparation de vecteurs non-viraux.

Les travaux réalisés durant cette étude ne sont qu'une amorce du travail à réaliser avant de pouvoir obtenir un vecteur capable de poursuivre sur des tests cliniques. Ainsi des tests de toxicité vont être menés afin d'évaluer l'impact des différents tensioactifs sur la mort cellulaire. Cette étape est primordiale au vue des applications visées.

Dans un deuxième temps, il sera nécessaire de caractériser de manière plus précise les complexes formés entre ces composés amphiphiles et l'ADN. Il faut en effet déterminer leur taille, leur forme et leur constante d'association avant de pouvoir évaluer leur comportement dans l'organisme.

Par ailleurs, cette étude doit être complétée pour obtenir des systèmes permettant un ciblage précis d'un certain type de cellules ou d'un tissu. Il est ainsi envisagé de « décorer » ce type de vésicule par des motifs d'adressage de type peptidique.

Certaines structures présentes dans ce manuscrit n'ont pas encore été étudiées d'un point de vue physico-chimique et biologique mais elles ouvrent la voie vers des molécules offrant de nombreuses modulations de leurs propriétés. Par exemple, l'introduction d'acides aminés pour faire varier le type d'interactions avec les oligonucléotides semble être une solution efficace pour obtenir des vecteurs présentant une biocompatibilité accrue. L'introduction de différents motifs comme des groupements aromatiques est également envisagée.

IV. Partie expérimentale

A. Généralités :

Les points de fusion ont été mesurés sur un banc de Kofler.

Les spectres infra-rouge (IR) ont été réalisés sur un spectromètre PERKIN-ELMER FTIR en mode ATR.

Les expériences RMN ^1H , ^{13}C ou ^{19}F ont été réalisées sur des spectromètres Bruker AC200, AC250 ou DRX400 selon la résolution souhaitée. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS (tétraméthylsilane) comme référence interne pour les spectres ^1H et par rapport au CFCl_3 pour les spectres ^{19}F .

Les analyses élémentaires ont été réalisées au service d'analyse élémentaire de l'UMR 7565 de l'UHP à Nancy sur un appareil Thermofinnigan Flash 1112.

La solution tampon utilisée contient du NaCl (0,15 M) et du TRIS (0,05 M). Le pH est ajusté à 7,4 par ajout d'acide chlorhydrique.

B. Etude des agrégats en solution :

Mesure des tensions superficielles :

Les mesures de tension superficielle (γ) ont été effectuées à 22-25°C à l'aide d'un tensiomètre Krüss K10T en utilisant la méthode de la lame de Wilhelmy. Les solutions ont été préparées dans l'eau milliQ ou dans un tampon phosphate à pH=7,4.

Mesure de la taille des agrégats :

L'étude de la taille des agrégats a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) à l'aide d'un appareil Malvern Instruments Zetasizer 3000 HSA (taille des agrégats allant de 5 nm à 10 μm) à 25°C. Les solutions ont été préparées avec de l'eau milliQ ou un tampon phosphate à pH=7,4 à des concentrations supérieures aux CAC déterminées expérimentalement. La lumière diffusée est analysée à 90° pour différentes concentrations.

Observation de la forme des agrégats :

La formation des vésicules a été observée par microscopie à transmission électronique en utilisant un microscope électronique de type Philips CM20 utilisé à 200 KeV. Les échantillons sont obtenus en solution dans l'eau milliQ pour des concentrations supérieures à la CAC du produit étudié. Ils sont ensuite déposés sur des grilles de cuivre couvertes d'un film de carbone, après 1 minute l'excès est retiré et une solution de contrastant, le phosphotungstate de sodium, à 2% massique (pH = 7,5) est ajoutée pendant 1 minute. L'excès est alors retiré.

Détermination des concentrations agrégatives critiques :

Les concentrations agrégatives critiques ont été mesurées par diffusion de la lumière statique (SLS) à 22 °C en utilisant un appareil Fluorolog 3 Jobin Yvon en mode cinétique: excitation 600 nm, émission 600nm, largeur de la fente 3nm, temps de mesure 300 secondes (incrément 1s). Les solutions sont préparées dans l'eau milliQ ou dans un tampon phosphate pH 7,4. Pour chaque point l'intensité retenue est le minimum d'intensité observé lors de la mesure.

C. Etude de l'interaction avec l'ADN :

Mesures de dichroïsme circulaire :

Les spectres ont été enregistrés avec un appareil avec lampe au xénon de type MOS450 de la société Bio-Logic : Balayage 2 secondes par point, bande passante 4nm. Les solutions à étudier sont préparées dans un tampon phosphate pH = 7,4 à des concentrations constantes en ADN.

Mesures de diffusion statique de la lumière :

Les concentrations d'agrégations des différents tensioactifs en présence d'ADN ont été mesurées par diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering, SLS) à 22 °C en utilisant un appareil Fluorolog 3 Jobin Yvon en mode émission: excitation 600 nm, émission 600 nm, largeur de la fente 3 nm, temps de mesure 300 s (incrément 1 s). Les solutions sont préparées dans un tampon phosphate pH 7,4 à des concentrations constantes en ADN.

Mesures de déplacement du bromure d'éthidium :

Les mesures ont été réalisées sur un appareil Fluorolog 3 Jobin Yvon avec une cuve en quartz de section 1*1 cm² (excitation à 270 nm, émission à 610 nm). L'ADN est mélangée à une solution de bromure d'éthidium (1 eq EtBr par base) et ensuite une solution d'amphiphile cationique dans un tampon phosphate (TRIS 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,4) est ajoutée pour obtenir des complexes

ADN/TA avec différents ratios N/P. Les échantillons sont agités et la fluorescence est mesurée après 20 minutes à température ambiante.

D. Etude de l'organisation à l'interface air/eau :

Etude de films monomoléculaires : isothermes de compression

L'étude a été réalisée avec une cuve de Langmuir, modèle KSV 5000 de la société KSV Instrument (Finlande). Elle est équipée d'une cuve en téflon thermostatée et de barrières mobiles, en téflon également. Ces barrières permettent une compression symétrique du film. Les mesures sont réalisées selon la méthode de Wilhelmy, une électro-balance mesure la force exercée sur une lame de platine plongée dans la solution remplissant la cuve.

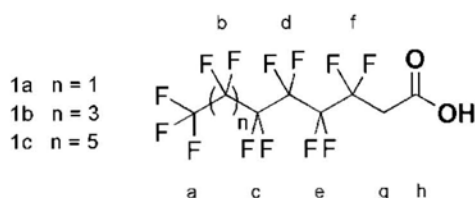
E. Synthèses :

1. Synthèse de la partie hydrophobe :

Synthèse des acides 2-perfluoroalkyléthanoïques : produit 1

Mode opératoire général :

8 mmol (1 eq) de perfluoroalkyléthanol sont dissoutes dans 50 mL d'un mélange acétone/éther (4/1). Le réactif de Jones est alors introduit goutte à goutte dans le milieu réactionnel sous agitation, placé dans un bain d'eau froide, jusqu'à persistance de la coloration rouge-brune. La réaction est ensuite maintenue durant 2 h sous agitation. 85 mL d'eau sont ensuite ajoutés afin de solubiliser les sels de chrome formés. La phase aqueuse est extraite par 3 * 75 mL d'éther. Les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 100 mL d'eau jusqu'à décoloration totale, puis séchées sur MgSO₄ et enfin concentrées à l'évaporateur rotatif. Le produit est purifié par recristallisation dans l'hexane.



Caractéristiques générales :

Produit	1a	1b	1c
n	1	3	5
Formule brute	C ₈ H ₃ O ₂ F ₁₃	C ₁₀ H ₃ O ₂ F ₁₇	C ₁₂ H ₃ O ₂ F ₂₁
Aspect	Solide blanc	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	378	478	578
Rendement (%)	70	87	91
Point de fusion (°C)	55	88	113
Microanalyses (théoriques)	%C = 25,23 (25,39) %H = 0,66 (0,79) %O = 7,92 (8,46) %F = (65,34)	%C = 24,92 (25,10) %H = 0,56 (0,62) %O = 6,62 (6,69) %F = (65,34)	%C = 24,82 (24,91) %H = 0,67 (0,51) %O = 5,32 (5,53) %F = (65,34)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 3,42 (t, 2H, H_g, J_{g-f}³ = 18Hz)

RMN 13C : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 37,24 (t, C_g, J_{C4-F3}³ = 87Hz) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_i) ; 165,00 (s, C_h)

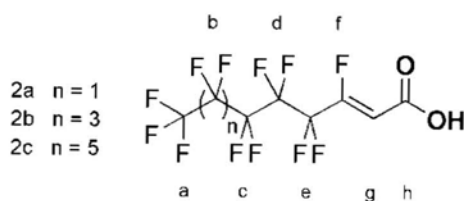
RMN 19F: (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: -76,92 (s, 3F, F_a); -107,78 (ma, 2F, F_i); -117,05 à -122,00 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ(OH) = 3100 cm⁻¹, γ(C=O) = 1712 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques : produit 2

Mode opératoire général :

8 mmol (1 eq) d'acide 2-perfluoroalkyléthanoïque sont dissoutes dans 125 mL de tétrahydrofurane. 20 mL (5 eq) d'une solution de soude 2N sont ajoutés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant 16 h à température ambiante puis acidifié (pH = 1) par une solution d'acide chlorhydrique 1N. La phase aqueuse est extraite par 3 * 75mL d'éther et les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 75mL d'eau et séchées sur MgSO₄. Les solvants sont évaporés sous vide et le produit est purifié par recristallisation dans l'hexane.



Caractéristiques générales :

Produit	2a	2b	2c
n	1	3	5
Formule brute	C ₈ H ₂ O ₂ F ₁₂	C ₁₀ H ₂ O ₂ F ₁₆	C ₁₂ H ₂ O ₂ F ₂₀
Aspect	Solide blanc	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	358	458	558
Rendement (%)	71	74	88
Point de fusion (°C)	78	104	127-128
Microanalyses (théoriques)	%C = 26,58 (26,81)	%C = 26,03 (26,20)	%C = 25,53 (25,80)
	%H = 0,66 (0,55)	%H = 0,37 (0,43)	%H = 0,33 (0,35)
	%O = 8,60 (8,93)	%O = 6,71 (6,98)	%O = 5,62 (5,73)
	%F = (63,68)	%F = (66,37)	%F = (68,10)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 6,37 (d, 1H, H_g, J³_{g-f} = 30Hz)

RMN 13C : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 109,46 (s, C_g) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_f) ; 162,28 (s, C_h)

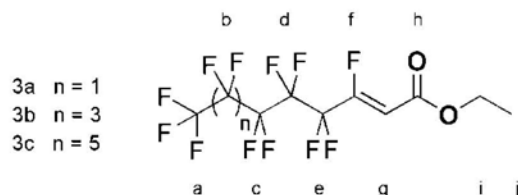
RMN 19F: (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: -81,20 (s, 3F, F_a); -111,73 (ma, 1F, F_f); -118,14 (ma, 2F, F_e) ; -121,44 à -126,00 (ma, 4+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ(OH) = 3200 cm⁻¹, γ(C=O) = 1707 cm⁻¹, γ (C=C) = 1690 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle : produit 3

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation et d'un Dean-Stark sont dissoutes 3 mmol (1 eq) d'acide 3-perfluoro-3-fluoroalkylpropanoïque dans 100 mL de toluène. 30 mL d'éthanol sont ajoutés ainsi que 0,1 eq d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le toluène et l'éthanol en excès sont évaporés sous vide. Le mélange est repris par 75 mL d'acétate d'éthyle et lavé par 2 * 50 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase aqueuse est extraite par 3 * 50 mL d'acétate d'éthyle et les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 50 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ le solvant est évaporé sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt 1 / Hexane 9).



Caractéristiques générales :

Produit	3a	3b	3c
n	1	3	5
Formule brute	C ₁₀ H ₆ O ₂ F ₁₂	C ₁₂ H ₆ O ₂ F ₁₆	C ₁₄ H ₆ O ₂ F ₂₀
Aspect	Liquide incolore	Liquide incolore	Solide translucide
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	386	486	586
Rendement (%)	60	87	82
Point de fusion (°C)	/	/	<50
Rapport frontal	0,69 (AcOEt 1/Hex 9)	0,67 (AcOEt 1/Hex 9)	0,46 (AcOEt 1/Hex 9)
Microanalyses (théoriques)	%C = 31,45 (31,08) %H = 1,46 (1,55) %O = 8,60 (8,29) %F = (59,06)	%C = 29,32 (29,62) %H = 1,24 (1,23) %O = 6,47 (6,58) %F = (62,55)	%C = 28,62 (28,66) %H = 1,01 (1,02) %O = 5,45 (5,46) %F = (64,84)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 6,37 (d, 1H, H_g, J³_{g-f} = 30Hz) ; 4,27 (q, 2H, H_i, J³_{i-j} = 7Hz) ; 1,33 (t, 3H, H_j, J³_{i-j} = 7Hz)

RMN 13C : (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: 14,04 (s, C_j) ; 61,97 (s, C_i) ; 106,84 (s, C_g) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_f) ; 155,53 (s, C_h)

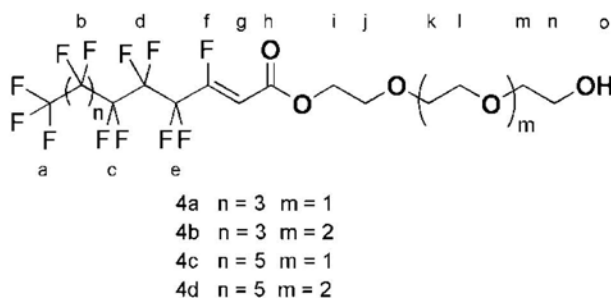
RMN 19F: (CD₃COCD₃, 400MHz) δppm: -81,20 (s, 3F, F_a) ; -108,47 (ma, 1F, F_i) ; -119,53 (ma, 2F, F_e) ; -121,44 à -126,00 (ma, 4+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ(C=O) = 1737 cm⁻¹, γ(C=C) = 1700 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des esters polyéthylène glycol à partir des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques : produit 4

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation et d'un Dean-Stark sont dissoutes 3 mmol d'acide 3-perfluoro-3-fluoroalkylpropénoïque dans 100 mL de toluène. 25 mL de polyéthylèneglycol sont ajoutés ainsi que quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le toluène en excès est évaporé sous vide. Le mélange est repris par 75 mL d'acétate d'éthyle et lavé par 2 * 50 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase aqueuse est extraite par 3 * 75 mL d'acétate d'éthyle et les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ le solvant est évaporé sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt).



Caractéristiques générales :

Produit	4a	4b	4c	4d
n	3	3	5	5
m	1	2	1	2
Formule brute	C ₁₆ H ₁₄ O ₅ F ₁₆	C ₁₈ H ₁₈ O ₆ F ₁₆	C ₁₈ H ₁₄ O ₅ F ₂₀	C ₂₀ H ₁₈ O ₆ F ₂₀
Aspect	Liquide incolore	Liquide jaune pale	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire	590	634	690	734
Rendement (%)	55	62	79	70
Point de fusion	/	/	63-64°C	54°C
Rapport frontal	0,42 (AcOEt)	0,37 (AcOEt)	0,48 (AcOEt)	0,32 (AcOEt)
Microanalyses (théoriques)	%C = 32,46(32,54) %H = 2,35 (2,37) %O = (13,55) %F = (51,52)	%C = 34,21(34,06) %H = 2,79 (2,83) %O = (15,14) %F = (47,94)	%C = 31,19(31,30) %H = 2,08 (2,02) %O = (11,59) %F = (55,07)	%C = 32,58(32,69) %H = 2,41 (2,45) %O = (13,07) %F = (51,77)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 6,00 (d, 1H, H_g, J³_{g-f} = 30Hz) ; 4,32 (t, 2H, H_i, J³_{i-j} = 7Hz) ; 3,60 (ma, 6+4mH, H_j à H_n) ; 2,72 (s, 1H, H_o)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 160,95 (s, C_h); 154,32 (d,C_f); 106 à 120 (m,C_a à C_e); 106,56 (s, C_g) ; 72,71 (s, C_m); 70,77 (s, C_{k,l}); 68,89 (s,C_j); 64,87 (s, C_i); 61,81 (s,C_n)

RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,40 (s, 3F, F_a); -107,8 (m, 1F, F_f); -119,2 (m, 2F, F_e); -122,5 à -126,7 (m, 4+2nF, F_{b,c,d})

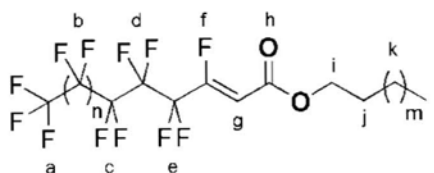
IR: γ (OH) = 3456 cm⁻¹, γ(C=O) = 1737 cm⁻¹, γ(C=C) = 1702 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des esters mixtes à partir des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques et d'alcool gras: produit 5

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation et d'un Dean-Stark sont dissoutes 3 mmol (1 eq) d'acide 3-perfluoro-3-fluoroalkylpropanoïque dans 100 mL de toluène. 1,2 eq d'alcool gras sont ajoutés ainsi que 0,1 eq d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le toluène est évaporé sous vide. Le mélange est repris par 75 mL d'acétate d'éthyle et lavé par 2 * 50 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase aqueuse est extraite par 3 * 50 mL d'acétate d'éthyle et les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 50 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ le solvant est évaporé sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt 1 / Hexane 9) ou par recristallisation dans l'hexane. Certains des solides sont purifiés préférentiellement sur gel de silice.

5a n = 1 m = 4
 5b n = 1 m = 7
 5c n = 1 m = 9
 5d n = 3 m = 4
 5e n = 3 m = 7
 5f n = 3 m = 9
 5g n = 5 m = 4
 5h n = 5 m = 7
 5i n = 5 m = 9



Caractéristiques générales :

Produit	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i
n	1	1	1	3	3	3	5	5	5
m	4	7	9	4	7	9	4	7	9
Formule brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂ F ₁₂	C ₁₈ H ₂₂ O ₂ F ₁₂	C ₂₀ H ₂₆ O ₂ F ₁₂	C ₁₇ H ₁₆ O ₂ F ₁₆	C ₂₀ H ₂₂ O ₂ F ₁₆	C ₂₂ H ₂₆ O ₂ F ₁₆	C ₁₉ H ₁₆ O ₂ F ₂₀	C ₂₂ H ₂₂ O ₂ F ₂₀	C ₂₄ H ₂₆ O ₂ F ₂₀
Aspect	/	Liquide jaune	Solide jaune	Solide jaunâtre	Solide blanc brillant	Solide blanc	Solide jaunâtre	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire	456	498	526	556	598	626	656	698	726
Rendement	/	87	45	68	70	20	45	55	40
Point de fusion	/	/	<40	<40	<40	44	49-51	56	60-61
Rapport frontal	/	0,78 (AcOEt/ Hex 1/9)	/	/	0,82 (AcOEt/ Hex 1/9)	/	/	/	/
Microanalyses (théoriques)	/	%C = 43,06 (43,37) %H = 4,39 (4,41) %O = (6,42) %F = (45,78)	%C = 45,44 (45,62) %H = 4,54 (4,94) %O = (6,08) %F = (43,34)	%C = 36,30 (36,69) %H = 3,01 (2,87) %O = (5,75) %F = (54,67)	%C = 40,41 (40,13) %H = 3,67 (3,93) %O = (5,35) %F = (50,83)	%C = 42,17 (42,17) %H = 4,06 (4,15) %O = (5,75) %F = (48,56)	%C = 35,12 (34,75) %H = 2,51 (2,43) %O = (4,87) %F = (57,92)	%C = 38,28 (37,82) %H = 3,13 (3,15) %O = (4,58) %F = (54,44)	%C = 39,62 (39,66) %H = 3,47 (3,58) %O = (4,40) %F = (52,34)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 6,00 (d, 1H, H_g, J³_{f-g} = 32Hz) ; 4,22 (t, 2H, H_i, J³_{i-j} = 16Hz) ; 1,69 (ma, 2H, H_j) ; 1,27 (ma, 2mH, H_k) ; 0,88 (t, 3H, H_l, J³_{k-l} = 8Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 161,07 (s, C_n) ; 152,59 à 155,47 (ma, C_f) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 106,67 (s, C_g) ; 62,38 (s, C_i) ; 31,35 (s, C_j) ; 25,86 à 29,57 (ma, C_k) ; 14,12 (s, C_l)

RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,25 (s, 3F, F_a) ; -108,09 (s, 1F, F_f) ; -119,28 (ma, 2F, F_e) ; -123,28 à -126,69 (ma, 2+2nF, F_{b,c,d})

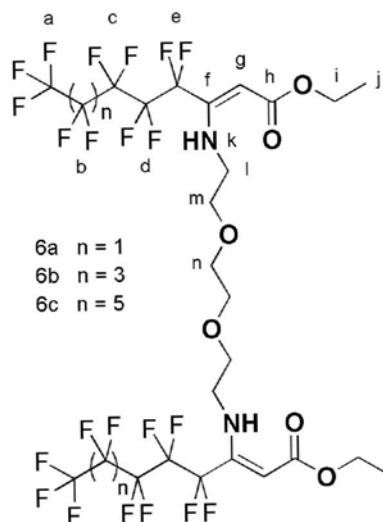
IR: γ(C=O) = 1736 cm⁻¹, γ(C=C) = 1700 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

2. Synthèse de tensioactifs géminis :

Synthèse des énamines (géminis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 6a, 6b et 6c

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 3 mmol d'ester (1 eq), la diamine (0,5 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est maintenu sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 3 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant hexane 9 / AcOEt 1) ou par recristallisation dans l'hexane.



Caractéristiques générales :

Produit	6a	6b	6c
n	1	3	5
Formule brute	C ₁₆ H ₂₆ O ₆ N ₂ F ₂₂	C ₃₀ H ₂₆ O ₆ N ₂ F ₃₀	C ₃₄ H ₂₆ O ₆ N ₂ F ₃₈
Aspect	Huile incolore	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	880	1080	1280
Rendement (%)	65	67	53
Point de fusion (°C)	/	73	99
Rapport frontal	0,16	/	/
Microanalyses (théoriques)	%C = 35,17 (35,45) %H = 2,37(2,95) %O = (10,90) %N =2,89 (3,18) %F = (47,50)	%C = 33,01 (33,33) %H = 2,17 (2,40) %O = (8,88) %N =2,86 (2,59) %F = (52,77)	%C = 31,55 (31,87) %H = 2,21 (2,03) %O = (7,50) %N =2,15 (2,18) %F = (56,40)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 400MHz) δppm: 8,57 (s, 2H, H_k) ; 5,02 (s, 2H, H_g) ; 4,13 (q, 4H, H_i, J³_{i-j} = 7Hz) ; 3,66 (t, 4H, H_l, J³_{l-m} = 5Hz) ; 3,63 (s, 4H, H_n) ; 3,46 (t, 4H, H_m, J³_{l-m} = 5Hz) ; 1,26 (t, 6H, H_j, J³_{i-j} = 7Hz)

RMN 13C : (CDCl₃, 400MHz) δppm: 14,04 (s, C_j) ; 44,76 (s, C_i) ; 59,66 (s, C_i) ; 70,20 et 70,81 (s, C_l) ; 88,39 (s, C_g) ; 106 à 120 (m, C_a à C_e) ; 147,75 (s, C_f) ; 169,25 (s, C_h)

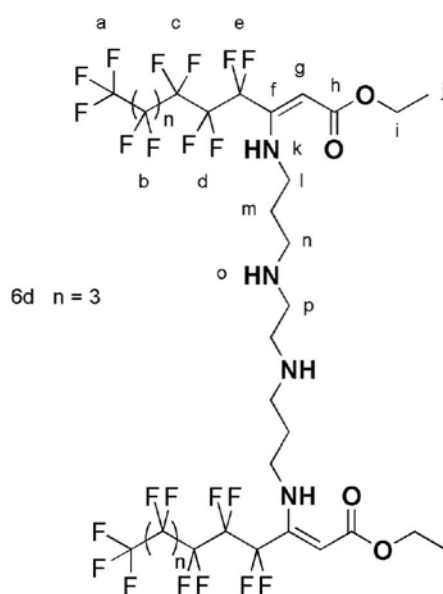
RMN 19F: (CDCl₃, 400MHz) δppm: -81,20 (s, 6F, F_a) ; -111,26 (m, 4F, F_e) ; -121,44 à -126,00 (m, 2*(4+2n), F_{b,c,d})

IR : γ(NH) = 3430 cm⁻¹ , γ(C=O) = 1738 cm⁻¹ , γ(C=C) = 1669 cm⁻¹ , γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des énamines (gémis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,2-éthylènediamine: produit 6d

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 1,5 mmol d'ester (1 eq), la diamine (0,5 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 5 * 100 mL d'une solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant MeOH).



Caractéristiques générales :

Produit	6d
n	3
Formule brute	C ₃₂ H ₃₂ O ₄ N ₄ F ₃₀
Aspect	Huile blanche
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	1106
Rendement (%)	52
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,23 (34,72) %H = 2,45 (2,89) %O = (5,78) %N = 4,87 (5,06) %F = (51,53)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 8,60 (s, 2H, H_k) ; 4,98 (s, 2H, H_g) ; 4,08 (q, 4H, H_i, J³_{i-j} = 4Hz) ; 3,46 (ma, 8H, H_{i,n}) ; 2,87 (m, 4H, H_p) ; 1,28 à 1,60 (ma, 12H, H_{j,k,m})

RMN 13C: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 169,47 (s, C_h) ; 147,70 (ma, C_i) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 88,53 (s, C_g) ; 56,12 (s, C_i) ; 51,66 (s, C_p) ; 45,70 (s, C_n) ; 43,70 (s, C_i) ; 29,54 (ma, C_m) ; 14,13 (s, C_j)

RMN 19F: (CDCl₃, 250MHz) δppm: -81,42 (s, 6F, F_a) ; -111,66 (s, 4F, F_e) ; -121,68 à -126,81 (ma, 8+4nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH) = 3400 cm⁻¹, γ(C=O) = 1669 cm⁻¹, γ(C=C) = 1619 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

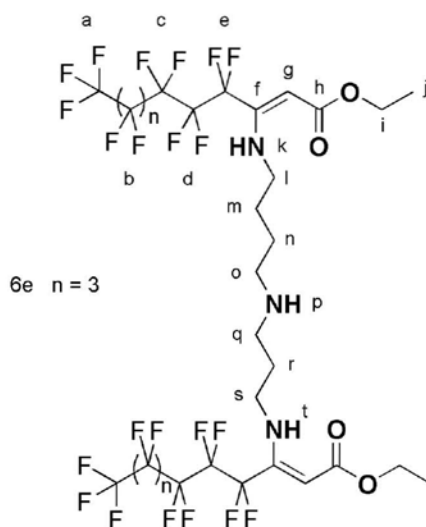
Synthèse des énamines (gémis) à partir des esters 2,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la spermidine: produit 6e

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 1,5 mmol d'ester (1 eq), la diamine (0,5eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et

Chapitre 4 : Partie expérimentale

lavé par 5 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant AcOEt 5 / Hex 95).



Caractéristiques générales :

Produit	6e
n	3
Formule brute	C ₃₁ H ₂₉ O ₄ N ₃ F ₃₀
Aspect	Pâte blanche
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	1077
Rendement (%)	57
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,94 (34,54)
	%H = 2,90 (2,69)
	%O = (5,94)
	%N = 3,33 (3,89)
	%F = (52,92)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 250MHz) δppm: 8,35 (ma, 3H, H_{k,p,t}); 5,03 (s, 2H, H_g); 4,15 (q, 4H, H_i, J³_{i-j} = 75Hz); 3,16 (ma, 10H, H_{l,o,q,s}); 1,81 (m, 2H, H_r); 1,58 (ma, 4H, H_{m,n}); 1,28 (t, 6H, H_j, J³_{i-j} = 75Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 250MHz) δppm: 169,53 (s, C_h); 148,12 (ma, C_r); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 89,06 (s, C_g); 59,62 (s, C_i); 51,83 (s, C_o); 49,69 (s, C_q); 44,44 (s, C_i); 42,33 (s, C_s); 28,95 (s, C_r); 28,15 (s, C_n); 24,72 (s, C_m); 14,10 (s, C_j)

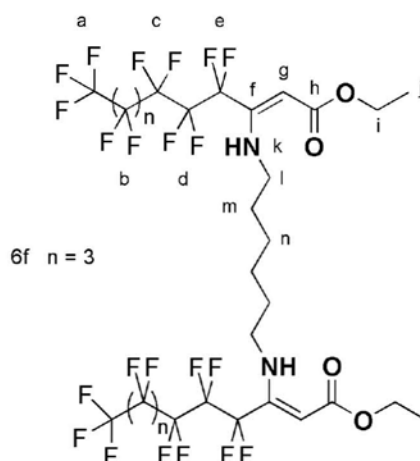
RMN 19F: (CDCl₃, 250MHz) δppm: -81,42 (s, 6F, F_a); -111,66 (s, 4F, F_e); -121,68 à -126,81 (ma, 8+4nF, F_{b,c,d})

IR: γ(NH₂) = 3273 cm⁻¹, γ(C=O) = 1713 cm⁻¹, γ(C=C) = 1668 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des énamines (géminis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 1,6 – hexanediamine : produit 6f

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 1,5 mmol d'ester (1 eq), la diamine (0,5 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 5 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant AcOEt 5/ Hex 95 élution graduée).



Caractéristiques générales :

Produit	6f
n	3
Formule brute	$C_{30}H_{26}O_4 N_2F_{30}$
Aspect	Solide blanc
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	1048
Rendement (%)	63
Point de fusion ($^{\circ}C$)	54
Rapport frontal	0,51 (AcOEt 1/Hex 9)
Microanalyses (théoriques)	%C = 33,87 (34,35) %H = 2,86 (2,48) %O = (6,10) %N = 3,04 (2,67) %F = (54,38)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 8,40 (s, 2H, H_k) ; 5,01 (s, 2H, H_g) ; 4,15 (q, 4H, H_l , $J^3_{i-j} = 7Hz$) ; 3,28 (t, 4H, H_i) ; 1,61 (m, 4H, H_m) ; 1,42 (m, 4H, H_n) ; 1,28 (t, 6H, H_j , $J^3_{i-j} = 7Hz$)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 169,98 (s, C_h) ; 149,02 (ma, C_f) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 88,03 (s, C_g) ; 59,86 (ma, C_j) ; 44,97 (s, C_i) ; 30,73 (s, C_m) ; 26,39 (s, C_n) ; 13,33 (s, C_l)

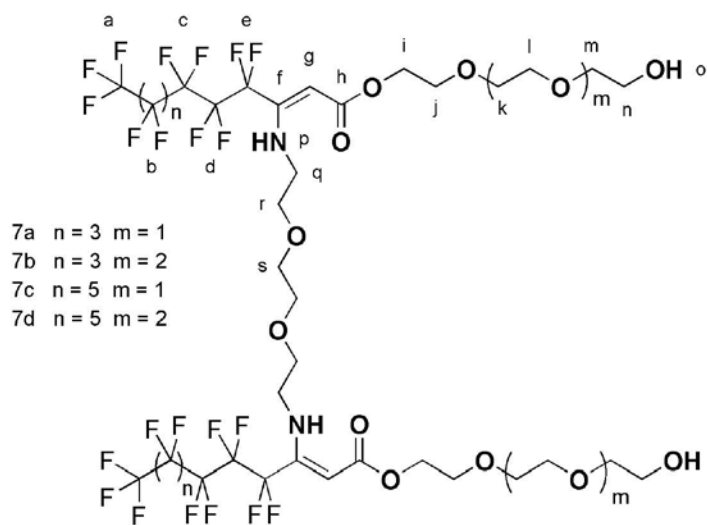
RMN 19F: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: -81,48 (s, 6F, F_a) ; -111,46 (s, 4F, F_e) ; -121,89 à -126,81 (ma, 8+4nF, $F_{b,c,d}$)

IR: $\nu(NH) = 3272 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=O) = 1669 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=C) = 1626 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C-F) = 1300 \text{ à } 1100 \text{ cm}^{-1}$

Synthèse des énamines (géminis) à partir des esters PEG et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 7

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 3 mmol d'ester PEG (1 eq), la diamine (0,5eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'acétate d'éthyle et lavé par 3 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant graduée AcOEt / MeOH).



Caractéristiques générales :

Produit	7a	7b	7c	7d
n	3	3	5	5
m	1	2	1	2
Formule brute	$C_{38}H_{42}O_{12}N_2F_{30}$	$C_{42}H_{50}O_{14}N_2F_{30}$	$C_{42}H_{42}O_{12}N_2F_{38}$	$C_{46}H_{50}O_{14}N_2F_{38}$
Aspect	Liquide jaune	Liquide jaune	Liquide jaune	Solide blanc
Masse molaire	1288	1376	1488	1576
Rendement (%)	93	70	50	68
Point de fusion	/	/	/	<45°C
Rapport frontal	0,12 (AcOEt) possibilité d'observer un isomère à 0,29	0,82 (MeOH/AcOEt) 1/2	0,65 (MeOH/AcOEt) 10/90	0,17 (AcOEt)
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,98(35,40) %H = 3,77 (3,26) %O = (14,90) %N = 1,79 (2,17) %F = (44,25)	%C = 36,14(36,62) %H = 4,02 (3,63) %O = (16,27) %N = 1,62 (2,03) %F = (41,42)	%C = 33,32(33,87) %H = 3,18 (2,82) %O = (12,90) %N = 2,12 (1,88) %F = (48,52)	%C = 34,65(35,02) %H = 3,55 (3,17) %O = (14,21) %N = 1,77(1,77) %F = (45,81)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 8,52 (s, 2H, H_p); 5,05 (s, 2H, H_g); 4,22 (t, 4H, H_i, J³_{i-j} = 5Hz); 3,57 à 3,71 (ma, 24+8mH, H_j à H_n et H_q à H_s); 2,58 (ma, 2H, H_o)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 169,37 (s, C_n); 148,26 (s, C_f); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 94,77 (s, C_g); 73,19 (s, C_m) ; 70,17 à 70,89 (ma, C_{k,l,m,r,s}) ; 69,47 (s, C_j) ; 61,57 (ma, C_{i,p}) ; 44,89 (s, C_q)

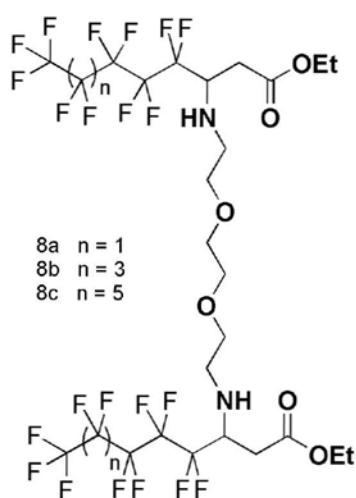
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,23 (s, 6F, F_a); -111,34 (s, 4F, F_e); 121,76 à 126,61 (ma, 8+4nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH) = 3400 cm⁻¹, γ (OH) = 3228 cm⁻¹, γ(C=O) = 1669 cm⁻¹, γ(C=C) = 1619 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (gémimis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 8a, 8b, 8c

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (0,8 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris par 50 mL d'acétate d'éthyle et séché sur MgSO₄. Le mélange est réduit de nouveau sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	8a	8b	8c
n	1	3	5
Formule brute	$C_{16}H_{30}O_6N_2F_{22}$	$C_{30}H_{30}O_6N_2F_{30}$	$C_{34}H_{30}O_6N_2F_{38}$
Aspect	Liquide jaune pale	Huile blanche	Solide blanc
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	884	1084	1284
Rendement (%)	83	93	94
Point de fusion ($^{\circ}C$)	/	/	<50
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,89 (35,29) %H = 2,93(3,39) %O = (10,85) %N = 3,23 (3,16) %F = (47,28)	%C = 33,45 (33,21) %H = 3,02 (2,76) %O = (8,85) %N = 2,97 (2,58) %F = (52,58)	%C = 31,46 (31,77) %H = 2,56 (2,33) %O = (7,47) %N = 2,45 (2,18) %F = (56,23)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 4,13 (q, 4H, H_i , $J^3_{i-j} = 7Hz$) ; 3,82 (ma, 2H, H_f) ; 3,55 (s, 4H, H_n) ; 3,50 (t, 4H, H_m , $J^3_{l-m} = 5Hz$) ; 2,89 (ma, 4H, H_l) ; 2,72 (dd, 2H, H_g , $J^3_{f-g} = 5Hz$ et 11Hz) ; 2,55 (dd, 2H, H_g , $J^3_{f-g} = 8Hz$ et 7Hz) ; 1,72 (ma, 2H, H_k) ; 1,26 (t, 6H, H_j , $J^3_{i-j} = 7Hz$)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 14,04 (s, C_j); 34,35 (s, C_g); 47,10 (s, C_l); 56,42 (s, C_f); 61,17 (s, C_i); 71,00 (d, C_m); 106 à 120 (m, C_a à C_e); 170,45 (s, C_h)

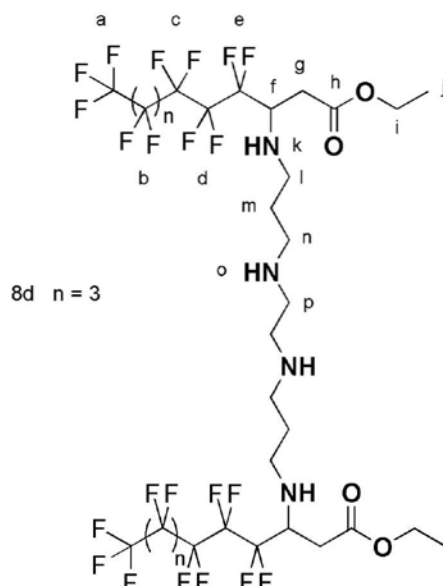
RMN 19F: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: -81,20 (s, 6F, F_a); -115,98 (s, 2F, F_e); -117,17 (s, 2F, F_e); -121,44 à -126,00 (ma, $2 \cdot (4+2n)$, $F_{b,c,d}$)

IR : $\nu(NH) = 3366 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=O) = 1740 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C-F) = 1300 \text{ à } 1100 \text{ cm}^{-1}$

Réduction des énamines (gémis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,2-éthylènediamine: produit 8d

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (0,9 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO₄. Les solvants sont alors évaporés sous vide.



Caractéristiques générales :

Produit	8d
n	3
Formule brute	C ₃₂ H ₃₆ O ₄ N ₄ F ₃₀
Aspect	Solide blanc visqueux
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	1110
Rendement (%)	60

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 4,08 (q, 4H, H_i, J³_{i-j} = 4Hz); 2,64 à 3,47 (ma, 18H, H_{f,g,l,n,p}); 1,94 (s, 4H, H_{k,o}); 1,63 (m, 4H, H_m); 1,26 (t, 6H, H_j, J³_{i-j} = 4Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 169,69 (s, C_h); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 62,56 (s, C_f); 59,23 (s, C_i); 51,64 (s, C_p); 49,72 (s, C_n); 47,78 (s, C_l); 35,21 (s, C_g); 28,61 (s, C_m); 14,02 (s, C_j)

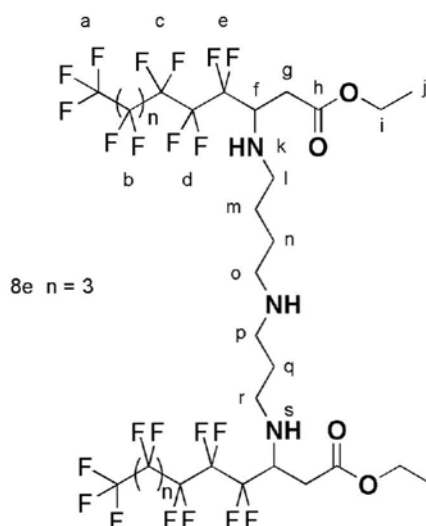
RMN 19F: (CDCl₃, 250MHz) δppm: -81,42 (s, 6F, F_a); -120,35 à -126,61 (ma, 12+4nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ(NH) = 3483 cm⁻¹, γ(C=O) = 1736 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (géminis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la spermidine: produit 8e

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (0,9 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO₄. Les solvants sont alors évaporés sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	8e
n	3
Formule brute	$C_{31}H_{33}O_4 N_3F_{30}$
Aspect	Huile jaunâtre
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	1081
Rendement (%)	88
Microanalyses (théoriques)	%C = 33,97 (34,41) %H = 3,46 (3,05) %O = (5,92) %N = 3,50 (3,88) %F = (52,72)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 4,15 (q, 4H, H_i , $J_{i-j}^3 = 80$ Hz); 3,76 (ma, 2H, H_f); 2,68 (ma, 12H, $H_{g,l,o,p,r}$); 1,22 à 1,63 (ma, 12H, $H_{j,m,n,q}$)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 250MHz) δ ppm: 170,53 (s, C_h); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 61,24 (s, C_i); 57,02 (ma, C_f); 47,66 (s, $C_{l,o}$); 45,40 (s, $C_{p,r}$); 34,31 (s, C_g); 27,67 (s, C_q); 26,31 (s, C_n); 24,01 (s, C_m); 14,23 (s, C_j)

RMN 19F: ($CDCl_3$, 250MHz) δ ppm: -81,42 (s, 6F, F_a); -120,35 à -126,61 (ma, 12+4nF, $F_{b,c,d,e}$)

IR: $\nu(NH) = 3361 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=O) = 1740 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C-F) = 1300 \text{ à } 1100 \text{ cm}^{-1}$

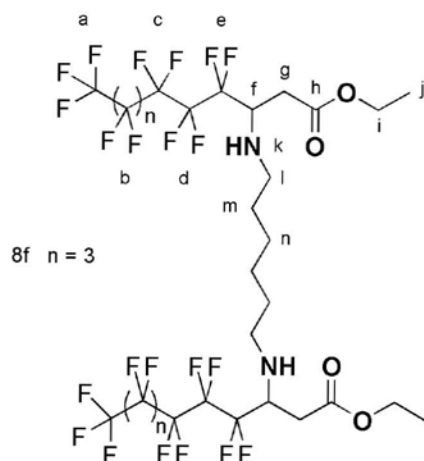
Réduction de l'énamine (gémis) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 1,6 – hexanediamine : produit 8f

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (0,9 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont

Chapitre 4 : Partie expérimentale

évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO_4 . Les solvants sont alors évaporés sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant AcOEt 10/ Hex 90).



Caractéristiques générales :

Produit	8f
n	3
Formule brute	$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{N}_2\text{F}_{30}$
Aspect	Pâte blanche
Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	1052
Rendement (%)	97
Microanalyses (théoriques)	%C = 33,89 (34,22)
	%H = 3,01 (2,85)
	%O = (6,08)
	%N = 2,56 (2,66)
	%F = (54,18)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CD₃COCD₃, 200MHz) δppm: 4,15 (q, 4H, H_i, J³_{i-j} = 8Hz); 3,84 (m, 2H, H_f); 2,74 (ma, 8H, H_{g,l}); 1,28 (ma, 14H, H_{j,m,n})

RMN 13C: (CD₃COCD₃, 250MHz) δppm: 170,89 (s, C_n); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 61,53 (s, C_f); 60,16 (s, C_i); 45,23 (s, C_l); 34,73 (s, C_g); 25,12 (s, C_m); 21,08 (s, C_n); 13,72 (s, C_j)

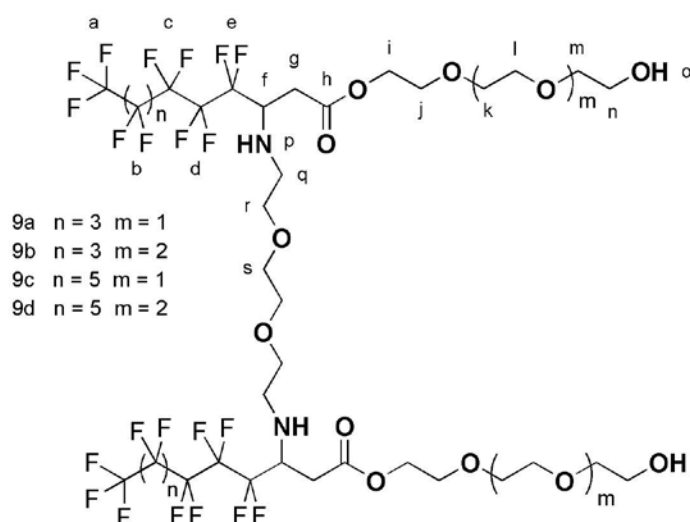
RMN 19F: (CD₃COCD₃, 200MHz) δppm: -81,85 (s, 6F, F_a); -108,58 (s, 4F, F_e); -119,53 à -127,14 (ma, 8+4nF, F_{b,c,d})

IR: γ(NH) = 3367 cm⁻¹, γ(C=O) = 1740 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (géminis) à partir des esters PEG et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 9

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (0,6 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est lyophilisé pour éliminer les traces d'eau. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	9a	9b	9c	9d
n	3	3	5	5
m	1	2	1	2
Formule brute	C ₃₈ H ₄₂ O ₁₂ N ₂ F ₃₀	C ₄₂ H ₅₀ O ₁₄ N ₂ F ₃₀	C ₄₂ H ₄₂ O ₁₂ N ₂ F ₃₈	C ₄₆ H ₅₀ O ₁₄ N ₂ F ₃₈
Aspect	Huile blanche	Huile jaunâtre	Huile jaunâtre	Huile jaunâtre
Masse molaire	1292	1380	1492	1580
Rendement (%)	70	60	60	52
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,78(35,29) %H = 3,45 (3,25) %O = (14,86) %N = 2,03 (2,16) %F = (44,11)	%C = 36,02(36,52) %H = 3,44 (3,62) %O = (16,23) %N = 2,37 (2,02) %F = (41,30)	%C = 34,01(33,78) %H = 2,78 (2,81) %O = (12,86) %N = 1,56 (1,87) %F = (48,39)	%C = 34,65(34,93) %H = 3,26 (3,16) %O = (14,17) %N = 1,98 (1,77) %F = (45,69)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 4,18 (t, 4H, H_i, J³_{i-j} = 4Hz) ; 3,76 (ma, 2H, H_f); 3,38 à 3,60 (ma, 18+2mH, H_j à H_n et H_q à H_s) ; 2,58 à 2,68 (ma, 4H, C_g)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 169,37 (s, C_h); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 72,88 (s, C_m) ; 70,17 à 70,89 (ma, C_{k,l,r,s}) ; 68,05 (s, C_j) ; 61,57 (ma, C_i) ; 60,88 (s, C_n) ; 60,36 (s, C_f) ; 50,39 (s, C_q) ; 33,45 (s, C_g)

RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -78,81 (s, 6F, F_a); 118,08 à 123,82 (ma, 12+4nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ (NH) = 3338 cm⁻¹, γ (OH) = 3228 cm⁻¹, γ(C=O) = 1745 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

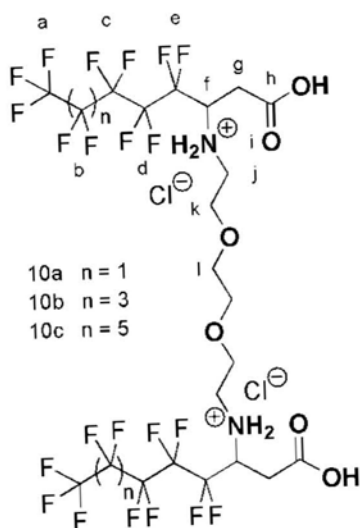
Saponification des diesters d'éthyle(produits 8a, 8b et 8c): produit 10a, 10b et 10c

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation sont introduits l'ester (0,8 mmol, 1 eq) en solution dans le THF et un mélange méthanol (90 mL) solution de soude (10 eq) dans 15 mL d'eau. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 4 h. Une solution d'acide chlorhydrique (1N) est alors ajoutée jusqu'à pH = 1. La phase aqueuse est extraite par 3 * 100 mL d'éther et séchée

Chapitre 4 : Partie expérimentale

sur MgSO_4 . Les solvants sont ensuite évaporés sous vide. Le produit est obtenu par recristallisation dans l'hexane et il est isolé sous forme de chlorhydrate d'ammonium.



Caractéristiques générales :

Produit	10a	10b	10c
n	1	3	5
Formule brute	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2\text{F}_{22}\text{Cl}_2$	$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2\text{F}_{30}\text{Cl}_2$	$\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2\text{F}_{38}\text{Cl}_2$
Aspect	Huile jaune	Solide blanc	Solide blanc
Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	901	1101	1301
Rendement (%)	84	84	87
Point de fusion ($^{\circ}\text{C}$)	/	70-75	58-60
Microanalyses (théoriques)	%C = 29,78 (29,30)	%C = 28,65 (28,33)	%C = 27,54 (27,67)
	%H = 2,11(2,44)	%H = 2,01 (2,17)	%H = 1,84 (1,69)
	%O = (10,65)	%O = (8,71)	%O = (7,37)
	%N =3,22 (3,10)	%N =2,64 (2,54)	%N =1,98 (2,15)
	%F = (46,39)	%F = (51,77)	%F = (55,49)
	%Cl = (7,76)	%Cl = (6,35)	%Cl = (5,38)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CD₃COCD₃, 250MHz) δppm: 3,97 (ma, 2H, H_f) ; 3,55 (ma, 8H, H_{k,l}) ; 2,94 (ma, 4H, H_j) ; 2,70 (ma, 4H, H_g)

RMN 13C: (CD₃COCD₃, 250MHz) δppm: 33,73 (s, C_g); 47,73 (s, C_j); 56,93 (m, C_f); 70,88 (s, C_i); 71,33 (s, C_j); 106 à 120 (m, C_a à C_e); 171,45 (s, C_h)

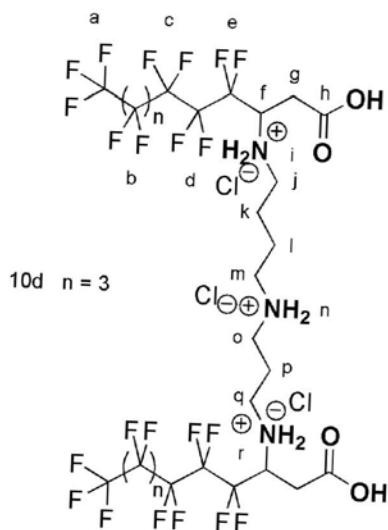
RMN 19F: (CD₃COCD₃, 250MHz) δppm: -76,91 (s, 6F, F_a) ; de -110,27 à -122,03 (m, 2*(6+2n), F_{b,c,d,e})

IR : γ(OH) = 3420 cm⁻¹, γ(C=O) = 1731 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Saponification des esters (produit 8d) : produit 10d

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation sont introduits l'ester (0,9 mmol, 1 eq) en solution dans le THF et un mélange méthanol (90 mL) solution de soude (10 eq) dans 15 mL d'eau. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4 h. Une solution d'acide chlorhydrique (1N) est alors ajoutée jusqu'à pH = 1. La phase aqueuse est extraite par 3 * 100 mL d'éther et séchée sur MgSO₄. Les solvants sont ensuite évaporés sous vide. Le produit est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt 10 / Hex 90 puis AcOEt pur). Le produit est conservé sous forme chlorhydrate d'ammonium.



Caractéristiques générales :

Produit	10d
n	3
Formule brute	$C_{27}H_{30}O_4N_3F_{30}Cl_3$
Aspect	Solide visqueux blanc
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	1136
Rendement (%)	61
Rapport frontal	0,1 (AcOEt 10/Hex 90)
Microanalyses (théoriques)	%C = 29,00 (28,52) %H = 2,23 (2,64) %O = (5,63) %N = 3,96 (3,69) %F = (50,17)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 3,75 (ma, 2H, H_f) ; 2,48 à 2,73 (ma, 12H, $H_{g,j,m,o,q}$) ; 1,38 à 1,61 (ma, 6H, $H_{k,l,p}$)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 170,92 (s, C_h); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 61,36 (s, C_f) ; 47,82 (s, $C_{j,m}$) ; 45,65 (s, $C_{o,q}$) ; 34,60 (s, C_g) ; 28,31 (s, $C_{k,l,p}$)

RMN 19F: ($CDCl_3$, 250MHz) δ ppm: -81,46 (s, 3F, F_a); -112,95 à -126,65 (ma, 4+2nF, $F_{b,c,d}$)

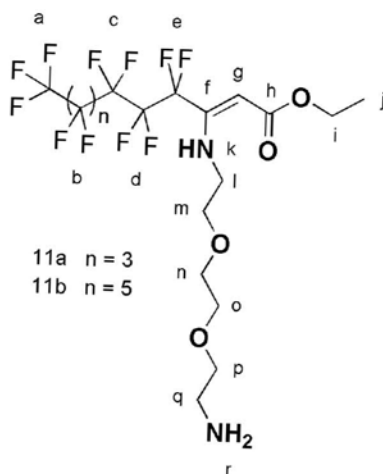
IR: $\nu(NH_2) = 3363 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=O) = 1742 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C-F) = 1300 \text{ à } 1100 \text{ cm}^{-1}$

3. Synthèse des tensioactifs monocaténaires :

Synthèse des énamines (monocaténaires) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 11a et 11b

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 3 mmol d'ester (1 eq), la diamine (10 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 6 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	11a	11b
n	3	5
Formule brute	C ₁₈ H ₂₁ O ₄ N ₂ F ₁₅	C ₂₀ H ₂₁ O ₄ N ₂ F ₁₉
Aspect	Liquide jaune	Huile jaune
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	614	714
Rendement (%)	84	90
Microanalyses (théoriques)	%C = 35,09 (35,17) %H = 3,33 (3,42) %O = (10,42) %N = 4,37 (4,56) %F = (46,41)	%C = 32,99 (33,61) %H = 2,44 (2,94) %O = (8,78) %N = 3,51 (3,92) %F = (50,56)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 8,62 (m, 1H, H_k) ; 5,03 (s, 1H, H_g) ; 4,15 (q, 2H, H_i, J³_{i-j} = 6Hz) ; 3,45 à 3,67 (ma, 10H, H_{i,m,n,o,p}) ; 2,88 (m, 2H, H_q) ; 1,71 (m, 2H, H_r) ; 1,27 (t, 3H, H_j, J³_{i-j} = 6Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 13,42 (s, C_j) ; 41,75 (s, C_q) ; 44,73 (s, C_i) ; 53,19 (s, C_i) ; 60,32 (s, C_p) ; 70,39 (s, C_n) ; 70,77 (s, C_m) ; 73,08 (s, C_o) ; 96,23 (s, C_g) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 147,82 (t, C_r) ; 169,00 (s, C_h)

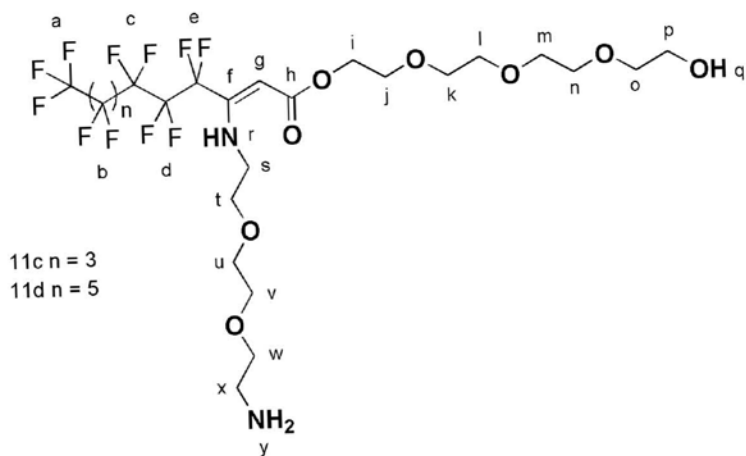
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,23 (s, 3F, F_a) ; -111,33 (s, 2F, F_e) ; -121,89 à -126,61 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH₂) = 3357 cm⁻¹, γ (NH) = 3265 cm⁻¹, γ(C=O) = 1671 cm⁻¹, γ(C=C) = 1622 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des énamines (monocaténaires) à partir des esters PEG et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 11c et 11d

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 1,5 mmol d'ester (1 eq), la diamine (10 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'acétate d'éthyle et lavé par 6 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	11c	11d
n	3	5
Formule brute	C ₂₄ H ₃₃ O ₈ N ₂ F ₁₅	C ₂₆ H ₃₃ O ₈ N ₂ F ₁₉
Aspect	Liquide jaune	Liquide jaune pale
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	762	862
Rendement (%)	50	63
Microanalyses (théoriques)	%C = 37,12 (37,79) %H = 3,89 (4,33) %O = (16,79) %N = 4,08 (3,67) %F = (37,40)	%C = 36,77 (36,19) %H = 3,47 (3,82) %O = (14,84) %N = 3,66 (3,24) %F = (41,87)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 8,57 (s, 1H, H_r) ; 5,03 (s, 1H, H_g) ; 4,19 (t, 2H, H_i, J³_{i-j} = 4Hz) ; 3,38 à 3,60 (ma, 24H, H_j à H_p et H_w à H_s) ; 2,83 (ma, 2H, H_x)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 169,37 (s, C_h); 148,26 (s, C_f); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 94,77 (s, C_g); 73,19 (s, C_o) ; 70,17 à 70,89 (ma, C_{k,l,m,n,t,u,v}) ; 69,47 (s, C_j) ; 63,18 (s, C_w) ; 61,57 (ma, C_{i,p}) ; 44,89 (s, C_s) ; 41,78 (s, C_x)

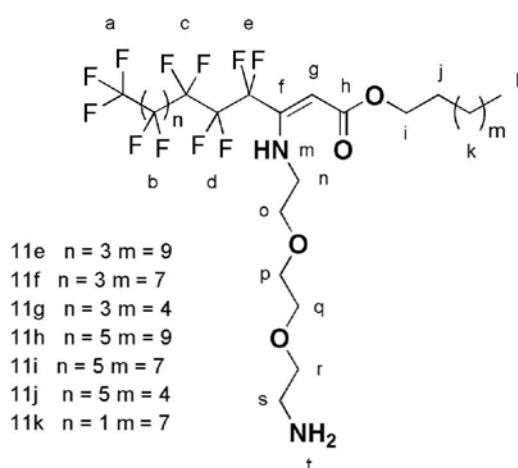
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,23 (s, 3F, F_a); -111,34 (s, 2F, F_e); 121,76 à 126,61 (ma, 4+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH) = 3400 cm⁻¹, γ (OH) = 3228 cm⁻¹, γ(C=O) = 1669 cm⁻¹, γ(C=C) = 1619 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des énamines mixtes (monocaténaïres): produit 11e-k

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 1,5 mmol d'ester (1 eq), la diamine (10 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 6 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	11e	11f	11g	11h	11i	11j	11k
n	3	3	3	5	5	5	1
m	9	7	4	9	7	4	7
Formule brute	$C_{28}H_{41}O_4$ N_2F_{15}	$C_{26}H_{37}O_4$ N_2F_{15}	$C_{24}H_{33}O_4$ N_2F_{15}	$C_{30}H_{41}O_4$ N_2F_{19}	$C_{28}H_{37}O_4$ N_2F_{19}	$C_{26}H_{33}O_4$ N_2F_{19}	$C_{24}H_{37}O_4$ N_2F_{11}
Aspect	liquide jaune	Liquide jaunâtre	Liquide jaune	Huile incolore	liquide jaunâtre	Liquide jaune	Liquide incolore
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	754	726	698	854	826	798	626
Rendement (%)	81	85	90	91	93	81	80
Microanalyses (théoriques)	%C = 45,10 (44,56) %H = 4,98 (5,43) %O = (8,48) %N = 3,97 (3,71) %F = (37,79)	%C = 42,42 (42,97) %H = 5,23 (5,09) %O = (8,81) %N = 3,78 (3,85) %F = (54,67)	%C = 40,41 (40,13) %H = 3,67 (3,93) %O = (9,16) %N = 3,64 (4,01) %F = (50,83)	%C = 42,36 (42,15) %H = 4,99 (4,80) %O = (7,49) %N = 3,56 (3,27) %F = (42,27)	%C = 41,20 (40,67) %H = 4,21 (4,47) %O = (7,74) %N = 3,74 (3,38) %F = (43,70)	%C = 38,67 (39,09) %H = 3,75 (4,13) %O = (8,02) %N = 3,59 (3,50) %F = (45,23)	%C = 46,22 (46,00) %H = 6,13 (5,91) %O = (10,22) %N = 4,95 (4,47) %F = (33,38)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 8,60 (s, 1H, H_m) ; 5,04 (s, 1H, H_g) ; 4,08 (t, 2H, H_i, J³_{i-j} = 4Hz); 3,46 à 3,67 (ma, 10H, H_{n,o,p,q,r}) ; 2,87 (ma, 2H, H_s) ; 1,63 (ma, 2H, H_j) ; 1,26 (ma, mH, H_k) ; 0,88 (t, 3H, H_l, J³_{k-lj} = 4Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 169,47 (s, C_h); 147,70 (ma, C_f) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 88,53 (s, C_g) ; 70,14 à 70,74 (ma, C_{o,p,q}) ; 66,11 (s, C_r) ; 64,06 (s, C_i) ; 44,70 (s, C_n,) ; 41,80 (s, C_s) ; 22,74 à 31,97 (ma, C_{j,k}) ; 14,13 (s, C_l)

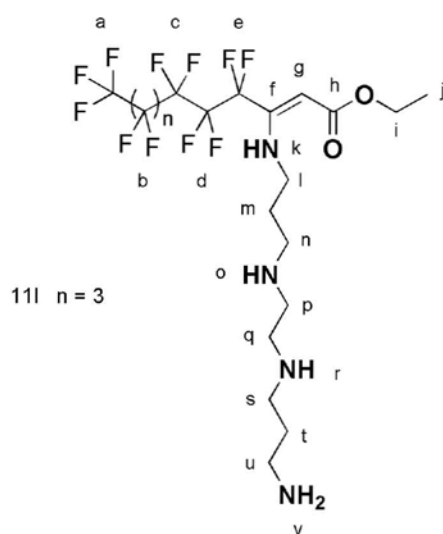
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,27 (s, 3F, F_a); -111,40 (s, 2F, F_e) ; -122,05 à -126,65 (ma, 4+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ(C=O) = 1669 cm⁻¹, γ(C=C) = 1621 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Synthèse des énamines (monocaténaïres) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,2-éthylènediamine: produit 11l

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 3 mmol d'ester (1 eq), la diamine (10 eq) et la triéthylamine (30 eq) dans 100 mL d'éther. Le mélange est laissé sous agitation durant 24 h à reflux. L'éther et la triéthylamine sont alors évaporés sous vide et le mélange est repris à l'éther et lavé par 5 * 100 mL d'une solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	11l
n	3
Formule brute	$C_{20}H_{27}O_2 N_4 F_{15}$
Aspect	liquide incolore
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	640
Rendement (%)	40
Microanalyses (théoriques)	%C = 36,99 (37,50) %H = 3,89 (4,21) %O = (5,00) %N = 8,22 (8,75) %F = (44,53)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: ($CDCl_3$, 400MHz) δ ppm: 8,44 (s, 1H, H_k) ; 4,96 (s, 1H, H_g) ; 4,10 (q, 2H, H_i , $J^3_{i-j} = 6$ Hz) ; 3,32 (t, 2H, H_l , $J^3_{l-m} = 6$ Hz) ; 2,68 (ma, 10H, $H_{n,p,q,s,u}$) ; 1,71 (t, 2H, H_m , $J^3_{l-m} = 6$ Hz) ; 1,60 (t, 2H, H_t , $J^3_{t-u} = 6$ Hz) ; 1,40 (s, 4H, $H_{o,r,v}$) ; 1,26 (t, 3H, H_j , $J^3_{i-j} = 6$ Hz)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: 169,26 (s, C_h) ; 147,80 (s, C_f) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 87,39 (s, C_g) ; 59,45 (s, C_i) ; 49,21 (s, $C_{p,q}$) ; 47,58 (s, C_s) ; 47,00 (s, C_n) ; 43,36 (s, C_l) ; 40,25 (s, C_u) ; 33,40 (s, C_t) ; 30,64 (s, C_m) ; 13,98 (s, C_j)

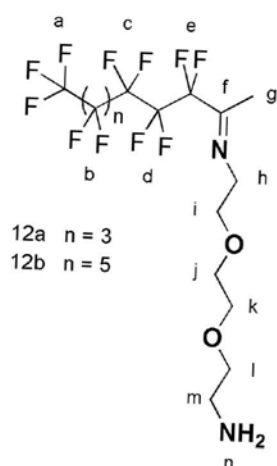
RMN 19F: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: -81,54 (s, 3F, F_a) ; -111,60 (s, 2F, F_e) ; -122,05 à -126,65 (ma, 4+2nF, $F_{b,c,d}$)

IR: $\nu(NH_2) = 3251 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=O) = 1666 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C=C) = 1623 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(C-F) = 1300 \text{ à } 1100 \text{ cm}^{-1}$

Décarboxylation des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques (produit 2) avec la 2,2'-(ethylenedioxy) bis-(éthylamine): produit 12

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 2 mmol d'acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques (1 eq), la diamine (10 eq) dans 150 mL de toluène. Le mélange est laissé sous agitation durant 48 h à reflux. Le toluène est alors évaporé sous vide et le mélange est repris à l'éther et filtré. Le filtrat est lavé par 6 * 100 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	12a	12b
n	3	5
Formule brute	C ₁₅ H ₁₇ O ₂ N ₂ F ₁₅	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N ₂ F ₁₉
Aspect	Liquide jaune	Liquide jaune
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	542	642
Rendement (%)	83	85
Microanalyses (théoriques)	%C = 32,85 (33,21) %H = 3,46 (3,13) %O = (5,90) %N = 4,88 (5,16) %F = (52,58)	%C = 32,03 (31,77) %H = 3,01 (2,64) %O = (4,98) %N = 4,21 (4,36) %F = (56,23)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 400MHz) δppm: 3,96 à 3,56 (ma, 8H, H_{i,j,k,l}) ; 3,46 (t, 2H, H_h, J³_{h-i} = 4Hz) ; 2,83 (ma, 2H, H_m) ; 2,02 (s, 3H, H_g) ; 1,29 (ma, 2H, H_n)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 159,40 (s, C_f) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 73,92 (s, C_i) ; 71,06 (s, C_{i,j,k}) ; 52,71 (s, C_h) ; 42,17 (s, C_m) ; 14,33 (s, C_g)

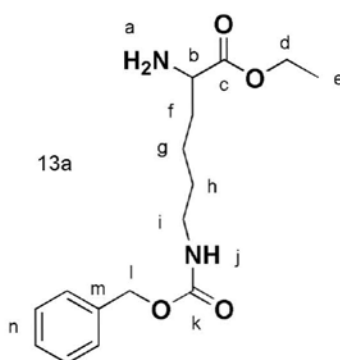
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,22 (s, 3F, F_a) ; 116,19 (s, 2F, F_e) ; 121,63 à 126,56 (ma, 4+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH) = 3365 cm⁻¹, γ(C=N) = 1682 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Estérfication de la lysine : produit 13

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation et d'un Dean-Stark sont dissoutes 5 mmol (1 eq) de Boc-Lys(Z)-OH dans 200 mL de toluène. 100 mL d'éthanol sont ajoutés ainsi que quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le toluène et l'éthanol en excès sont évaporés sous vide. Le mélange est repris par 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé par 2 * 75 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase aqueuse est extraite par 3 * 70 mL d'acétate d'éthyle et les phases organiques réunies sont lavées par 3 * 50 mL d'eau. Après séchage sur MgSO₄ le solvant est évaporé sous vide.



Caractéristiques générales :

Produit	13a
Formule brute	C ₁₆ H ₂₄ O ₄ N ₂
Aspect	Liquide huileux blanchâtre
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	308
Rendement (%)	70

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 7,23 (ma, 5H, H_n) ; 4,97 (s, 1H, H_i) ; 4,71(s, 1H, H_j); 4,05 (q, 2H, H_d, J³_{d-e}=7Hz) ; 3,29 (m, 1H, H_b) ; 3,08 (d, 2H, H_i, J³_{i-h} = 5Hz) ; 1,93 (m, 2H, H_f) ; 1,60 (m, 2H, H_h) ; 1,42 (s, 3H, H_e, J³_{d-e}=7Hz) ; 1,15 (m, 2H, H_g)

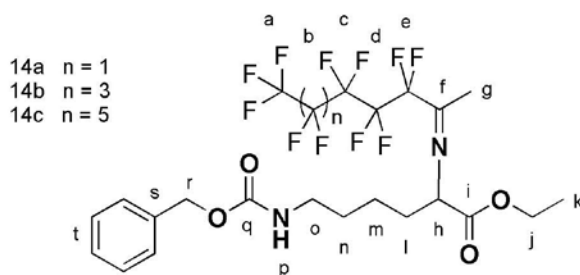
RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 174,00 (s, C_c) ; 156,32 (s, C_k) ; 136,54 (s, C_m) ; 128,82 (m, C_n) ; 66,88 (s, C_i) ; 61,45 (s, C_d) ; 54,61 (s, C_b) ; 41,15 (s, C_i) ; 34,70 (s, C_{n,g}) ; 30,01 (s, C_f) ; 14,55 (s, C_e)

IR: γ(NH₂) = 3441 cm⁻¹, γ(CH ar) = 3036 cm⁻¹, γ(C=O)ester = 1704 cm⁻¹, γ(C=O)carbamate = 1698 cm⁻¹

Synthèse des imines (monocaténaires) à partir des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques et de la lysine estérifiée: produit 14

Mode opératoire général :

Dans un réacteur sous agitation, sont introduites 2 mmol d'acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques (1 eq), la lysine estérifiée (1,1 eq) dans 120 mL de toluène. Le mélange est laissé sous agitation durant 48h à reflux. Le toluène est alors évaporé sous vide et le mélange est repris à l'éther et filtré. Le filtrat est lavé par 2 * 50 mL d'une solution HCl 0,1M puis par une solution de NaCl saturée jusqu'à neutralisation. Après séchage sur MgSO₄ la phase organique est réduite sous vide. Le produit est purifié rapidement par filtration sur silice (éluant hexane – AcOEt).



Caractéristiques générales :

Produit	14a	14b	14c
n	1	3	5
Formule brute	C ₂₃ H ₂₅ O ₄ N ₂ F ₁₁	C ₂₅ H ₂₅ O ₄ N ₂ F ₁₅	C ₂₇ H ₂₅ O ₄ N ₂ F ₁₉
Aspect	Huile jaune	Huile jaune	Huile jaune
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	602	702	802
Rendement (%)	56	75	80

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 7,23 (ma, 5H, H_t) ; 4,97 (ma, 2H, H_r) ; 4,66 (ma, 1H, H_p) ; 4,05 (m, 4H, H_{h,j}) ; 3,07 (m, 2H, H_o) ; 1,83 (m, 3H, H_i) ; 1,42 (m, 3H, H_g) ; 1,14 (m, 7H, H_{k,m,n})

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 168,10 (s, C_i) ; 156,37 (s, C_q) ; 155,07 (s, C_f) ; 136,20 (s, C_s) ; 128 (m, C_t) ; 106 à 120 (m, C_a à C_e) ; 66,60 (s, C_r) ; 62,27 (s, C_h) ; 42,18 (s, C_o) ; 31,61 (s, C_l) ; 26,72 (s, C_{n,m}) ; 16,16 (s, C_k)

RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,08 (s, 3F, F_a) ; -115,9 (s, 2F, F_e) ; de -121,49 à -126,52 (m, (4+2n)F, F_{b,c,d})

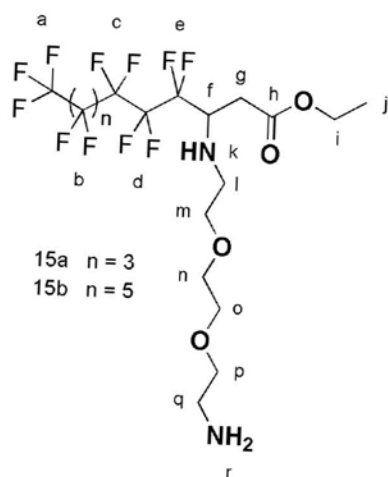
IR : ν(NH) = 3350 cm⁻¹, ν (CH ar) = 3036 cm⁻¹, ν(C=O)ester = 1730 cm⁻¹, ν(C=O)carbamate = 1715 cm⁻¹, ν (C=N) = 1529 cm⁻¹, ν(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (monocaténares) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 15a et 15b

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (1 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris par 50 mL d'acétate d'éthyle et séché sur MgSO₄. Le mélange est réduit de nouveau sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.

Chapitre 4 : Partie expérimentale



Caractéristiques générales :

Produit	15a	15b
n	3	5
Formule brute	C ₁₈ H ₂₃ O ₄ N ₂ F ₁₅	C ₂₀ H ₂₃ O ₄ N ₂ F ₁₉
Aspect	Liquide jaune	Huile jaune
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	616	716
Rendement (%)	92	87
Microanalyses (théoriques)	%C = 34,71 (35,06)	%C = 33,41 (33,51)
	%H = 3,38 (3,77)	%H = 3,09 (3,21)
	%O = (10,38)	%O = (8,93)
	%N = 4,35 (4,54)	%N = 3,72 (3,91)
	%F = (46,26)	%F = (50,41)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H : (CDCl₃, 400MHz) δppm: 4,18 (q, 2H, H_i, J³_{i-j} = 7,5Hz) ; 3,83 (m, 1H, H_f); 3,51 à 3,59 (ma, 8H, H_{m,n,o,p}); 2,77 à 2,90 (ma, 4H, H_{l,q}); 2,58 à 2,76 (m, 2H, H_g); 1,98 (ma, 3H, H_{k,r}); 1,27 (t, 3H, H_j, J³_{i-j} = 7,5Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 14,17 (s, C_j); 41,71 (s, C_q); 47,09 (s, C_i); 56,30 (ma, C_{f,i}); 61,18 (s, C_p); 70,29 (s, C_o); 70,33 (s, C_m); 70,99 (s, C_n); 106 à 120 (ma, C_a à C_e); 170,44 (s, C_h)

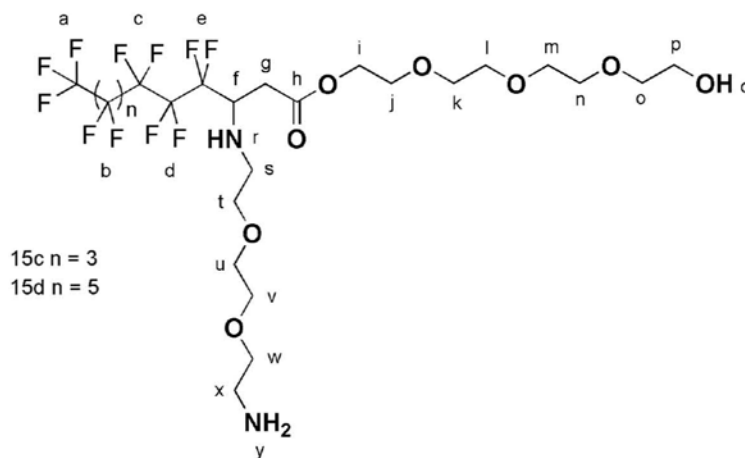
RMN 19F: (CDCl₃, 250MHz) δppm: -81,23 (s, 3F, F_a); -115 à -117 (ma, 2F, F_e); -121,89 à -126,61 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d})

IR: γ (NH) = 3366 cm⁻¹, γ(C=O) = 1739 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (monocaténaires) à partir des esters PEG et de la 2,2'-(ethylenedioxy)bis-(ethylamine): produit 15c et 15d

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (1 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris par 50mL d'éther et séché sur MgSO₄. Le mélange est réduit de nouveau sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification. Le mélange peut nécessiter une lyophilisation.



Caractéristiques générales :

Produit	15c	15d
n	3	5
Formule brute	$C_{24}H_{35}O_8N_2F_{15}$	$C_{26}H_{35}O_8N_2F_{19}$
Aspect	Liquide blanc	Huile blanche
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	764	864
Rendement (%)	94	70
Microanalyses (théoriques)	%C = 37,98 (37,69) %H = 4,10 (4,58) %O = (16,75) %N = 3,72 (3,66) %F = (37,30)	%C = 35,69 (36,11) %H = 3,53 (4,05) %O = (14,81) %N = 3,75 (3,24) %F = (41,78)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: 4,21 (t, 2H, H_i , $J^3_{i-j} = 4Hz$) ; 3,76 (ma, 1H, H_f) ; 3,38 à 3,60 (ma, 24H, H_j à H_p et H_w à H_s) ; 2,83 (ma, 2H, H_x) ; 2,58 à 2,68 (ma, 2H, C_g)

RMN 13C: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: 169,37 (s, C_n) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 72,88 (s, C_o) ; 70,17 à 70,89 (ma, 14H, $C_{k,l,m,n,t,u,v}$) ; 68,05 (s, C_j) ; 64,12 (s, C_w) ; 61,57 (ma, C_i) ; 60,88 (s, C_p) ; 60,36 (s, C_f) ; 50,39 (s, C_s) ; 41,32 (s, C_x) ; 33,45 (s, C_g)

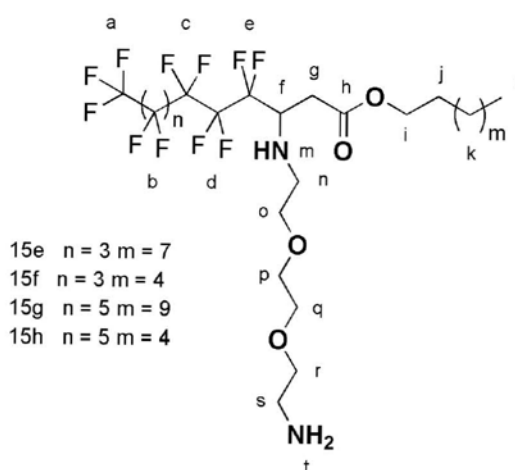
RMN 19F: ($CDCl_3$, 200MHz) δ ppm: -78,81 (s, 3F, F_a) ; 118,08 à 123,82 (ma, 6+2nF, $F_{b,c,d,e}$)

IR: ν (NH) = 3338 cm^{-1} , ν (OH) = 3228 cm^{-1} , ν (C=O) = 1745 cm^{-1} , ν (C-F) = $1300\text{ à }1100\text{ cm}^{-1}$

Réduction des énamines mixtes (monocaténaire): produit 15e-h

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (1 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 28 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO₄. Les solvants sont alors évaporés sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	15e	15f	15g	15h
n	3	3	5	5
m	7	4	9	4
Formule brute	C ₂₆ H ₃₉ O ₄ N ₂ F ₁₅	C ₂₄ H ₃₅ O ₄ N ₂ F ₁₅	C ₃₀ H ₄₃ O ₄ N ₂ F ₁₉	C ₂₆ H ₃₅ O ₄ N ₂ F ₁₉
Aspect	huile	Huile blanchâtre	Solide jaunâtre	Huile blanche
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	728	700	856	800
Rendement (%)	85	71	92	80
Microanalyses (théoriques)	%C = 43,15 (42,85) %H = 4,89 (5,35) %O = (8,79) %N = 4,01 (3,84) %F = (39,14)	%C = 41,56 (41,14) %H = 4,87 (5,00) %O = (9,14) %N = 3,78 (4,00) %F = (40,71)	%C = 42,06 (42,05) %H = 5,09 (5,02) %O = (7,47) %N = 3,18 (3,27) %F = (42,17)	%C = 38,59 (39,00) %H = 4,65 (4,37) %O = (8,00) %N = 3,16 (3,50) %F = (45,12)

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 4,09 (t, 2H, H_i, J³_{i-j} = 6Hz) ; 3,80 (ma, 1H, H_f) ; 3,02 à 3,58 (ma, 10H, H_{n,o,p,q,r}) ; 2,87 (t, 2H, H_s) ; 2,49 à 2,70 (ma, 2H, H_g) ; 1,74 (ma, 3H, H_{m,t}) ; 1,62 (ma, 2H, H_j) ; 1,25 (ma, 2mH, H_k) ; 0,86 (t, 3H, H_l)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 170,51 (s, C_h) ; 106 à 120 (ma, C_a à C_e) ; 73,46 (s, C_i) ; 70,26 (s, C_{p,q}) ; 65,38 (s, C_r) ; 56,23 (s, C_f) ; 46,95 (s, C_n) ; 41,77 (s, C_s) ; 22,36 à 35,97 (ma, C_{j,k}) ; 14,05 (s, C_l)

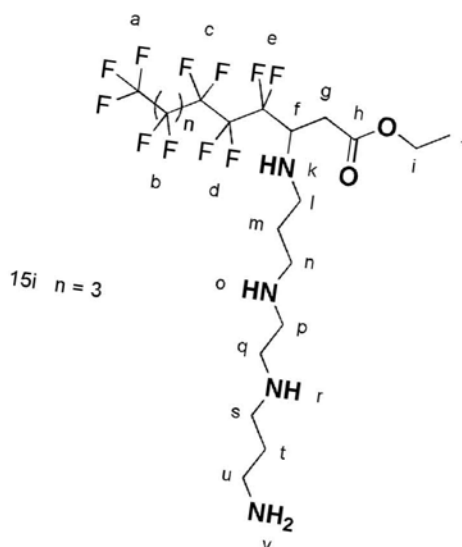
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,19 (s, 3F, F_a) ; -120,35 à -126,61 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ (NH₂) = 3228 cm⁻¹, γ(C=O) = 1738 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des énamines (monocaténaïres) à partir des esters Z,3-perfluoroalkyl-3-fluoropropénoate d'éthyle et de la N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,2-éthylènediamine: produit 15i

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (1,5 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50 mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO₄. Les solvants sont alors évaporés sous vide.



Caractéristiques générales :

Produit	15i
n	3
Formule brute	C ₂₀ H ₂₉ O ₂ N ₄ F ₁₅
Aspect	Liquide vert (problème de complexation avec le Ni)
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	642
Rendement (%)	84

Caractéristiques spectrales:

RMN 1H: (CDCl₃, 400MHz) δppm: 4,09 (q, 2H, H_i, J³_{i-j} = 6Hz) ; 2,89 à 3,34 (ma, 11H, H_{f,g,l,n,s,u}) ; 2,45 (m, 4H, H_{p,q}) ; 1,64 (ma, 4H, H_{m,t}) ; 1,42 (s, 3H, H_{k,o,r}) ; 1,26 (t, 3H, H_j, J³_{i-j} = 6Hz)

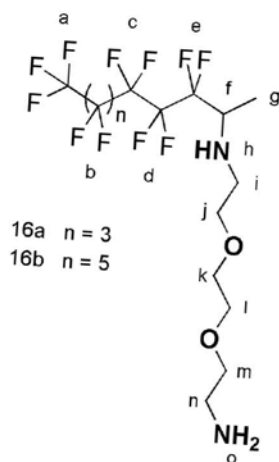
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,19 (s, 3F, F_a) ; -120,35 à -126,61 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ (NH₂) = 3228 cm⁻¹, γ(C=O) = 1738 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des imines (produit 12) : produit 16

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'imine (1,5 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 70 mL de méthanol. Le Palladium sur charbon est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 20h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris par 50 mL d'éther et séché sur MgSO₄. Le mélange est réduit de nouveau sous vide. Le produit ne nécessite pas de purification.



Caractéristiques générales :

Produit	16a	16b
n	3	5
Formule brute	C ₁₅ H ₁₉ O ₂ N ₂ F ₁₅	C ₁₇ H ₁₉ O ₂ N ₂ F ₁₉
Aspect	Liquide blanc	Liquide jaune pale
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	544	644
Rendement (%)	90	70
Microanalyses (théoriques)	%C = 32,86 (33,08) %H = 3,37 (3,49) %O = (5,88) %N = 4,82(5,14) %F = (52,38)	%C = 32,12 (31,67) %H = 3,32 (2,95) %O = (4,96) %N = 3,79 (4,34) %F = (56,05)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 4,07 (ma, 3H, H_{h,o}) ; 3,59 (ma, 8H, H_{j,k,l,m}) ; 3,36 (m, 1H, H_f, J³_{f-g} = 6Hz) ; 2,81 (ma, 4H, H_{i,n}) ; 1,25 (d,3H, H_g, J³_{f-g} = 6Hz)

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 70,99 (ma, C_{j,k,l,m}) ; 55,90 (s, C_f) ; 50,37 (s, C_i) ; 40,36 (s, C_n) ; 14,56 (s, C_g)

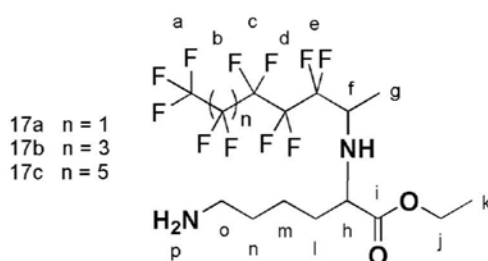
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,35 (s, 3F, F_a) ; 120,17 à 127,99 (ma, 6+2nF, F_{b,c,d,e})

IR: γ (NH) = 3375 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Réduction des imines (monocaténaires) à partir des acides 3-fluoro-3-perfluoroalkylpropénoïques et de la lysine estérifiée: produit 17

Mode opératoire général :

Dans un réacteur d'hydrogénation, est introduite l'énamine (1,5 mmol, 1 eq) solubilisée dans un mélange de 50mL d'acétate d'éthyle et de 20 mL de méthanol. Le Ni de Raney est ajouté en quantité catalytique dans ce mélange. Après avoir purgé à l'azote, l'hydrogène est introduit à 80 bars et la réaction est laissée durant 24 h sous agitation à 50 °C. Après retour à température ambiante, le mélange est purgé à l'azote puis filtré sur célite (rincé par AcOEt et MeOH 500 mL). Les solvants sont évaporés sous vide puis le mélange est repris à l'éther et séché sur MgSO₄. Les solvants sont alors évaporés sous vide.



Caractéristiques générales :

Produit	17a	17b	17c
n	1	3	5
Formule brute	C ₁₅ H ₂₁ O ₂ N ₂ F ₁₁	C ₁₇ H ₂₁ O ₂ N ₂ F ₁₅	C ₁₉ H ₂₁ O ₂ N ₂ F ₁₉
Aspect	Huile jaunâtre	Huile jaunâtre	Huile jaune
Masse molaire (g·mol ⁻¹)	470	570	670
Rendement (%)	92	94	91
Microanalyses (théoriques)	%C = 37,87 (38,29) %H = 4,38 (4,46) %N = 6,05 (5,95)	%C = 34,98 (35,66) %H = 4,08 (4,02) %N = 4,44 (4,89)	%C = 33,54 (33,92) %H = 3,25 (3,42) %N = 3,62 (4,16)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (CDCl₃, 200MHz) δppm: 4,08 (q, 2H, H_j) ; 3,18 à 3,38 (ma, 4H, H_{f,h,o}) ; 2,69 (ma, 2H, H_p) ; 2,01 (m, 4H, H_{i,n}) ; 1,43 à 1,09 (m, 8H, H_{g,k,m})

RMN 13C: (CDCl₃, 200MHz) δppm: 170,11 (s, C_i) ; 106 à 120 (m, C_a à C_e) ; 60,24 (s, C_j) ; 58,65 (s, C_f) ; 51,69 (s, C_n) ; 40,78 (s, C_o) ; 31,28 (s, C_n) ; 29,89 (s, C_i) ; 20,75 (s, C_m) ; 14,59 (m, C_{g,k})

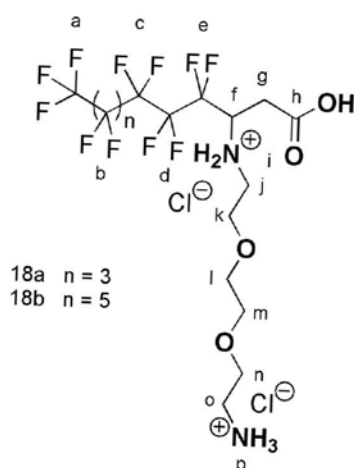
RMN 19F: (CDCl₃, 200MHz) δppm: -81,08 (s, 3F, F_a) ; de -118,12 à -126,52 (m, (6+2n)F, F_{b,c,d,e})

IR : γ(NH) = 3350 cm⁻¹, γ(C=O) = 1732 cm⁻¹, γ(C-F) = 1300 à 1100 cm⁻¹

Saponification des esters (produit15a et 15b): produit 18

Mode opératoire général :

Dans un réacteur muni d'agitation sont introduits l'ester (1 mmol, 1 eq) en solution dans le THF et un mélange méthanol (90 mL) solution de soude (10 eq) dans 15 mL d'eau. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4h. Une solution d'acide chlorhydrique (1N) est alors ajoutée jusqu'à pH = 1. La phase aqueuse est extraite par 3 * 100 mL d'éther et séchée sur Na₂SO₄. Les solvants sont ensuite évaporés sous vide et le mélange est lyophilisé. Le produit est isolé sous forme de chlorhydrate d'ammonium.



Caractéristiques générales :

Produit	18a	18b
n	3	5
Formule brute	$C_{16}H_{21}O_4N_2F_{15}Cl_2$	$C_{18}H_{21}O_4N_2F_{19}Cl_2$
Aspect	Solide orange	Solide orange
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	660	760
Rendement (%)	75	89
Microanalyses (théoriques)	%C = 28,67 (29,09) %H = 3,11 (3,18) %O = (9,69) %N = 4,15 (4,24) %F = (43,18)	%C = 28,72 (28,42) %H = 2,83 (2,76) %O = (8,42) %N = 3,57 (3,68) %F = (47,50)

Caractéristiques spectrales :

RMN 1H : (MeOH, 400MHz) δ ppm: 3,72 (ma, 9H, $H_{f,k,l,m,n}$) ; 3,40 (t, 2H, H_j , $J^3_{j-k} = 7,5Hz$) ; 3,14 (t, 2H, H_o , $J^3_{o-n} = 7,5Hz$) ; 3,05 (d, 2H, H_g , $J^3_{f-g} = 7,5Hz$)

RMN 13C: (MeOH, 400MHz) δ ppm: 166,44 (s, C_h) ; 106 à 120 (m, C_a à C_e) ; 72,50 (s, C_n) ; 69,57 (s, C_k) ; 66,33 (s, $C_{i,m}$) ; 62,31 (s, C_f) ; 49,26 (s, C_j) ; 38,52 (s, C_o) ; 32,98 (s, C_g)

RMN 19F: (MeOH, 250MHz) δ ppm: -76,91 (s, 6F, F_a) ; de -110,27 à -122,03 (m, 6+2nF, $F_{b,c,d,e}$)

IR: ν (NH, OH) = 3436 cm^{-1} , ν (C=O) = 1732 cm^{-1} , ν (C-F) = 1300 à 1100 cm^{-1}

F. Tests de viabilité cellulaire

Lignée cellulaire et culture cellulaire :

Nous utilisons la lignée de cellules eucaryotes MRC5 qui est une lignée de fibroblastes embryonnaires de poumon humain. Ces cellules sontensemencées à 1×10^5 cellules/cm² et cultivées dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM, 41090, Invitrogen, France) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage, 45 min à 56°C (FCS, 10270, Invitrogen, France). Ces cultures sont maintenues sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à une température de 37°C. La numération des cellules viables est ensuite déterminée par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Pour chacun des tests, les cellules sontensemencées 48h avant leur exposition à la drogue à tester.

Test de viabilité cellulaire : test au MTT

Afin d'évaluer les effets de la drogue sur les cellules MRC5, un test colorimétrique au MTT est exécuté. Ce test est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de MTT jaune [3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] en un sel de formazan insoluble bleu-pourpre. L'expérience est réalisées en plaques 96 puits (Sarstedt), avec un volume final de 100 µl de milieu par cupule. Après 48h d'incubation, le milieu de culture des cellules MRC5 initialementensemencées à 1×10^4 cellules/puits, est remplacé par du milieu de culture contenant la drogue et complémenté à 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Après 24h, 48h et 168h d'incubation sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à une température de 37°C, 10 µl de solution de MTT (5 mg/ml MTT dans du PBS) est ajouté (10 µl par cupule) et les plaques sont incubées 4h sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à une température de 37°C. On ajoute alors 100 µl de sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, France) (0.1 g/ml SDS dans PBS, avec 445 µl HCl 0.01M) dans chaque puits avant d'incuber les plaques sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à une température de 37°C pendant 4h supplémentaires. La quantité de formazan formée, ainsi dissoute par le SDS, est alors déterminée par lecture de l'absorbance à l'aide d'un lecteur de plaque (Titertek Multiscan EX apparatus, Labsystemes, Helsinki, Finlande) et ce à une longueur d'onde de 540 nm avec une contre mesure de référence à 690 nm. L'expérience est répétée 3 fois, à chaque fois huit puits par concentration de drogue et par temps sont testés.

Bibliographie

- (1) Johanssen, W. L. *Elemente der exakten Erblchkeitslehre* **1909**, Gustav Fischer, léna.
- (2) Jorgensen, R.; Napoli, C.; Lemieux, C. *The Plant Cell*. **1990**, *2*, 279-289.
- (3) Van der Krol, A. R.; Mur, L. A.; Beld, M.; MOI, J. N. M.; Stuitje, A. R. *The Plant Cell*. **1990**, *2*, 291-299.
- (4) Elbashir, S. M.; Harboth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- (5) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- (6) Kennerdell, J. R.; Carthew, R. W. *Cell* **1998**, *95*, 1017-1026.
- (7) McManus, M. T.; Sharp, P. A. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 737-747.
- (8) Alberts, B. *Molecular biology of the cell* **2002**, Garland, New York.
- (9) Gordesky, S. E.; Marinetti, G. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *50*, 1027.
- (10) Gobley, N. T. *J. Pharm. Chim.* **1847**, *11(409)*, 1917.
- (11) Devaux, P. F.; Herrmann, A.; Ohlwein, N.; Kozlov, M. M. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 1591-1600.
- (12) Scheiner-Bobis, G. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2424-2433.
- (13) Felgner, P. L.; Ringold, M. *Nature* **1989**, *337*, 387-388.
- (14) Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. *FEBS Letters* **1994**, *356*, 361-366.
- (15) Zabner, J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997-19007.
- (16) Wrobel, I.; Collins, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 296-304.
- (17) Zhou, X.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1189*, 195-203.
- (18) Matsui, H.; Johnson, L. G.; Randell, S. H.; Boucher, R. C. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1117-1126.
- (19) Somia, N.; Verma, M. *Nature Rev. Genetics* **2000**, *1*, 91-99.
- (20) Goyenvalle, A.; Vulin, A.; Fougerousse, F.; Leturcq, F.; Kaplan, J. C.; Garcia, L.; Danos, O. *Science* **2004**, *306*, 1796-1799.
- (21) Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L. *Science* **1990**, *247*, 1465-1468.
- (22) Liu, F.; Song, Y. K.; Liu, D. *Gene ther.* **1999**, *6*, 1258-1266.
- (23) Hengge, U. R.; Chan, E. F.; Foster, R. A.; Walker, P. S.; Vogel, J. C. *Nat. Genet.* **1995**, *10(2)*, 161-166.
- (24) Hickman, M. A.; Malone, R. W.; Lehmann-Bruinsma, K.; Sih, T. R.; Knoell, D.; Szoka, F. C.; Walzem, R.; Carlson, D. M.; Powell, J. S. *Gene ther.* **1994**, *5(12)*, 1477-1483.
- (25) Schwartz, B.; Benoist, C.; Abdallah, B.; Rangara, R.; Hassan, A.; Scherman, D.; Demeneix, B. A. *Gene ther.* **1996**, *3(5)*, 405-411.
- (26) Bacchetti, S.; Graham, F. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 1590-1594.
- (27) O'Brien, J.; Lummis, S. C. R. *Methods* **2004**, *33*, 121-125.
- (28) Sawamura, D.; Ina, S.; Itai, K.; Meng, X.; Kon, A.; Tamai, K.; Hanada, K.; Hashimoto, I. *Gene ther.* **1999**, *6*, 1785-1787.
- (29) Potter, H.; Weir, L.; Leder, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 7161-7165.
- (30) Bloquel, C.; Fabre, E.; Bureau, M. F.; Schermann, D. *J. Gene. Med.* **2004**, *6*, S11-S23.
- (31) Pavselj, N.; Préat, V. *J. Controlled Release* **2005**, *106*, 407-415.
- (32) Taniyama, Y.; Tachibana, K.; Hiraoka, K.; Aoki, M.; Yamamoto, S.; Matsumamoto, K.; Nakamura, T.; Ogihara, T.; Kaneda, Y.; Morishita, R. *Gene ther.* **2002**, *9*, 372-380.
- (33) Zeira, E.; Manevitch, A.; Khatchatouriants, A.; Pappo, O.; Hyam, E.; Darash-Yahana, M.; Tavor, E.; Honigam, A.; Lewis, A.; Galun, E. *Molecular Therapy* **2003**, *8*, 342-350.
- (34) Scherer, F.; Anton, M.; Schilinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Krüger, A.; Gänsbacher, B.; Planck, C. *Gene ther.* **2002**, *9*, 102-109.

- (35) Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302.
- (36) Barthélémy, P.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 2133-2148.
- (37) Georgakilas, V.; Pellarini, F.; Prato, M.; Guldi, D.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5075.
- (38) Klumpp, C.; Lacerda, L.; Chaloin, O.; Da Ros, T.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. *Chem. Commun.* **2007**, DOI: 10.1039/b708435h, 3762-3764.
- (39) Nakamura, E.; Isobe, H.; Tomita, N.; Sawamura, M.; Jinno, S.; Okayama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4254.
- (40) Shahgaldian, P.; Sciotti, M. A.; Pieleles, U. *Langmuir* **2008**, *24*, 8522-8526.
- (41) Asgatay, S.; Bololoi, C.; Franceschi-Messant, S.; Vicendo, P.; Perez, E.; Rico-Lattes, I. *Colloid. Polym. Sci.* **2006**, *284*, 668-676.
- (42) Feng-Huei, L.; Chia-Hao, C.; Winston, T. K. C.; Tzang-Fu, K. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3333-3338.
- (43) Clamme, J. P.; Krishnamoorthy, G.; Mely, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617* (1-2), 52-61.
- (44) Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsasser, H. P.; Kissel, T. *Pharm. Res* **1999**, *16*(8), 1273-1279.
- (45) Chabaux, P.; Camplo, M.; Payet, D.; Serin, G.; Moreau, L.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 466-472.
- (46) Martimprey, H.; Vauthier, C.; Malvy, C.; Couvreur, P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 490-504.
- (47) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*(1), 238-252.
- (48) Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F. *Les Liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques* **1993**, Edition INSERM.
- (49) Dimitriadis, G. J. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*(8), 2697-2705.
- (50) Behr, J. P. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 5861-5864.
- (51) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7413-7417.
- (52) Shinoda, K. *Principles of Solution and Solubility*, M-Dekker Inc. **1978**, 123.
- (53) Behler, A.; Bierman, M.; Hill, K.; Rath, H. C.; Saint Victor, M. E.; Uphues, G. *Surfactant Science Series* **2001**, *100*.
- (54) Sovostianoff *Informations Chimie* **1988**, *293*, 135.
- (55) Greek, B. F. *Chemical & Engineering News* **1990**, *28*, 25.
- (56) Vaution, C. *Lavoisier* **1983**, *5*, 4.
- (57) Laughlin, R. G. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1981**, *32*, 371.
- (58) Shrestha, L. K.; Shrestha, R. G.; Aramaki, K. *J. Disp. Sci. Tech.* **2009**, *30*, 1525-1532.
- (59) Henderson, M. J.; Perriman, A. W.; Robson-Marsden, H.; White, J. W. *J. Phys. Chem.* **2005**, *109*, 20878-20886.
- (60) Nordstierna, L.; Furo, I.; Stilbs, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6704-6712.
- (61) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Far. Trans.* **1976**, *2*, 1525.
- (62) Mayot, E. *Thèse de l'université de Nancy* **2007**.
- (63) Koumbi-mounanga, T. *Thèse de l'université de Nancy* **2008**.
- (64) Dupont-Leclerc, L. *Thèse de l'université de Nancy* **2009**.
- (65) Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* **2003**.
- (66) Inoue, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*(3), 390-402.
- (67) Naoi, M.; Naoi, M.; Shimizu, T.; Malviya, A. N.; Yagi, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *471*(2), 305-310.
- (68) Deamer, D. W.; Bramhall, J. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*(2-4), 167-188.
- (69) Kissa, E. *Surfactant Science Series* **2001**, *97*.
- (70) Tandford, C. *John Wiley and Sons* **1980**.
- (71) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *470*, 185.
- (72) Riess, J. G. *Fluorine in Medicine in the 21st Century* **1994**, 1-9.
- (73) Delpuech, J. J.; Hamza, M. A.; Serratrice, G.; Stébé, M. J. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 2680.
- (74) Rossi, S.; Karlsson, G.; Ristori, S.; Martini, G.; Edwards, K. *Langmuir* **2001**, *17*(8), 2340-2345.

- (75) Davey, T. W.; Warr, G. G.; Almgren, M.; Asakawa, T. *Langmuir* **2001**, *17*(17), 5283-5287.
- (76) Riess, J. G. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4113.
- (77) Riess, J. G. *J. Fluorine Chem.* **2002**, *114*, 119.
- (78) Riess, J. G. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 259.
- (79) Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angile, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Koster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632-1639.
- (80) Hsu, C. H.; Jay, M.; Bummer, P. M.; Lehmler, H. J. *Pharm. Res* **2003**, *20*, 918.
- (81) Lehmler, H. J.; Bummer, P. M.; Jay, M. *CHEMTECH* **1999**, *29*, 7.
- (82) Riess, J. G.; Kraft, M. P. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1529-1539.
- (83) Pabon, M.; Corpart, J. M. *J. Fluorine Chem.* **2002**, *114*, 149-156.
- (84) Dams, R. J.; Vanneste, W. J. *WO Patent 97/45167* **1997**.
- (85) Gaucheron, J.; Santaella, C.; Vierling, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 349-358.
- (86) Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic acids in chemistry and biology* **1996**, Oxford University Press.
- (87) Jadhav, V. M.; Valaske, R.; Maiti, S. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 8824-8831.
- (88) Liu, Q.; Li, J.; Tao, W.; Zhu, Y.; Yao, S. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 301-307.
- (89) Qian, L.; Jia, L.; Wenyan, T.; Yandan, Z.; Shouzhuo, T. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 301-307.
- (90) Rosa, M.; Dias, R.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Biomacromol.* **2005**, *6*, 2164.
- (91) Senthil Kumar, R.; Arunachalam, S.; Periasamy, V. S.; Preethy, C. P.; Riyasdeen, A.; Akbarsha, M. A. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 117-127.
- (92) Pattarkine, M. V.; Ganesh, K. N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 41.
- (93) Bonincontro, A.; Marchetti, S.; Onoti, G.; Rosati, A. *Chem. Phys.* **2004**, *312*, 55.
- (94) McLoughlin, D.; Delsanti, D.; Tribet, C.; Langevin, D. *Europhys. Lett.* **2005**, *69*(3), 461.
- (95) McLoughlin, D.; Langevin, D. *Colloids Surf.* **2004**, *250*, 79.
- (96) Mel'nikov, S. M.; Sergeev, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9951.
- (97) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V.; Goulko, A. A. *Langmuir* **2002**, *18*, 10348.
- (98) Spink, C. H.; Chaires, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10920.
- (99) Rudiuk, S. *Thèse de l'université de Toulouse* **2009**.
- (100) Antunes, F. E.; Marques, E. F.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 18-35.
- (101) Rosa, M.; D., M. M.; Lindman, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *312*, 87.
- (102) Mel'nikov, S. M.; Dias, R.; Mel'nikova, Y. S.; Marques, E. F.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *FEBS Letters* **1999**, *453*, 113.
- (103) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1323*, 29-44.
- (104) N'soukpoé-Kossi, C. N.; Ahmed Ouameur, A.; Thomas, T.; Shirahatan, A.; Thomas, T. J.; Tajmir-Riahi, H. A. *Biomacromol.* **2008**, *9*, 2712-2718.
- (105) Dias, R. S.; Magno, L. M.; Valente, A. J. M.; Das, D.; Das, P. K.; Maiti, S.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 14446-14452.
- (106) Bhat, I. U. H.; Tabassum, S. *Spectrochim Acta A* **2009**, *72*, 1026-1033.
- (107) Tarushi, A.; Psomas, G.; Raptopoulou, C. P.; Kessissoglou, D. P. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 898-905.
- (108) Sharma, K. S.; Durand, G.; Giusti, F.; Olivier, B.; Fabiano, A. S.; Bazzacco, P.; Dahmane, T.; Ebel, C.; Popot, J. L.; Pucci, B. *Langmuir* **2008**, *24*, 13581-13590.
- (109) Soussan, E.; Mille, C.; Blanzat, M.; Bordat, P.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2008**, *24*(6), DOI: 10.1021/la702171s.
- (110) Mc Gregor, C.; Perrin, C.; Monck, M.; Camilleri, P.; Kirby, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*(26), 6215-6220.
- (111) Jadhav, V.; Maiti, S.; Dasgupta, A.; Kumar Das, P.; Dias, R.; Miguel, M. G.; Lindman, B. *Biomacromol.* **2008**, *9*, 1852-1859.
- (112) Mével, M.; Montier, T.; Lamarche, F.; Delépine, P.; Le Gall, T.; Yaouanc, J. J.; Jaffrès, P. A.; Cartier, D.; Lehn, P.; Clement, J. C. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1604-1611.

- (113) Van Der Woude, I.; Wagenaar, A.; Meekel, A. A. P.; Ter Beest, M. B. A.; Ruiters, M. H. J.; Engberts, J. B. F. N.; Hoekstra, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 1160-1165.
- (114) Bekkara-Aounallah, F.; Gref, R.; Othman, M.; Harivardhan Reddy, L.; Pili, B.; Allain, V.; Bourgaux, C.; Hillaireau, H.; Lepe[^]tre-Mouelhi, S.; Desmae[^]le, D.; Nicolas, J.; Chafi, N.; Couvreur, P. *Adv. Func. Mat.* **2008**, *18*, 3715-3725.
- (115) Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Desmaele, D.; Gulik, A.; Dedieu, J. C.; Demoy, M.; d'Angelo, J.; P., C. *Pharm. Res* **1998**, *15*, 550-556.
- (116) Fenske, D. B.; MacLachlan, I.; Cullis, P. R. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, *3*, 153-158.
- (117) Song, L. Y.; Ahkong, Q. F.; Rong, Q. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1558*, 1-13.
- (118) Ambegia, E.; Ansell, S.; Cullis, P. R.; Heyes, J.; Palmer, L.; MacLachlan, I. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1669*, 155-163.
- (119) Ross, P. C.; Hui, S. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 273-283.
- (120) Choi, J. H.; Choi, J. S.; Suh, H.; Park, J. S. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2001**, *22*, 46-52.
- (121) Sung, S. J.; Min, S. H.; Cho, K. Y.; Lee, S.; Min, Y. J.; Yeom, Y. I.; Park, J. K. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 492-500.
- (122) Liu, Y. C.; Le Ny, A. L. M.; Schmidt, J.; Talmon, Y.; Chmelka, B. F.; Lee, C. T. *Langmuir* **2009**, *25*(10), 5713-5724.
- (123) Koynova, R.; Tenchov, B.; Wang, L.; MacDonald, R. C. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, DOI: 10.1021/mp8002573.
- (124) Ghonaim, H. M.; Li, S.; Blagbrough, I. S. *Pharm. Res* **2009**, *26*(1), DOI: 10.1007/s11095-11008-19705-11091.
- (125) Kraft, M. P.; Riess, J. G. *Biochimie* **1998**, *80*, 489.
- (126) Bombelli, C.; Faggioli, F.; Luciani, P.; Mancini, G.; Grazia Sacco, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5378-5382.
- (127) Kirby, A. J.; Camilleri, P.; Engberts, J. B. F. N.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; S[^]derman, O.; Bergsma, M.; Bell, P. C.; Fielden, M. L.; Garcia Rodriguez, C. L.; Gu[^]dat, P.; Kremer, A.; McGregor, C.; Perrin, C.; Ronsin, G.; van Eijk, M. C. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1448-1457.
- (128) Brunelle, M.; Polidori, A.; Denoyelle, S.; Fabiano, A. S.; Vuillaume, P. Y.; Laurent-Lewandowski, S.; Pucci, B. C. *R. Chimie* **2009**, *12*, 188-208.
- (129) Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100-109.
- (130) Pinnaduwege, P.; Schmitt, L.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *985*, 33-37.
- (131) Woodle, M. C.; Lasic, D. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 171.
- (132) Needham, D.; Mcintosh, T. J.; Lasic, D. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 40.
- (133) Woodle, M. C.; Engbers, C. M.; Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 493.
- (134) Shukla, D.; Tyagi, V. K. *J. Oleo. Sci* **2006**, *55*(8), 381-390.
- (135) Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248*, 203.
- (136) Menger, F. M.; Littau, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10083-10090.
- (137) Comminellis, C.; Javet, P.; Platterner, E. *J. Appl. Electrochem* **1974**, *4*, 287.
- (138) Bryce, H. G.; Reed, T. M.; Simons, J. H.; Wethington, J. A. *Fluorine Chemistry* **1964**, Ed Simons, New York, 442.
- (139) Graham, D. P. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 955.
- (140) Rozen, S. *Synthetic Fluorine Chemistry* **1992**, Ed Olah, Chambers, Prakash, John Wiley and Sons, Inc, 145.
- (141) Achilefu, S.; Mansuy, L.; Selve, C. *J. Fluorine Chem.* **1995**, *70*, 19.
- (142) Thiebaut, S.; G[^]ardin, C.; Amos, J.; Selve, C. *J. Fluorine Chem.* **1995**, *73*, 179-184.
- (143) Thiebaut, S.; G[^]ardin-Charbonnier, C.; Selve, C. *J. Fluorine Chem.* **1997**, *82*, 131-138.
- (144) Cosgun, S.; G[^]ardin-Charbonnier, C.; Amos, J.; Selve, C. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 55-61.
- (145) Michael, A. *J. Prakt. Chem.* **1887**, *36*, 349.
- (146) Cole, D. C. *Tetrahedron* **1994**, *50*(32), 9528.
- (147) Dynarowicz-Latka, P.; Dhanabalan, A.; Oliveira Jr, O. N. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91*, 221-293.

- (148) Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*, 1848.
- (149) Blodgett, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1007.
- (150) Blodgett, K. B.; Langmuir, I. *Phys. Rev.* **1937**, *51*, 967.
- (151) Stine, K. J.; Stratmann, D. T. *Langmuir* **1992**, *8*, 2509.
- (152) Erokhina, S.; Berzina, T.; Cristofolini, L.; Konovalov, O.; Erokhin, V.; Fontana, M. P. *Langmuir* **2007**, *23*, 4414-4420.
- (153) Cardenas, M.; Nylander, T.; Jonsson, B.; Lindman, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *286*, 166-175.
- (154) Wang, X.; Wang, J.; Wang, Y.; Yan, H.; Li, P.; Thomas, R. K. *Langmuir* **2004**, *20*, 53-56.
- (155) Thiébaud, S. *Thèse de l'université de Nancy* **1995**.
- (156) Wilhelmy, L. *Ann. Phys.* **1863**, *119*, 177.
- (157) Gibbs, J. W. *Collected Works, Longman, New York* **1960**, *64*, 1643.
- (158) Melzer, V.; Vollhardt, D.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 591.
- (159) Rogalska, E.; Bilewicz, R.; Brigaud, T. *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *105*, 71.
- (160) Pencer, J.; Hallett, F. R. *Langmuir* **2003**, *19*, 7488-7497.
- (161) Beney, L.; Linares, E.; Ferret, E.; Gervais, P. *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 567.
- (162) Pencer, J.; White, G.; Hallett, F. R. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2716.
- (163) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics* **2000**.
- (164) Kerker, M. *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation* **1969**, Academic Press.
- (165) Chu, B. *Laser Light scattering: Basic Principles and Practice, 2nd Edition* **1992**, Academic Press.
- (166) Colliex, C. *La Microscopie Électronique* **1998**, Presses universitaires de France.
- (167) Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J. *J. Fluorine Chem.* **2001**, *107*, 337.
- (168) Riess, J. G. *Tetrahedron Letters* **2002**, *58*, 4113.
- (169) Pasc-Banu, A.; Blanzat, M.; Belloni, M.; Perez, E.; Mingotaud, C.; Rico-Lattes, I.; Labrot, T.; Oda, R. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 33-38.
- (170) Strnadová, H.; Kvótek, L. *Chemické Listy* **2009**, *103*, 315-319.
- (171) Kaleem Baloch, M.; Ahmad, F.; Rauf, A.; Durrani, G. F. *J. Applied Polym. Sci.* **2009**, *144*, 1444-1448.
- (172) Pornsunthorntawe, O.; Chavadej, S.; Rujiravanit, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *72*, 6-15.
- (173) Rosa, M.; Penacho, N.; Simoes, S.; Lima, M. C. P.; Lindman, B.; Miguel, M. G. *Mol. Membrane Biol.* **2008**, *25*, 23-34.
- (174) Woody, R. W. *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 34-71.
- (175) Tunis-Schneider, M. J.; Maestre, M. F. *J. Mol. Biol.* **1970**, *52*, 521-541.
- (176) Pohl, F. M.; Jovin, T. M. *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 375-396.
- (177) Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713-1725.
- (178) Garab, G.; Van Amerongen, H. *Photosynth. Res.* **2009**, DOI: 10.1007/s11120-11009-19424-11124.
- (179) Uma Maheswari, P.; Palaniandavar, M. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 219-230.
- (180) Ivanov, V. F.; Minchenkova, L. E.; Schyolkina, A. K.; Poletayer, A. I. *Biopolymers* **1973**, *12*, 89.
- (181) Lincoln, P.; Tuite, E.; Norden, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1454.
- (182) Shahabadi, N.; Kashanian, S.; Purfoulad, M. *Spectrochim Acta A* **2009**, *72*, 757-761.
- (183) Geall, A. J.; Blagbrough, I. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 849-859.
- (184) Zhiryakova, M. V.; Izumrudov, V. A. *Polym. Sci. series A* **2007**, *49*, 1290-1301.
- (185) Lepecq, J. B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87-106.
- (186) Baguley, B. C.; Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Cain, B. F. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 170-177.
- (187) Boger, D. L.; Fink, B. E.; Brunette, S. R.; Tse, W. C.; Hedrick, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5878-5891.
- (188) Labieniec, M.; Gabryelak, T. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2006**, *82*, 72-78.
- (189) Jia, T.; Jiang, Z. X.; Wang, K.; Li, Z. Y. *Biophys. Chem.* **2006**, *119*, 295-302.

- (190) Tikchonenko, T. I.; Glushakova, S. E.; Kislina, O. S.; Grodnitskaya, N. A.; Manykin, A. A.; Naroditsky, B. S. *Gene* **1988**, *63*, 321-330.
- (191) Basu, H. S.; Schwietert, H. C. A.; Feuerstein, B. G.; Marton, L. J. *Biochem. J.* **1990**, *269*, 329-334.

RESUME

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur la synthèse et la caractérisation des propriétés physico-chimique de tensioactifs fluorocarbonés originaux permettant d'obtenir des nanovecteurs modèles afin de déterminer les qualités requises pour un transporteur d'oligonucléotides efficace dans le domaine de l'interférence ARN.

En nous appuyant sur les nombreux travaux relevés dans la littérature et sur l'expertise du laboratoire dans le domaine des amphiphiles fluorés, nous nous sommes intéressés à la synthèse de deux grandes familles de composés. Une, correspond à des composés de type géminis comportant deux chaînes fluorocarbonées, deux têtes polaires dérivées d'acides carboxyliques et un bras espaceur oxyéthylénique ou polyaminé. La structure de ces composés est propice à la formation de films de Langmuir stables ce qui permet d'étudier les interactions avec l'oligonucléotide.

La deuxième famille correspond aux homologues monocaténares qui forment, eux, spontanément des vésicules, c'est-à-dire des nanovecteurs modèles en 3D.

La caractérisation du comportement à l'interface air/eau ou dans l'eau de ces différentes molécules en présence et en l'absence d'oligonucléotide nous ont permis d'établir un certain nombre de relations entre la structure des molécules, les propriétés physico-chimiques et la complexation de l'oligonucléotide.

Des tests préliminaires de viabilité cellulaire ont été effectués sur des cellules issues de poumon humain et montrent une bonne viabilité cellulaire pour des concentrations d'utilisation clinique classiques et une bonne stabilité dans le temps.

Ces travaux laissent entrevoir un bon potentiel de vectorisation pour ces tensioactifs fluorés mais cela nécessite encore des études complémentaires comme la caractérisation complète des complexes formés avec l'ADN ainsi que des tests de toxicité cellulaire avant les essais de transfection.

Mots clés : Tensioactifs fluorocarbonés, vecteurs synthétiques, lipoplexes, interférence ARN, monocouches de Langmuir, vésicules