

N° ORDRE : 3469

**THESE DE DOCTORAT**

PRESENTEE A

**L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Carole AIME**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE : CHIMIE-PHYSIQUE

\*\*\*\*\*

**Auto-Assemblages Chiraux d'Amphiphiles Cationiques :  
Etude de la spécificité du contre anion à travers la formation  
d'hélices nano et micrométriques par confinement de tartrate et  
de nucléotides**

\*\*\*\*\*

Soutenue le 15 novembre 2007.

**Après avis de :**

M.	P. BARTHELEMY	Professeur, Université de Bordeaux II	Rapporteur
M.	J.H. van ESCH	Professeur, Université de Delft	Rapporteur

**Devant la commission d'examen formée de :**

M.	P. BARTHELEMY	Professeur, Université de Bordeaux II	Rapporteur
M.	J.H. van ESCH	Professeur, Université de Delft	Rapporteur
M.	S. LECOMMANDOUX	Professeur, Université de Bordeaux I	Examineur
M.	T. BUFFETEAU	Directeur de Recherche, CNRS	Examineur
M.	C. BERGAUD	Chargé de Recherche, CNRS	Examineur
Mme	R. ODA	Chargée de Recherche, CNRS	Directrice de thèse

## **- Remerciements -**

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Européen de Chimie et Biologie, à Pessac. Je tiens à remercier Messieurs Jean-Jacques Toulmé, Léon Ghosez et Erick Dufourc, codirecteurs de l'institut et directeur de l'UMR, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Merci à Messieurs Jan van Esch et Philippe Barthélémy d'avoir pris le temps de juger mon manuscrit en tant que rapporteurs ainsi qu'à Sébastien Lecommandoux d'avoir accepté de présider le jury. Merci également à Messieurs Christian Bergaud et Thierry Buffeteau d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Reiko Oda pour avoir dirigé cette thèse. Ces années passées à tes côtés ont été particulièrement enrichissantes tant d'un point de vue professionnel que personnel. Merci pour tout ce que tu m'as appris, et merci de m'avoir ouvert les portes du monde auto-assemblé. Travailler à tes côtés a été un véritable plaisir. Merci tout d'abord pour ta disponibilité, ton enthousiasme et nos nombreuses discussions scientifiques. Merci pour ta confiance, dès le départ, et pour avoir accepté de me former à la physico-chimie. Merci pour ta patience. Merci également pour la liberté que tu m'as offerte pour mener mes recherches. Merci de m'avoir donné la possibilité de développer de très nombreuses et diverses collaborations. Je tiens également d'un point de vue personnel, à te remercier pour les nombreuses discussions que nous avons eues, toujours aussi enrichissantes et diversifiées, de la politique (CPE et élections présidentielles ayant ponctué ces trois années de thèses !), au cinéma de Georges Lucas. Merci enfin pour ces moments partagés en dehors du laboratoire, et merci d'avoir facilité l'ouverture au Japon. Rendez-vous désormais à Tokyo, Kyoto ou Fukuoka...

Ce travail a également été rendu possible grâce au développement de nombreuses collaborations. J'ai été très heureuse de travailler avec ces nombreuses personnes que je tiens à remercier tout particulièrement. Je remercie Jean-Marie Schmitter et son équipe pour m'avoir ouvert les portes de la spectrométrie de masse. En particulier, je tiens à remercier

Benoît Plet pour sa très grande patience et sa pédagogie tout aussi importante. Merci pour ces nombreuses heures passées à m'expliquer à quoi correspondait (et surtout à quoi ne correspondait pas) cette fameuse énergie de collision ! Merci d'avoir consacré tant de temps à torturer ces petits gemini. Ca n'a pas toujours été facile, mais nous y sommes arrivés ensemble. Merci pour tout, même pour nos discussions et avis divergents ( ?) sur le CPE et la propagande sarkozyste (décidément !). Merci également à Larry Romsted et Ron Sauers pour les innombrables échanges outre-Atlantique que nous avons eus.

Le travail concernant les gemini tartrate m'a également permis de participer à de nombreuses collaborations. Je tiens tout d'abord à remercier Thomas Delclos, Marie-Hélène Delville et Ivan Huc, ainsi que Fabienne Gauffre-Guirardel et Christophe Mingotaud. Je remercie particulièrement Christian Bergaud pour avoir bien voulu se pencher sur ces systèmes, et pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire. Merci également à Thierry Buffeteau pour les études en infrarouge sur les hélices nucléo-amphiphiles, à Damien van Effenterre pour nous avoir fait découvrir un autre visage de ces objets et à Axelle Grélard et Erick Dufourc pour m'avoir ouvert les portes de la RMN. Un remerciement tout particulier à toi Axelle, pour ta disponibilité sans faille et ton enthousiasme face à des spectres pas toujours très engageants ! Allez, je suis sûre que mes patates te manqueront... Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et les news du CarpeDiem. Merci également à Fred pour nos discussions toujours bien accompagnées, de Reiko bien sûr, mais également de cannelés, crumble, et café ! Un grand merci tout particulier à Ju, d'un point de vue boulot et soutien informatique (au combien important) mais aussi perso, discussions politiques, resto, et whisky notamment (ce n'est pas parce que je ne finis pas toujours la soirée que je ne m'en souviens pas !). Merci pour tout et à très bientôt. Merci enfin à Elisabeth Sellier pour les clichés de MEB, et à Joséphine Lai Kee Him pour m'avoir formée à la MET.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe, les anciens, les présents et les membres de passage. Je pense en particulier aux geminettes (Thomas L., désolée, mais je me vois dans l'obligation de te mettre dans cette catégorie !). Merci à Aurélie et Sabine pour tout, et même si je vous dois beaucoup en ce qui concerne les formations et soutiens divers et variés au sein du laboratoire, je vous remercie particulièrement pour tout ce que vous m'avez apporté en dehors du laboratoire. Je mesure la chance que j'ai eue de vous rencontrer au cours de ma thèse. Merci à toutes les deux pour vos récits de rêves hallucinants et vos fantasmes microscopiques... ! Aurélie, merci pour tous les moments partagés. Merci pour ton honnêteté, ta joie de vivre, ton humour et ta capacité à remonter le moral ! Je sais bien que le Japon n'est

pas la porte à côté, mais j'espère que nous aurons l'opportunité d'y découvrir les activités nocturnes ensemble... je me rancarde sur les expos morbides et je te fais signe ! Merci à toi Sabine pour ce que tu es. Merci de m'avoir aussi bien comprise, presque comme personne, sur de nombreux aspects. Merci pour ton soutien sans faille dans les moments difficiles. J'espère que les 400 ans du Québec n'empêcheront pas ta venue au pays du Soleil Levant. A très bientôt de toute façon, où que ce soit, j'ai confiance en nous. Merci également aux autres membres de l'équipe et en particulier à Wissam, dont j'ai eu la chance de ne partager le bureau de rédaction que deux ou trois semaines (...ooohhhh allez, t'aurais pas aimé que je sois trop sympa non plus !). Merci d'être si différent de moi et d'être si ouvert. J'ai appris énormément grâce à toi. Ta présence à mes côtés pendant ces années restera inoubliable. Merci à Roni, dont le courage et la persévérance sont à mes yeux exemplaires, je garde en mémoire ton invitation en Indonésie ! Merci enfin à Rumi de m'avoir appris les dix premiers mots de japonais. Bon courage à vous deux pour la suite.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de l'IECB qui font de ce laboratoire un endroit particulièrement chaleureux. Merci tout d'abord aux anciens, Jo, Cécile, Thomas D., Nada... sans oublier le polémique Michael, heureux dans le vote blanc et la contradiction, merci pour nos nombreuses prises de tête !! Merci à tous les RMNistes, aux cristallographes, en particulier à Mister Tea (prends bien soin de ma plante, c'est un héritage d'Aurélie !) et à tous les chimistes du second. Un merci particulier à Marisa, Benoît et bien sûr à l'incontournable Céline, pour tous les moments partagés. Merci pour ton accueil (votre accueil) et rendez-vous (en famille) au Japon (il a presque dit oui !!). Merci à Stéphanie, Sandra et en particulier à Annie pour ta patience et ton humour.

Je tiens enfin à adresser mes plus profonds remerciements à toute ma famille pour leur confiance et leur soutien. Mes parents et mon frère pour être toujours présents, pour leur disponibilité hallucinante (de jour comme de nuit) et leur soutien dans les moments difficiles. Merci à Michel et Nicole, pour tout ce qu'ils m'ont apporté et en particulier pour ce que personne d'autre n'aurait pu m'apporter, Thomas, Sarah et les Schtroumpfs, Pierre, mes grand-mères. Je remercie particulièrement les courageu(x)ses de ma soutenance, et à leur tête Marianne, Sarah, Jenny et David. Merci pour votre présence à mes côtés dans toutes les situations. Un merci particulier à Jenny, une jumelle pas comme les autres (pour sûr !) merci pour tout, et surtout de comprendre sans les mots. Enfin, je remercie les Pruneaux, et le petit dernier d'un remerciement tout particulier.

## **- Sommaire -**

**Liste des abréviations**

**Introduction générale** **p 1**

### **Chapitre 1 : Etude bibliographique d'auto-assemblages amphiphiles. Effet de contre ion**

**1. Introduction** **p 7**

**2. Comportement d'agrégation d'amphiphiles chargés en solution** **p 9**

**2.1. Transitions de phases et micellisation** **p 9**

**2.2. Influence des paramètres structuraux** **p 10**

        2.2.1. Effet de la partie hydrophobe

        2.2.2. Effet de la tête polaire

        2.2.3. Effet du contre ion

**3. Spécificité ionique dans les systèmes amphiphiles chargés** **p 11**

**3.1. Etude de la micellisation** **p 12**

        3.1.1. Détermination de la cmc par conductimétrie

        3.1.2. Détermination de la cmc par colorimétrie

**3.2. Détermination de la concentration ionique interfaciale** **p 14**

**4. Les gemini, une classe particulière d'amphiphiles** **p 15**

**4.1. Diversité structurale des gemini** **p 15**

**4.2. Gemini développés dans notre groupe : travaux antérieurs** **p 16**

**5. Diversité de morphologies d'auto-assemblage** **p 19**

**5.1. Molécules amphiphiles monocaténares** **p 21**

**5.2. Molécules possédant deux têtes hydrophiles** **p 22**

<b>6. Morphologies chirales</b>	<b>p 23</b>
<b>6.1. Transfert de chiralité et diversité de morphologies</b>	p 23
6.1.1. Rubans torsadés et hélicoïdaux	
6.1.2. Tubules	
<b>6.2. Contrôle des morphologies</b>	p 26
6.2.1. Variation des paramètres expérimentaux	
6.2.2. Variation de la structure moléculaire	

<b>7. Conclusion</b>	<b>p 29</b>
----------------------	-------------

<b>Références</b>	<b>p 30</b>
-------------------	-------------

## **Chapitre 2 : Etude de complexes gemini – contre ions en phase gaz**

<b>1. Introduction</b>	<b>p 35</b>
------------------------	-------------

<b>2. Matériel et méthode</b>	<b>p 37</b>
-------------------------------	-------------

<b>2.1. Spectrométrie de masse et résolution en énergie</b>	p 37
---	------

        2.1.1. Ionisation par électronébulisation et piège ionique

        2.1.2. Principe de l'expérience

        2.1.3. Spectrométrie de masse résolue en énergie

<b>2.2. Traitement des données</b>	p 42
------------------------------------	------

<b>3. Etude d'amphiphiles géminés en phase gaz</b>	<b>p 42</b>
--	-------------

<b>3.1. Fragmentation d'un gemini</b>	p 42
---------------------------------------	------

<b>3.2. Compétition entre substitution nucléophile et élimination</b>	p 45
---	------

        3.2.1. E2 / S<sub>N</sub>2, en fonction du contre ion complexé

        3.2.2. E2 / S<sub>N</sub>2, en fonction de la longueur de l'espaceur

<b>3.3. Energie de fragmentation du précurseur M<sup>2+</sup>X<sup>-</sup></b>	p 47
--	------

<b>3.4. Calculs <i>ab initio</i></b>	p 50
--------------------------------------	------

        3.4.1. Complexation et fragmentation

        3.4.2. Substitution nucléophile et élimination

<b>3.5. Confrontation des données</b>	<b>p 54</b>
3.5.1. Effet de la longueur de l'espaceur	
3.5.2. Effet de la nature du contre ion	
<b>4. Conclusion</b>	<b>p 59</b>
<b>5. Partie expérimentale</b>	<b>p 61</b>
<b>Annexe</b>	<b>p 64</b>
<b>Références</b>	<b>p 67</b>

## **Chapitre 3 : Contrôle des morphologies d'auto-assemblage de gemini tartrate**

<b>1. Introduction</b>	<b>p 71</b>
<b>2. Contrôle des morphologies. Travaux antérieurs</b>	<b>p 73</b>
2.1. Contrôle des morphologies en fonction du temps	p 73
2.2. Contrôle des morphologies en fonction de la température	p 74
2.3. Contrôle des morphologies en fonction de la présence d'additifs	p 74
2.4. Contrôle des morphologies en fonction de l'excès énantiomérique	p 75
2.4.1. Contrôle des morphologies des rubans	
2.4.2. Contrôle des dimensions des rubans	
2.5. Contrôle du diamètre des tubes en fonction de la structure du gemini	p 79
<b>3. Cinétique de formation des tubes</b>	<b>p 80</b>
3.1. Excès énantiomérique 0,8	p 80
3.2. Excès énantiomérique 1	p 81
<b>4. Réplication inorganique</b>	<b>p 83</b>
4.1. Méthode de réplication	p 83
4.1.1. Polymérisation de la silice	

4.1.2. Optimisation des conditions de réplication	
<b>4.2. D'une diversité de morphologies à l'autre</b>	<b>p 89</b>
4.2.1. Effet du vieillissement du gel	
4.2.2. Effet de la concentration du gel organique	
4.2.3. Variation de la stoechiométrie du système et excès énantiomérique	
4.2.4. Effet de la température	
4.2.5. Dimensions et structure des tubes	
<b>5. Conclusion et Perspectives</b>	<b>p 98</b>
<b>6. Partie expérimentale</b>	<b>p 101</b>
<b>Références</b>	<b>p 102</b>

## **Chapitre 4 : Etude bibliographique d'auto-assemblages bio-amphiphiles**

<b>1. Introduction</b>	<b>p 105</b>
<b>2. Reconnaissance moléculaire au sein des acides nucléiques</b>	<b>p 108</b>
2.1. Rappels de nomenclature	p 108
2.2. Propriétés physiques des nucléotides	p 109
2.2.1. Moments dipolaires	
2.2.2. pKa	
2.2.3. Interactions entre bases nucléiques	
2.2.4. Cas particulier de la guanosine	
2.2.5. Synthèse d'analogues	
<b>3. Conception d'auto-assemblages</b>	<b>p 114</b>
3.1. A partir de nucléotides	p 114
3.2. Fonctionnalisation	p 116
3.3. A partir de nucléo-amphiphiles	p 117
3.3.1. Reconnaissance moléculaire	

### 3.3.2.Morphologies

**4. Conclusion** p 129

**Références** p 130

## **Chapitre 5 : Etude de nucléo-amphiphiles en solution**

**1. Introduction** p 135

**2. Amphiphiles monocationiques : étude des nucléolipides C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP** p 137

**2.1. Etude des interactions intermoléculaires en solution** p 138

2.1.1. Etude par conductimétrie

2.1.2. Etude par colorimétrie

**2.2. Etude des interactions intermoléculaires à l'interface air-eau** p 141

2.2.1. Principe de l'expérience

2.2.2. Résultats

**2.3. Etude morphologique** p 145

2.3.1. Précipitation des nucléo-amphiphiles dans l'eau

2.3.2. Précipitation des nucléo-amphiphiles en présence de nucléosides

**2.4. Etude des interactions intermoléculaires par RMN** p 151

**3. Etude cinétique du transfert de chiralité** p 156

**3.1. Etude morphologique** p 157

**3.2. Structure moléculaire et cinétique de formation des hélices** p 158

3.2.1. Etude par RMN

3.2.2. Etude par spectroscopie infrarouge

**3.3. Contrôle cinétique de la formation des hélices** p 165

**4. Micromanipulation d'hélices nucléo-amphiphiles** p 166

**4.1. Les mesures de forces en biologie** p 166

**4.2. Matériel et méthode** p 167

4.2.1. Montage expérimental	
4.2.2. Fabrication des micropipettes	
<b>4.3. Résultats</b>	<b>p 168</b>
<b>5. Conclusion et perspectives</b>	<b>p 171</b>
<b>6. Partie expérimentale</b>	<b>p 180</b>
<b>Annexe 1.</b> Etude de gemini complexés à des nucléotides monomériques	<b>p 183</b>
<b>Annexe 2.</b> Mesures des pH de différents échantillons de nucléo-amphiphiles	<b>p 192</b>
<b>Annexe 3.</b> Fabrication de micropipettes	<b>p 193</b>
<b>Références</b>	<b>p194</b>
<b>Conclusions générales</b>	<b>p 195</b>

## - *Abréviations* -

**A** : Adénosine

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**C** : Cytidine

**cac** : Concentration d'Agrégation Critique

**cmc** : Concentration Micellaire Critique

**C<sub>n</sub>NMP** : tensioactif constitué d'une tête ammonium quaternaire substituée par deux chaînes aliphatiques à *n* carbones, et complexé à un Nucléotide MonoPhosphate

**DFT** : Density Functional Theory

**ee** : excès énantiomérique

**E2** : Elimination de type 2

**G** : Guanosine

**IR**: InfraRouge

**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage

**MET** : Microscopie Electronique en Transmission

**MFA** : Microscopie de Force Atomique

**NMP** : Nucléoside MonoPhosphate

**n-2-n** : gemini doté d'un espaceur éthylénique, chaque tête ammonium étant substituée par une chaîne hydrophobe à *n* carbones

**PNA** : Protein Nucleic Acid

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**SAXS** : Small Angle X-Ray Scattering

**SM** : Spectrométrie de Masse

**SMRE** : Spectrométrie de Masse Résolue en Energie

**SM2** : Spectrométrie de Masse en tandem

**S<sub>N</sub>2** : Substitution Nucléophile de type 2

**T<sub>k</sub>** : Température de Krafft

**U** : Uridine



## **- Introduction générale -**

Le monde biologique est organisé autour d'édifices de structures et fonctions parfaitement définies. Ces architectures supramoléculaires résultent pour la plupart de l'association non covalente de composants de natures variées, capables de reconnaissance. Ces interactions permettent une communication entre partenaires de choix et définissent la fonction propre de ces biomolécules. Parmi les innombrables édifices façonnés par la nature, nombreux sont ceux qui expriment une chiralité macroscopique. Cette chiralité résulte le plus souvent de l'auto-assemblage d'entités possédant une chiralité à l'échelle moléculaire. Ce phénomène est illustré par la structure d'édifices assurant l'intégrité du matériel biologique. Les protéines présentent différentes structures secondaires parmi lesquelles nous citerons l'hélice  $\alpha$ . Dans cet exemple, la chaîne peptidique est maintenue dans une configuration hélicoïdale par des liaisons hydrogène intra chaînes. Un autre exemple de biomolécule auto-organisée de façon chirale est apporté par la double hélice d'ADN. La formation de ces assemblages complexes est d'autant plus remarquable que le nombre de briques élémentaires impliquées est réduit. En effet, ces édifices sont élaborés respectivement à partir de vingt acides aminés et de quatre bases nucléiques. Dans le but de mimer ces systèmes biologiques, l'homme n'a de cesse d'élaborer de nouvelles structures supramoléculaires à partir de motifs élémentaires extrêmement diversifiés.

Dans ce contexte, l'approche que nous avons choisi de développer repose sur l'utilisation de motifs lipidiques. Les lipides sont un élément central de l'organisation biologique. Leurs fonctions résultent notamment de leur propriété à s'organiser de façon spontanée en architectures présentant une diversité structurale importante. La membrane cellulaire illustre le lien étroit entre auto-organisation, structure supramoléculaire et fonction. Ainsi, les lipides constituent des briques élémentaires particulièrement attractives dans le domaine des auto-assemblages. Les lipides sont ainsi apparus comme des candidats de choix pour la conception de systèmes synthétiques doués de propriétés d'auto-assemblage permettant la formation d'édifices chiraux. La stratégie développée au sein de notre équipe présente la singularité de fonctionnaliser ces lipides par l'association non covalente de petites

molécules chirales. Ces systèmes lipidiques chargés seront ainsi complexés à des ions chiraux de différentes natures.

Ce projet fait également appel à un deuxième aspect essentiel aux auto-assemblages biologiques et à la reconnaissance moléculaire. Il s'agit des effets spécifiques d'ions. Les ions sont porteurs d'une information particulièrement riche et complexe du fait de leurs multiples propriétés, tant d'un point de vue moléculaire (charge, taille, forme, structure) que d'un point de vue supramoléculaire (liaison, force et sélectivité). De nombreux événements biologiques sont rythmés de façon spécifique par la présence d'ions ; les processus de régulation, de reconnaissance et de transports transmembranaires en sont quelques exemples.

La première partie de ce manuscrit présente une étude bibliographique illustrant ces deux aspects. Les propriétés des lipides à s'auto-organiser et l'importance des effets ioniques dans le contexte des auto-assemblages lipidiques seront ainsi développées.

L'objectif de mon travail de thèse consiste principalement à étudier les relations entre les propriétés des composants moléculaires (structure des lipides et nature des ions mis en jeu) et les propriétés supramoléculaires de leurs auto-assemblages. Dans le but de comprendre la contribution de la spécificité ionique dans de tels phénomènes, le chapitre 2 présentera l'étude des interactions lipides – ions. Cette étude a été réalisée en phase gaz, par spectrométrie de masse. Cette approche a été choisie afin d'étudier spécifiquement les contributions électrostatiques de ces interactions.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons davantage à l'aspect morphologique des édifices supramoléculaires ainsi qu'au contrôle de ces morphologies d'auto-assemblage. Le système présenté dans le chapitre 3 consiste en l'utilisation de lipides dicationiques complexés à des contre anions chiraux tartrate. L'auto-assemblage de ces lipides fonctionnalisés permet la formation de structures chirales. Développé depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire, ce système lipidique présente des propriétés d'auto-organisation remarquables offrant une diversité de morphologies importante. Des structures torsadées, hélicoïdales et tubulaires ont pu être obtenues. De plus, les études développées depuis une dizaine d'années au sein de notre groupe ont permis d'élaborer différentes approches pour le contrôle des transitions de morphologies. A la suite de ces résultats, mon travail a consisté à caractériser précisément les variations des dimensions des différentes structures accessibles. Le chapitre 3 se concentre en particulier sur la cinétique de formation

de rubans tubulaires. Nous présenterons également les applications potentielles de tels systèmes, et les axes que nous avons développés, notamment dans le domaine des matériaux, à travers la réplication inorganique.

Enfin, dans le but de concevoir de nouvelles architectures supramoléculaires dotées de propriétés structurales et fonctionnelles déterminées, nous aborderons dans les deux derniers chapitres le biomimétisme et la fonctionnalisation. Le travail bibliographique présenté au chapitre 4 décrit quelques exemples d'utilisation de molécules biologiques pour la conception de systèmes supramoléculaires fonctionnels synthétiques. Nous nous intéresserons aux nucléotides, unités structurales des acides nucléiques naturels, responsables de la formation de la double hélice d'ADN. Au sein de cette structure, les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires sont en partie responsables du maintien des deux chaînes dans une configuration hélicoïdale. Cette structure met en jeu reconnaissance et coopérativité et représente un système modèle dans le domaine des auto-assemblages.

Dans ce cadre, nous avons choisi de fonctionnaliser nos lipides par association avec des nucléotides, et ainsi de nous inscrire dans le domaine des biomatériaux. Le chapitre 5 présentera les phénomènes d'auto-assemblages de nucléo-amphiphiles. Ce projet a pour objectif de mimer les systèmes biologiques, en tirant profit à la fois des propriétés structurales et fonctionnelles de ces biomolécules. Nous nous concentrerons sur les propriétés d'auto-organisation observées dans le contexte biologique, pour la conception de nouvelles architectures synthétiques chirales. Nous étudierons également les propriétés de reconnaissance moléculaire au sein de nos systèmes. Cette étude consiste à faire intervenir de façon systématique chacune des bases nucléiques présentes au sein de la double hélice d'ADN. Ainsi, le chapitre 5 présentera l'étude de ces systèmes du point de vue des interactions intermoléculaires ainsi que d'un point de vue morphologique.



# **Chapitre 1 :**

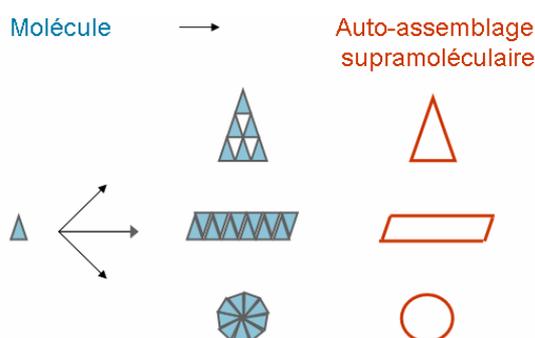
## **Etude bibliographique d'auto-assemblages amphiphiles**

### **Effet de contre ion**



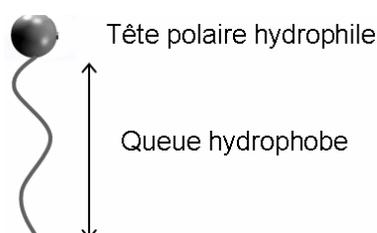
## 1 Introduction

Parce qu'ils combinent ordre, mobilité et que leur fonction résulte d'auto-organisation, les systèmes supramoléculaires auto-assemblés ont suscité un grand intérêt depuis une trentaine d'années<sup>1,2,3,4,5</sup>. Les richesses de structures, morphologies et fonctions issues de la coopérativité des interactions non covalentes au sein de ces systèmes en font des objets plus intéressants et complexes que la somme de leurs composants (Figure I-1).



**Figure I-1 : Représentation schématique de la diversité des morphologies accessibles à partir d'une même brique moléculaire.**

Parmi les systèmes auto-assemblés, les molécules amphiphiles représentent une famille particulière. Leur structure ambivalente, présentant une partie polaire hydrophile associée à une partie apolaire hydrophobe (Figure I-2), leur confère la propriété de s'organiser de façon spontanée dans l'eau. Les auto-assemblages ainsi obtenus possèdent des morphologies supramoléculaires très diverses autant d'un point de vue architectural que de leurs propriétés.



**Figure I-2 : Représentation schématique de la structure d'un amphiphile.**

Les auto-assemblages obtenus à partir de telles unités possèdent des propriétés propres qui ne sont généralement pas accessibles à partir des systèmes développés dans le domaine de la chimie supramoléculaire. Ces auto-assemblages impliquent notamment un nombre variable et particulièrement important de molécules, de l'ordre d'une centaine au milliard.

La principale force motrice responsable de cette auto-organisation est l'effet hydrophobe, non directionnel et dynamique, conférant aux agrégats, même de grande taille, une solubilité importante.

Les propriétés d'agrégation dans l'eau diffèrent d'un amphiphile à l'autre selon des caractéristiques structurales telles que la nature et la taille de la tête polaire et de la partie hydrophobe. Ces molécules sont généralement classées en cinq catégories (Figure I-3) : les amphiphiles monocaténaire (A), possédant une tête hydrophile et une queue hydrophobe, les amphiphiles possédant deux chaînes hydrophobes et une seule tête hydrophile (B) (de type phospholipides) ou deux têtes hydrophiles reliées par un espaceur (C), les amphiphiles catanioniques (D) et les bola amphiphiles (E).

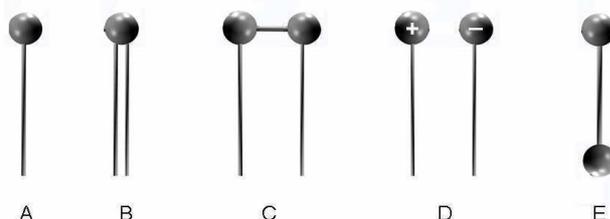


Figure I-3 : Représentation schématique des 5 classes de molécules amphiphiles.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps aux molécules amphiphiles chargées. Nous présenterons le comportement d'agrégation de ces tensioactifs ioniques en fonction de leur structure moléculaire, ainsi que différentes techniques d'étude de la spécificité ionique dans le contexte des auto-assemblages amphiphiles. Dans ce cadre, nous décrirons une classe de tensioactifs particulière : les amphiphiles géminés. La présentation de cette famille de molécules nous permettra d'aborder une des thématiques développées au sein de notre laboratoire, concernant l'étude des effets spécifiques de contre ions.

Enfin, après une brève présentation de la diversité des morphologies supramoléculaires d'auto-assemblage, la dernière partie de ce travail bibliographique sera consacrée à une famille particulière d'auto-assemblages présentant des morphologies chirales.

## 2 Comportement d'agrégation d'amphiphiles chargés en solution

### 2.1 Transitions de phases et micellisation

Etant donné leurs propriétés d'agrégation en solution, les molécules amphiphiles sont caractérisées par leur capacité à être à l'état soluble ou précipité dans l'eau. Ces états sont particulièrement influencés (outre la nature de l'amphiphile) par la concentration du tensioactif, et la température. Ainsi, deux paramètres physico-chimiques sont typiquement utilisés pour décrire une molécule amphiphile chargée (Figure I-4) :

- **La concentration micellaire critique (cmc)<sup>a</sup>** est la concentration minimale à partir de laquelle le tensioactif passe d'un état soluble monomérique à un état soluble agrégé (micelles) dans l'eau, à une température donnée supérieure à celle du point de Krafft (Figure I-4). La micellisation est un phénomène spontané, favorable thermodynamiquement, qui conduit à un accroissement important de la solubilité du tensioactif.

- **La température de Krafft ( $T_k$ )** est la température à laquelle un tensioactif à l'état de solide hydraté se dissout dans l'eau (sous forme monomérique ou agrégée), en fonction de la concentration. A température constante supérieure à la  $T_k$ , le tensioactif est soluble sur de grandes gammes de concentrations au-dessus de la cmc, car l'espèce prédominante en solution n'est plus le tensioactif monomérique, mais la micelle. La solubilité apparente ne dépend donc plus de la solubilité du monomère, mais de celle de la micelle elle-même ou d'autres agrégats qui pourraient se former.

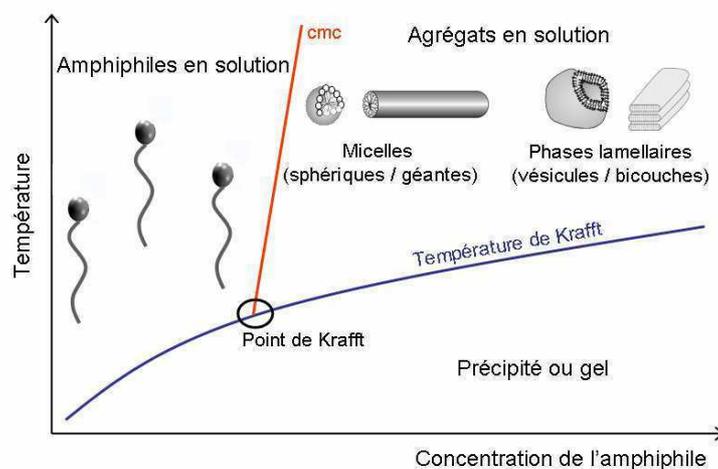


Figure I-4 : Diagramme de phase d'un tensioactif en solution.

<sup>a</sup> Lorsque la structure micellaire de l'agrégat n'est pas clairement mise en évidence, il est plus juste d'employer Concentration d'Agrégation Critique (cac) à la place de cmc.

Parmi les différentes forces gouvernant la micellisation, l'effet hydrophobe et la répulsion entre les têtes polaires apportent une contribution importante au processus d'auto-assemblage. Cependant, en fonction de la nature de l'amphiphile, d'autres forces peuvent être également déterminantes. Par exemple, l'environnement ionique et le contre ion complexé à une molécule amphiphile chargée sont des paramètres qui modifient également le comportement d'agrégation.

## **2.2 Influence des paramètres structuraux**

### **2.2.1 Effet de la partie hydrophobe**

La solubilité des amphiphiles et leur micellisation sont en partie déterminées par la longueur de la chaîne hydrophobe. Pour un tensioactif donné, la cmc diminue de façon continue avec l'augmentation du nombre de carbones de la chaîne hydrophobe, jusqu'à 16 carbones<sup>6</sup>. Au-delà de 16 carbones, il arrive que la cmc ne décroisse plus aussi vite. La grande hydrophobie du tensioactif favorise la formation d'agrégats pré-micellaires. Ces agrégats, composés de quelques molécules amphiphiles, se forment à très basse concentration et permettent de stabiliser suffisamment le système pour retarder la formation de micelles.

Les modifications structurales des chaînes aliphatiques influencent également la micellisation. La présence d'une insaturation augmente la cmc d'un tensioactif d'un facteur 3 à 4 par rapport à son homologue saturé. La présence d'un groupement hydrophile au sein de la chaîne aliphatique, tel qu'un atome d'oxygène, d'azote, ou le remplacement d'un proton éthylénique par un groupement hydroxyle augmente également la cmc. Le remplacement par une chaîne fluorocarbonée se traduit en revanche par une diminution très importante de la cmc.

Les modifications structurales des chaînes influencent également la  $T_k$  : la présence d'une insaturation ou d'un groupement hydrophile sur la chaîne induit une diminution de la  $T_k$  d'un amphiphile par rapport à celle de son homologue saturé entièrement hydrocarboné.

### **2.2.2 Effet de la tête polaire**

Les modifications structurales de la partie hydrophile influencent les interactions entre les têtes polaires. Plus la tête polaire est hydratée, plus la micellisation est défavorisée. Pour une même longueur de chaîne, les tensioactifs non ioniques ont une cmc inférieure aux

tensioactifs ioniques, ces derniers subissant une répulsion électrostatique importante qui défavorise la formation de micelles.

Dans le cas des tensioactifs ioniques, le contre ion peut être considéré comme faisant partie intégrante de la tête polaire car il en influence beaucoup les propriétés. Ainsi, la nature du contre ion a un impact important sur les processus sensibles aux modifications de la partie hydrophile du tensioactif.

### **2.2.3 Effet du contre ion**

Selon le caractère hydrophile, hydrophobe et la charge des contre ions, la solubilité des amphiphiles ioniques est modifiée. Le degré d'ionisation  $\alpha$  est une mesure de l'affinité d'un contre ion pour la surface micellaire. Ce paramètre varie en fonction du rayon hydraté, de la polarisabilité et de la charge du contre ion. Un petit rayon hydraté et une polarisabilité ou une charge de l'ion importante favorisent un faible degré d'ionisation, c'est-à-dire la formation de micelles peu ionisées. Dans ce cas, le contre ion est fortement lié à la micelle et provoque une diminution de la répulsion électrostatique des têtes polaires<sup>7</sup>, responsable de la baisse simultanée de la cmc.

Dans le paragraphe suivant, nous nous intéresserons à l'importance de la nature du contre ion dans les phénomènes d'auto-assemblage de tensioactifs ioniques.

## **3 Spécificité ionique dans les systèmes amphiphiles chargés**

L'étude des effets spécifiques d'ions reste à ce jour un enjeu particulièrement important dans un grand nombre de domaines. Depuis les travaux de Hofmeister<sup>8</sup>, la spécificité ionique a été largement étudiée dans un contexte biologique<sup>9,10</sup>, notamment par Collins<sup>11,12,13</sup> et Ninham et Kunz<sup>14,15</sup>. A la fin du 19ème siècle, Hofmeister a montré l'influence de la nature des ions sur la précipitation des protéines dans les solutions salines. Ces travaux ont permis l'établissement d'un classement, couramment nommé la « série de Hofmeister », en fonction de l'aptitude des ions à précipiter les protéines. Ce classement est

également observé dans un grand nombre de mécanismes physico-chimiques incluant les phénomènes de micellisation de tensioactifs chargés<sup>16</sup>. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la capacité plus ou moins forte d'un ion à s'associer avec un tensioactif chargé affecte les valeurs de cmc et de  $T_k$ . Dans ce contexte, Gregory Warr a reporté une série d'études permettant l'évaluation de l'affinité de certains anions ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et salicylate notamment) pour des gemini cationiques de structure variable<sup>17,18,19</sup>. L'ordre d'affinité décroissante  $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ , quel que soit le gemini cationique testé, a ainsi été établi. L'affinité du contre anion salicylate pour ces gemini apparaît quant à elle davantage dépendante de la structure du tensioactif, tout en restant systématiquement bien inférieure à celle des ions bromure. Ces études ont permis de mettre en évidence l'influence de la nature du contre ion sur les propriétés de micellisation et sur la distribution des charges à l'interface air/solution.

Dans les deux prochains paragraphes, nous présenterons deux méthodes couramment utilisées pour la détermination de la cmc d'amphiphiles chargés, ainsi qu'une stratégie permettant de mesurer la concentration ionique à la surface d'une micelle chargée en milieu aqueux.

## **3.1 Etude de la micellisation**

### **3.1.1 Détermination de la cmc par conductimétrie**

Dans le cas de tensioactifs chargés, la cmc et la  $T_k$  sont généralement déterminées par conductimétrie<sup>20,21</sup>. Cette technique, sensible à la mobilité ionique, permet de distinguer les états solubles caractérisés par une mobilité ionique importante, des états précipités de mobilité ionique réduite. De cette façon, en dessous de la cmc et en l'absence d'agrégation pré-micellaire, la conductivité évolue linéairement avec la concentration du tensioactif. A la cmc, la diminution de la mobilité des amphiphiles agrégés dans les micelles et le confinement des contre ions provoquent une forte diminution de la mobilité ionique, matérialisée par une rupture de pente (Figure I-5A).

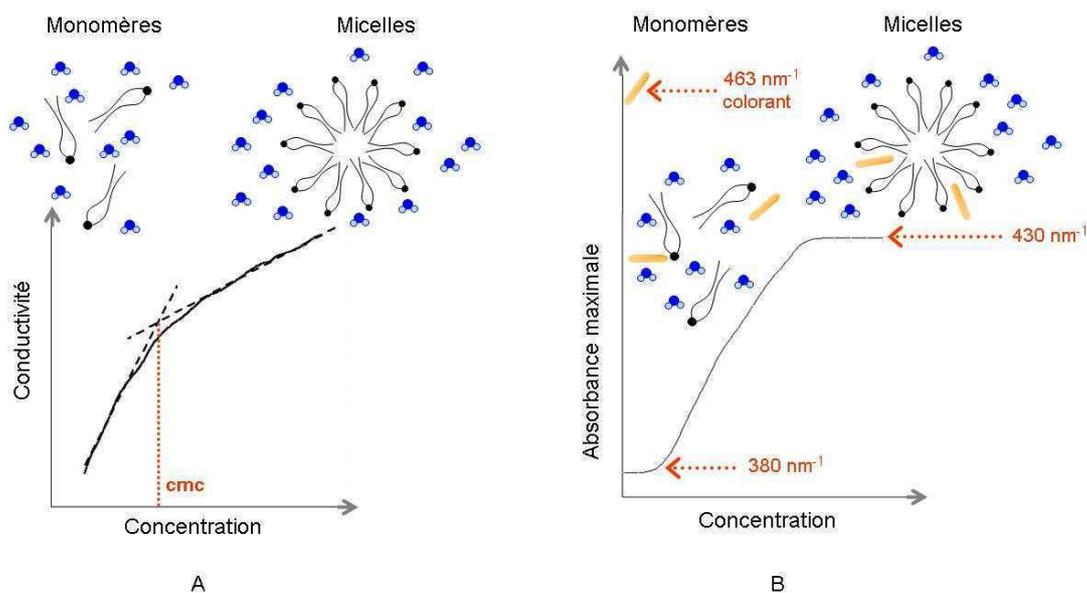


Figure I-5 : Détermination de la cmc par conductimétrie (A) et colorimétrie (B).

### 3.1.2 Détermination de la cmc par colorimétrie

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'un colorant, typiquement l'orange de méthyle, dont le spectre UV-visible n'est pas le même s'il est réalisé dans l'eau pure ou dans une solution micellaire<sup>22,23</sup>. Cette sonde moléculaire possède une longueur d'onde d'absorption maximale très sensible au comportement d'agrégation du tensioactif. L'interaction du colorant avec les micelles se traduit par un déplacement des bandes sur plusieurs dizaines de nanomètres lors de la micellisation. La longueur d'onde maximale du méthyle orange dans l'eau se situe à 463 nm<sup>-1</sup>. Du fait d'interactions électrostatiques, elle est déplacée à 380 nm<sup>-1</sup> en présence d'un tensioactif cationique à une concentration largement inférieure à sa cmc. L'interaction du colorant avec des micelles se traduit par un nouveau déplacement de la longueur d'onde maximale aux alentours de 430 nm<sup>-1</sup> (Figure I-5B).

Cependant, l'ajout de colorant à une solution de tensioactif, même en très faible quantité, se traduit par une diminution des cmc mesurées par ce biais. Cet effet est d'autant plus important que la cmc est faible par rapport à la concentration du colorant. La quantité de colorant doit ainsi être minimale pour éviter de perturber la micellisation du tensioactif étudié.

### 3.2 Détermination de la concentration ionique interfaciale

Dans le but de déterminer la concentration des contre ions à la surface des micelles chargées, Lawrence S. Romsted a développé une stratégie de « piégeage chimique » au début des années 1990<sup>24,25,26,27,28</sup>. Cette approche utilise un dérivé amphiphile de l'ion arène diazonium. Une fois incorporé au sein des micelles, ce dérivé est utilisé comme sonde de l'association ionique à l'interface micellaire (Figure I-6A). Cette méthode s'appuie sur l'analyse quantitative par chromatographie en phase liquide de la distribution des produits de réaction de l'ion arène diazonium avec des nucléophiles faiblement basiques, tels que les halogénures  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Br}^-$  (Figure I-6B). Le principe de cette méthode repose sur le fait que les produits de réaction sont proportionnels à la concentration des contre ions présents à l'interface micellaire et non à la stoechiométrie de la solution.

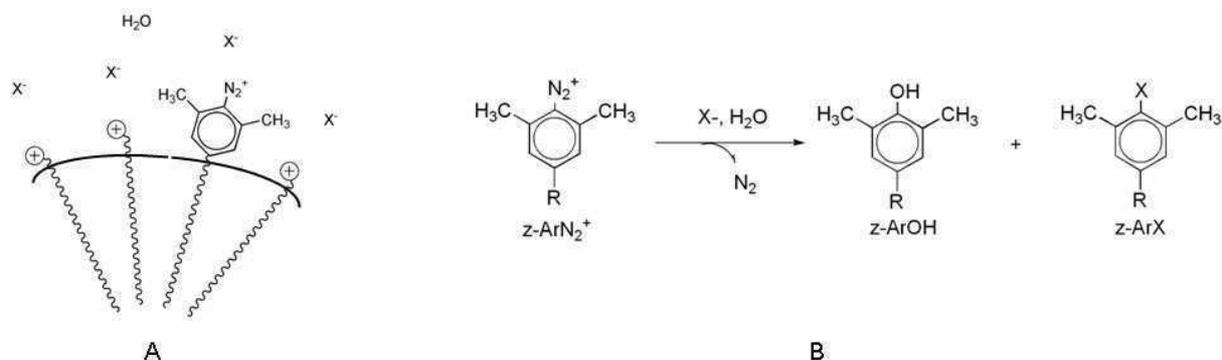


Figure I-6 : (A) Représentation schématique de l'incorporation d'un dérivé amphiphile de l'ion arène diazonium au sein d'une micelle. (B) Réaction de l'ion arène diazonium avec le nucléophile  $\text{X}^-$  dans l'eau.

Cette stratégie permet de mesurer les concentrations ioniques à l'interface micellaire et de mettre en évidence la formation de paires d'ions. Les études menées dans ce contexte ont ainsi mis en évidence l'importance de la nature du contre ion et de la distribution des charges dans les phénomènes d'auto-assemblages d'amphiphiles chargés. Par exemple, parmi ses plus récents travaux, Romsted a mesuré les concentrations interfaciales de contre anions bromure complexés à différents amphiphiles dimériques dicationiques<sup>29</sup>. Il a ainsi montré que la transition morphologique de sphère à structure tubulaire s'accompagne d'une augmentation de la concentration de bromure à la surface des agrégats formés. Cette transition est permise par la formation de paires d'ions induisant une déshydratation de la région interfaciale. Ainsi, en utilisant une telle approche, il est possible d'obtenir des informations sur l'équilibre des forces intervenant dans le comportement d'agrégation d'amphiphiles chargés, à savoir l'effet hydrophobe, les effets spécifiques de contre ions ainsi que les interactions d'hydratation.

Les tensioactifs utilisés au cours de cette étude constituent une classe d'amphiphiles particulière : les amphiphiles dimériques géminés ou *gemi*<sup>b</sup>. Le paragraphe suivant leur sera consacré, notamment dans le cadre des thématiques développées au sein de notre groupe de recherche.

## 4 Les *gemi*, une classe particulière d'amphiphiles

Décrits pour la première fois en 1971<sup>30</sup>, les *gemi* sont définis comme un tensioactif fait de deux amphiphiles connectés au niveau de leurs têtes polaires par un espaceur (Figure I-7)<sup>31,32</sup>. Ainsi, un *gemi* possède (au moins) deux têtes polaires et deux queues hydrophobes de nature variable.

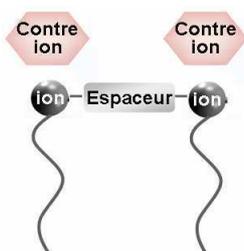


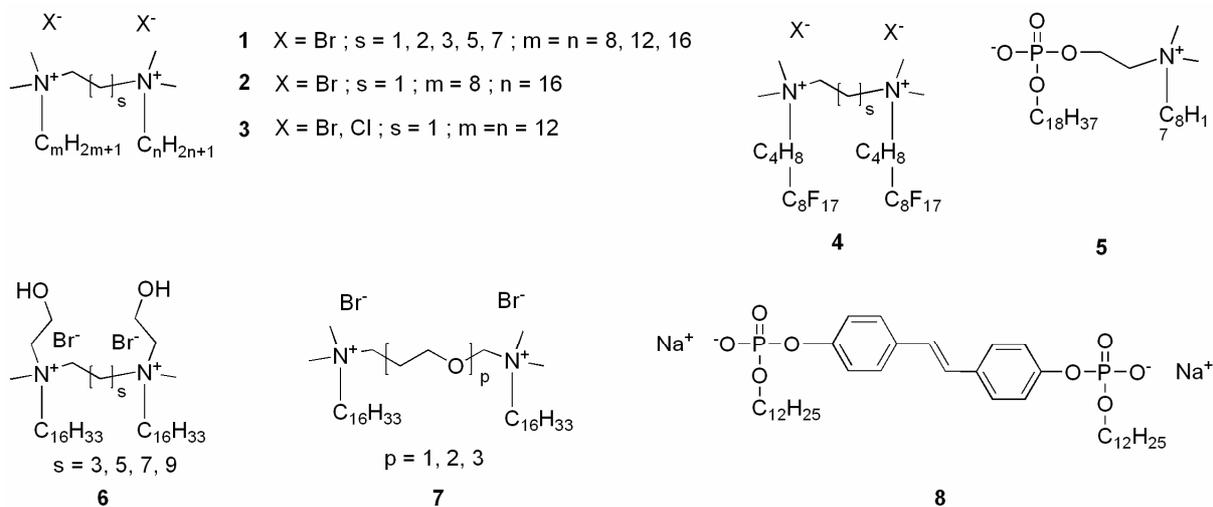
Figure I-7 : Représentation schématique d'un *gemi*.

### 4.1 Diversité structurale des *gemi*

L'intérêt suscité par les *gemi* s'explique en partie par leur efficacité à réduire la tension de surface de l'eau. La cmc de ces tensioactifs est en effet plus faible d'un à deux ordres de grandeur que celle de leurs monomères correspondants. De plus, leurs propriétés d'émulsifiant sont intéressantes d'un point de vue industriel pour la production de mousses de grande stabilité. Les *gemi* attirent également l'attention du fait de leur comportement d'agrégation remarquable. Les auto-assemblages obtenus avec ce type de molécules sont beaucoup plus riches en terme de diversité morphologique que leurs analogues monomériques. La multiplicité des modifications structurales possibles permet de moduler l'architecture des auto-assemblages résultants. Les têtes polaires peuvent être cationiques, anioniques ou non ioniques, permettant la synthèse de *gemi* chargés, neutres ou zwitterioniques. L'espaceur

<sup>b</sup> Dans la suite de ce travail, nous utiliserons le terme *gemi* pour *tensioactif ou amphiphile géminé*. Ce mot relevant du latin, il ne sera jamais accordé.

peut être court ou long, rigide ou flexible, polaire ou apolaire. Généralement symétriques, les gemini peuvent également être constitués de deux têtes polaires et/ou de deux chaînes hydrophobes de taille ou de nature différentes (Figure I-8).

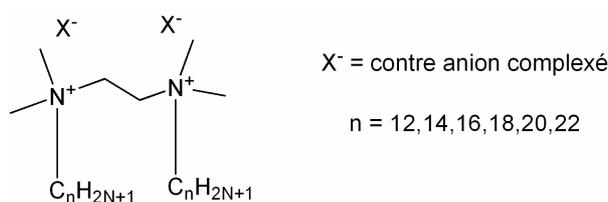


**Figure I-8 : Structures moléculaires de quelques gemini illustrant la diversité structurale de cette classe d'amphiphiles. (1<sup>33</sup>, 2<sup>34</sup>, 3<sup>35</sup>, 4<sup>36</sup>, 5<sup>37</sup>, 6<sup>38</sup>, 7<sup>39</sup>, 8<sup>31</sup>)**

De nombreux travaux portent sur des gemini particuliers, dotés de têtes polaires cationiques ammoniums quaternaires, chacune substituée par une chaîne aliphatique de longueur variable, et connectées entre elles par un nombre de méthylènes également variable (molécules **1**, **2**, **3**). De nombreuses études ont été réalisées en procédant à des variations structurales affectant soit l'espaceur, soit la longueur des chaînes hydrophobes. En revanche, s'il est connu que la nature des contre ions des gemini modifie de façon importante les propriétés d'auto-assemblage<sup>40,41,42</sup>, peu de données sont actuellement disponibles sur leur influence. C'est dans ce contexte que notre intérêt s'est porté sur l'étude du comportement d'agrégation de gemini chargés.

## 4.2 Gemini développés dans notre groupe : travaux antérieurs

Les gemini dicationiques développés dans notre équipe sont constitués de deux têtes polaires ammoniums quaternaires reliées par un espaceur éthylénique et possédant deux chaînes aliphatiques symétriques de longueur paire variable comprise entre 12 et 22 carbones (Figure I-9).



**Figure I-9 : Structure moléculaire des gemini développés au sein de notre équipe.**

Nos travaux sont orientés vers l'étude de la spécificité ionique sur le comportement de micellisation, ainsi qu'au niveau des morphologies supramoléculaires résultant de leur auto-assemblage. Dans le cadre de son doctorat<sup>43</sup>, Sabine Manet a étudié l'influence de la nature du contre ion sur les propriétés d'agrégation de gemini de façon systématique.

#### *Etude de la micellisation de divers gemini contre anions*

Dans cette étude, les gemini ont été complexés à 37 contre ions différents, répartis en quatre familles (Figure I-10) :

- La famille des petits contre ions rassemble les anions de petite taille. Leur interaction avec les molécules cationiques est essentiellement ionique.
- La famille des carboxylates aliphatiques comprend des anions de même motif anionique dont la taille de la chaîne aliphatique varie de 0 à 15 carbones. Ceci permet d'étudier l'effet de l'hydrophobie croissante du contre ion sur l'interaction avec le gemini, tandis que la composante ionique reste quasiment constante.
- La famille des carboxylates aromatiques conserve également le même motif anionique ; la position des substituants du cycle est examinée.
- La famille des contre ions orphelins regroupe les anions n'ayant pas de similarité entre eux, dont la comparaison avec les contre ions des autres familles est pertinente.

Les résultats obtenus avec cette diversité de contre ions ont montré la complexité des comportements d'agrégation de molécules chargées. La spécificité ionique mise en jeu fait intervenir de nombreux paramètres d'effets et de contributions variables en fonction de la nature du contre ion considéré. D'une manière générale, il apparaît cependant que l'hydrophilie du contre ion est le paramètre clé de la micellisation. De façon simplifiée, la cmc augmente avec l'hydrophilie du contre ion (Figure I-11). Divers paramètres physico-chimiques (polarisabilité et rayon ionique par exemple) entrent également en jeu, en coopération avec les effets secondaires stériques et d'hydratation.

En ce qui concerne la  $T_k$ , le facteur déterminant est la stabilité de l'état solide, essentiellement déterminée par la polarisabilité du contre ion. Ainsi, plus la polarisabilité est importante, plus l'interaction avec le gemini est forte, et plus la  $T_k$  est élevée.

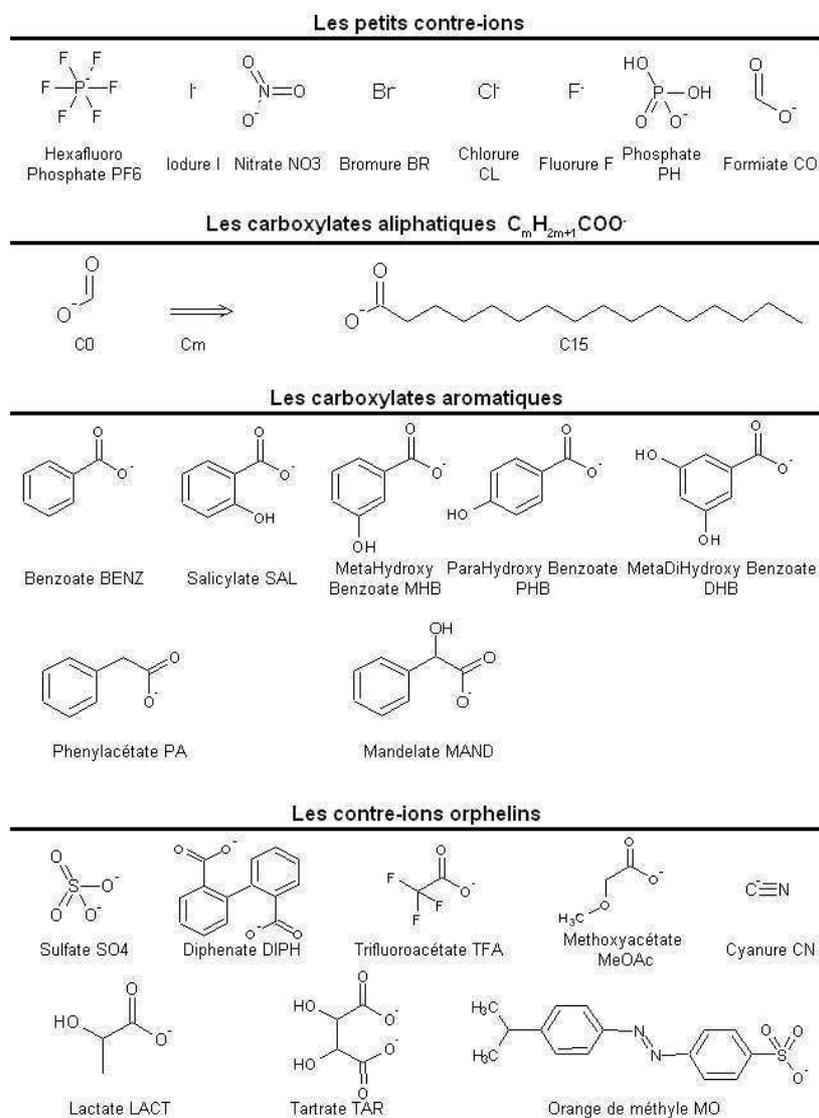
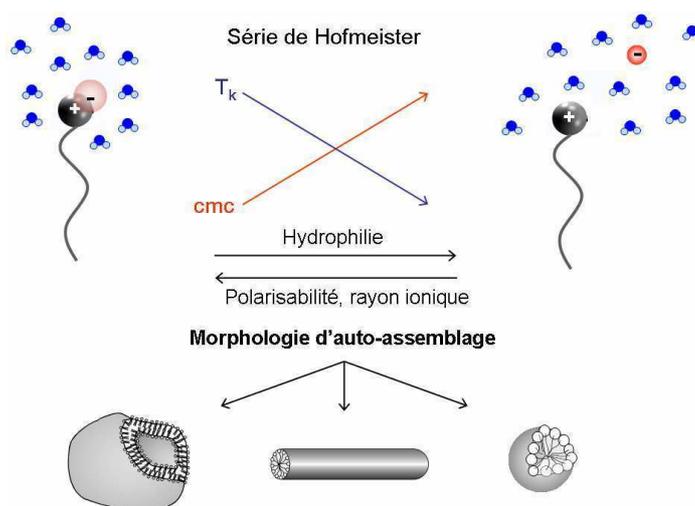


Figure I-10 : Structure des 37 contre anions complexés dans le cadre de l'étude de la spécificité ionique.

En ce qui concerne les morphologies d'auto-assemblage, on observe une corrélation entre la courbure interfaciale des agrégats formés et le confinement plus ou moins important des contre ions. Un ion hydrophobe fortement confiné à la surface de l'agrégat est responsable de la diminution de la densité de charge de surface et par conséquent de la diminution de la courbure d'interface. Ceci favorise la formation de bicouches par rapport à la formation de micelles. A l'inverse, les petits ions hydrophiles sont impliqués dans la formation d'agrégats de courbure plus importante, de type micelles.



**Figure I-11 : Représentation schématique des propriétés d'auto-assemblage en fonction de la nature du contre ion complexé.**

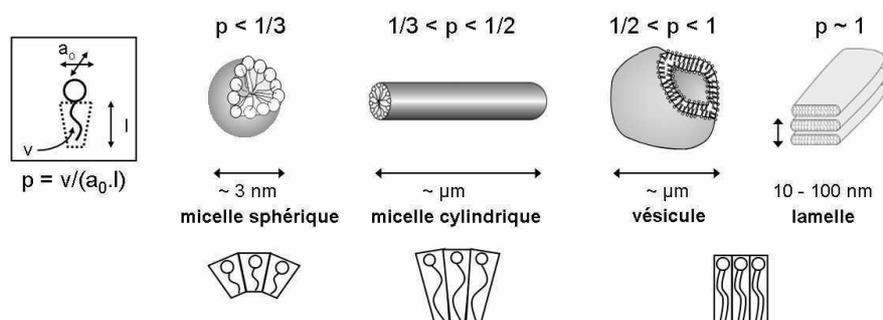
Cette étude illustre la complexité des effets spécifiques d'ions résultant de la coopérativité de divers paramètres et souligne l'importance de la nature du contre ion sur le comportement d'agrégation des gemini. De ce fait, un choix de contre ion judicieux permet de concevoir une architecture supramoléculaire particulière et de contrôler les morphologies d'auto-assemblage de molécules amphiphiles ioniques.

La spécificité ionique s'exprime également à l'échelle supramoléculaire, au niveau des morphologies d'auto-assemblage. Lorsque la concentration des tensioactifs est augmentée bien au-delà de la cmc, des phases nouvelles apparaissent dans lesquelles l'amphiphile adopte des stratégies conformationnelles différentes en fonction de la nature et de la géométrie de ses parties hydrophobes et hydrophiles. L'équilibre entre ces diverses contraintes est responsable de la formation d'auto-assemblages supramoléculaires de morphologies variées.

## 5 Diversité de morphologies d'auto-assemblage

D'un point de vue de la chimie, il est un enjeu particulièrement stimulant de comprendre, à partir de la structure moléculaire du tensioactif, l'architecture supramoléculaire de l'auto-assemblage. Israelachvili, Mitchell et Ninham<sup>44,45,46,47</sup> ont établi un modèle reposant sur des paramètres géométriques en décrivant le paramètre d'empilement  $p = v/(a_0 \cdot l)$ , où  $v$  est

le volume effectif des chaînes hydrophobes,  $a_0$  est la surface de la tête polaire, et  $l$  est la longueur de la chaîne hydrophobe. Ce paramètre est défini comme le rapport entre les aires moyennes occupées par les têtes polaires et les queues hydrophobes des tensioactifs au sein des assemblages. Il permet de relier les propriétés moléculaires d'un tensioactif à la courbure interfaciale de l'agrégat (Figure I-12).



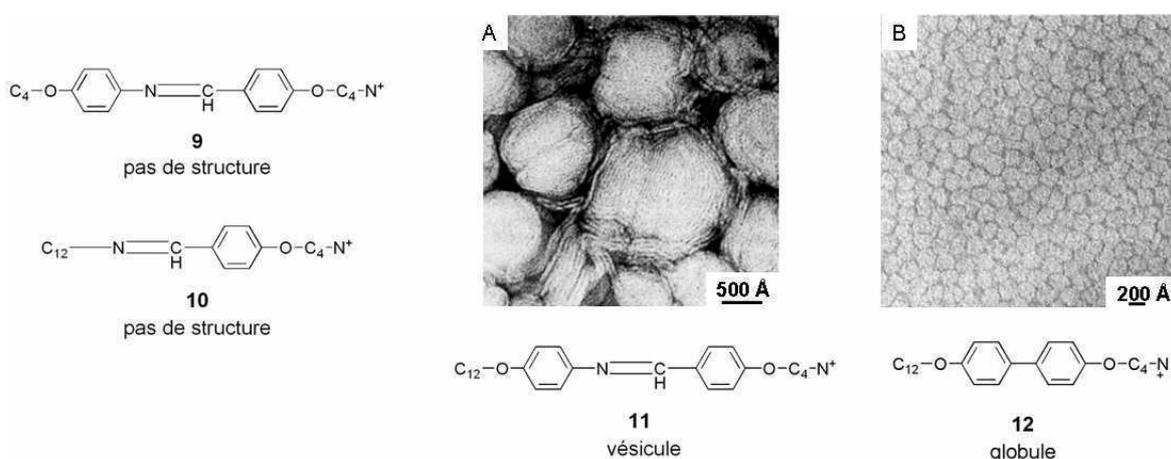
**Figure I-12 : Représentation schématique de la relation entre le paramètre d'empilement  $p$  et les propriétés moléculaires des tensioactifs. Ce schéma est adapté de Israelachvili [47]**

Cependant, si le paramètre d'empilement reste très utile pour la compréhension des phénomènes d'auto-assemblage, il ne permet pas de prédire l'architecture de morphologies accessibles à partir de molécules amphiphiles de structures complexes (amphiphiles dissymétriques par exemple) et ne tient pas compte de paramètres extérieurs, tels que la température, la concentration ou la présence d'additifs. De ce fait, la relation entre structure moléculaire d'un tensioactif et architecture supramoléculaire d'auto-assemblage ne cesse d'intéresser de nombreux groupes de recherche et constitue un enjeu particulièrement important dans le domaine des auto-assemblages amphiphiles.

En 1977, Toyoki Kunitake a décrit le premier exemple d'une membrane totalement synthétique<sup>48</sup> obtenue par auto-assemblage de molécules amphiphiles monocationiques constituées d'une tête polaire et de deux chaînes hydrophobes (didodécyl-méthyle ammonium). Suite à ces travaux, Kunitake a reporté de nombreuses études présentant la diversité de morphologies accessibles à partir de molécules amphiphiles de différentes structures<sup>49</sup>. Des tensioactifs monocaténaux, ou possédant deux têtes hydrophiles, ont été étudiés, entre autres structures.

## 5.1 Molécules amphiphiles monocaténares

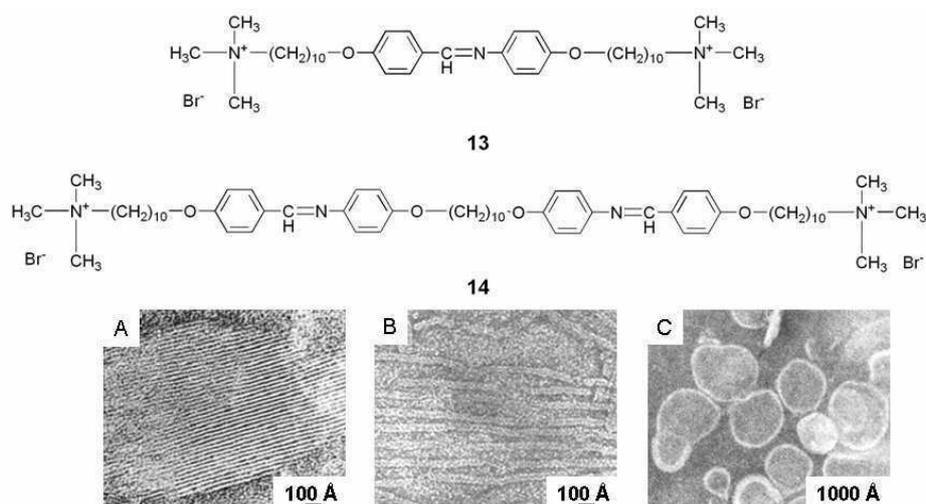
Ces tensioactifs sont constitués d'une tête hydrophile et d'une chaîne hydrophobe et peuvent comporter un segment rigide entre ces deux éléments. La variation de chacune de ces entités structurales induit des modifications morphologiques à l'échelle supramoléculaire<sup>50</sup>. Par exemple, la molécule amphiphile **9** ne permet pas la formation de structure dans l'eau. Cependant, son dérivé (**11**), dont seule la longueur de la chaîne hydrophobe a été variée (de 4 à 12 carbones), permet la formation de vésicules (Figure I-13A). Ceci illustre le fait que la longueur de la chaîne hydrophobe est un élément crucial pour la formation de bicouches.



De plus, il apparaît que pour ce type de structures moléculaires, la nature du segment rigide détermine également la morphologie d'auto-assemblage. Si la présence d'un biphenyle au sein du segment rigide est nécessaire, la nature de l'espaceur reliant ces deux cycles est également déterminante. En effet, la molécule **10**, constituée d'un unique cycle, ne présente aucune structure en solution. De plus, en absence d'espaceur entre les deux cycles (**12**), des globules se forment à la place des vésicules observées précédemment (Figure I-13B). D'autres structures dérivées de ces amphiphiles ont montré la formation de morphologies originales. Nous citerons par exemple la formation de tubes en présence d'un groupement carbonyle entre les deux cycles, ou de disques lorsqu'un troisième cycle est ajouté.

## 5.2 Molécules possédant deux têtes hydrophiles

Des tensioactifs composés de deux têtes hydrophiles cationiques ont également été étudiés. Nous citerons l'exemple de la molécule **13**, possédant un segment rigide biphenyle au centre de sa structure, et de son dérivé (**14**) possédant des têtes polaires et chaînes aliphatiques identiques, mais dont le segment rigide est constitué de quatre cycles<sup>51</sup>. A nouveau, la nature du segment rigide apparaît être un facteur clé dans la détermination des morphologies d'agrégation. Alors que la molécule **13** s'auto-assemble dans l'eau en lamelles régulières dont l'épaisseur est comprise entre 30 et 40 Å (Figure I-14A), le dérivé **14** forme des structures tubulaires de diamètre compris entre 70 et 100 Å (Figure I-14B).



**Figure I-14** : Exemples de structures moléculaires d'amphiphiles constitués de deux têtes hydrophiles et clichés de microscopie électronique présentant les auto-assemblages de **13** (A), **14** (B) et **13** : cholestérol (**3 :1**) (C) [51].

Cette étude montre également l'influence des conditions expérimentales sur le paramètre d'empilement. Lorsque du cholestérol est ajouté au tensioactif **13** (1/3 M), la courbure interfaciale de l'auto-assemblage augmente. Dans ce cas, la formation de vésicules de diamètre compris entre 1000 et 3000 Å et d'épaisseur 60 à 70 Å est observée.

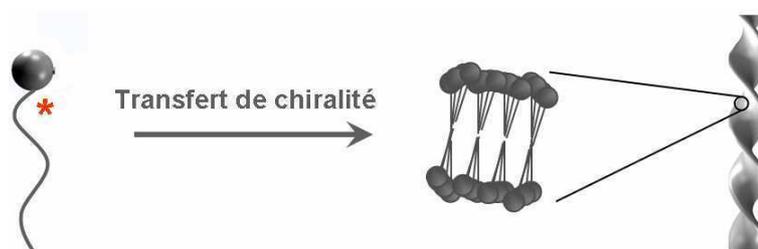
Parmi ses nombreux travaux, Kunitake s'est également intéressé à une famille d'auto-assemblages particuliers : les morphologies chirales<sup>52,53,54</sup>. Ces structures résultent de l'auto-organisation de tensioactifs possédant un centre asymétrique. Ces architectures, telles que les hélices, ont suscité l'intérêt de nombreux groupes de recherche.

## 6 Morphologies chirales<sup>55</sup>

La chiralité est omniprésente dans les systèmes biologiques. Ceci est illustré à l'échelle du nanomètre par la formation de structures tertiaires protéiques en hélices, ou encore par la formation de la double hélice d'ADN. Dans le but de comprendre l'organisation de ces systèmes et de les reproduire de façon synthétique, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés aux morphologies chirales obtenues à partir de systèmes amphiphiles. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons strictement aux aspects morphologiques visibles à partir d'un ordre d'échelle d'une dizaine de nanomètres (études réalisées par microscopie électronique essentiellement).

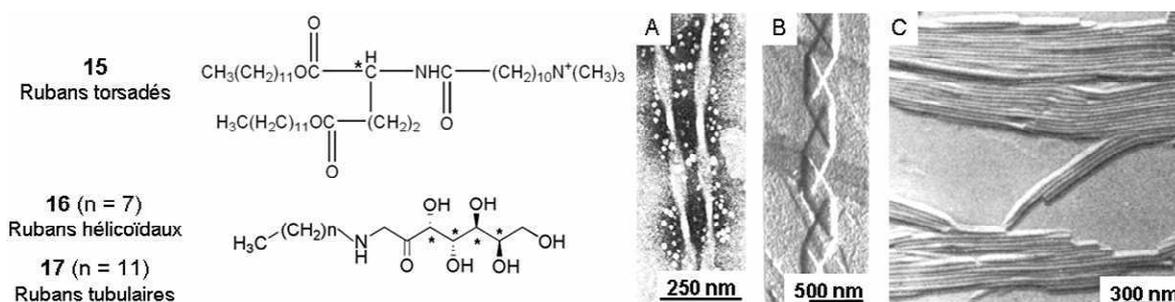
### 6.1 Transfert de chiralité et diversité de morphologies

L'auto-assemblage de molécules chirales permet parfois le transfert de la chiralité à l'échelle supramoléculaire : la chiralité est exprimée au niveau de la morphologie des agrégats amphiphiles. Ce transfert de chiralité se traduit par la formation d'hélices nano ou micrométriques (Figure 1-15). Des fibres torsadées ou hélicoïdales de sens d'hélicité gauche ou droit sont alors observées.



**Figure I-15 : Représentation schématique du transfert de chiralité de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire.**

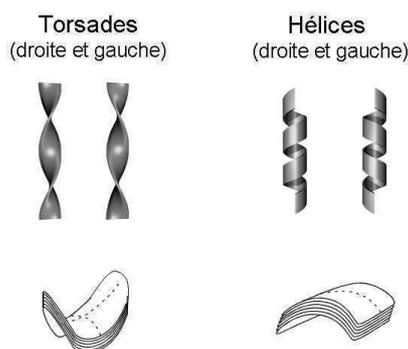
Depuis les premiers exemples de transfert de chiralité de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire, décrits en 1960<sup>56,57</sup>, de nombreux travaux ont été reportés, notamment par les groupes de Fuhrhop<sup>58,59,60,61</sup> et Helfrich<sup>62</sup>. Ces études ont montré la formation d'hélices possédant différentes structures. Trois morphologies sont typiquement distinguées (Figure I-16) : les rubans torsadés (A), hélicoïdaux (B) et les tubules (C).



**Figure I-16 : Structures moléculaires et clichés de microscopie électronique présentant les différents auto-assemblages chiraux. (A) Rubans torsadés obtenus à partir de la molécule 15 [52], (B) ruban hélicoïdal obtenu à partir de la molécule 16 [59], (C) tubules obtenues à partir de la molécule 17 [60].**

### 6.1.1 Rubans torsadés et hélicoïdaux

Les hélices représentent une famille particulière des auto-assemblages chiraux. Au sein de cette famille, on distingue les rubans torsadés et hélicoïdaux. Ces rubans sont formés à partir de l'auto-assemblage de molécules amphiphiles organisées en bicouches. Chacune de ces morphologies est caractérisée par une courbure propre (Figure I-17). Les torsades ont une courbure de type gaussienne ou « en selle de cheval », contrairement aux hélices, caractérisées par une courbure cylindrique<sup>63,64</sup>.



**Figure I-17 : Représentation schématique des rubans torsadés et hélicoïdaux ainsi que de leur courbure.**

Une grande variété de molécules amphiphiles permet d'obtenir l'une ou l'autre de ces structures chirales. Les torsades précédemment présentées (Figure I-16A), ont été observées par Kunitake<sup>52</sup>, par auto-assemblage d'amphiphiles ammonium dérivés de l'acide glutamique (**15**). Ces morphologies ont également été observées à partir de dérivés d'acide hydroxystéarique (**18**)<sup>65,66</sup>, ou d'amphiphiles géminés diammonium (**19**)<sup>67</sup>. Les morphologies

hélicoïdales sont typiquement obtenues par auto-assemblage de molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire d'ammonium quaternaire et d'une chaîne hydrophobe (**20**)<sup>54</sup>, de lipides diacétyléniques (**21**)<sup>68,69</sup> ou de dérivés de cytidine myristoylphosphatidyle (**22**)<sup>70</sup>.

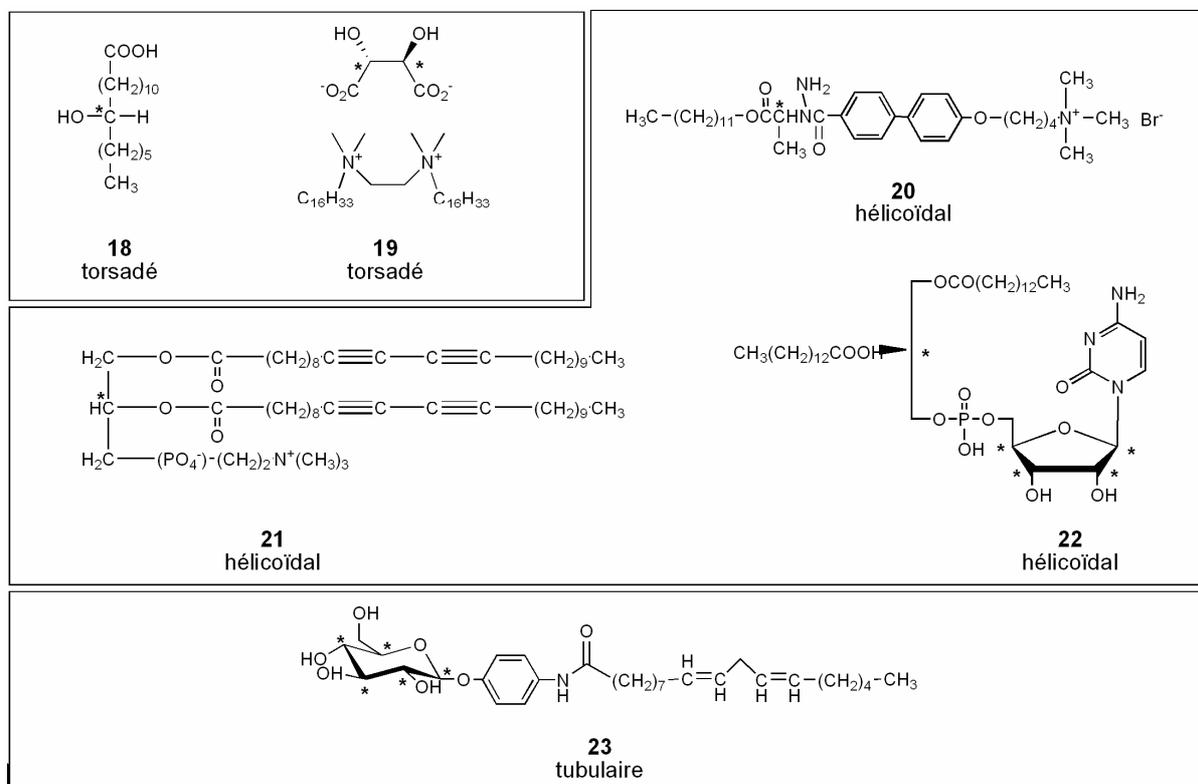
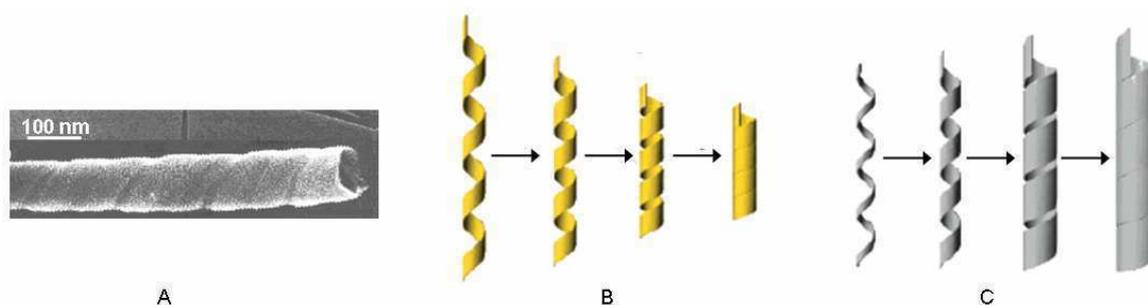


Figure I-18 : Exemples de structures de molécules s'auto-assemblant en rubans chiraux torsadés, hélicoïdaux et tubulaires.

### 6.1.2 Tubules

Bien que ne présentant pas de chiralité apparente, les tubes résultent souvent de mécanismes d'auto-assemblages chiraux<sup>71, 72</sup>. Les précurseurs des fibres tubulaires sont généralement les rubans hélicoïdaux. Dans ce cas, lorsque le tube est tout juste formé, les délimitations des bords du ruban hélicoïdal sont encore visibles et prouvent la chiralité de la structure tubulaire (Figure I-19A)<sup>73</sup>. Deux mécanismes sont principalement reportés dans la littérature pour expliquer la formation de tubules. Ces structures résultent soit de la diminution du pas d'hélicité (Figure I-19B) rapprochant les bords des rubans jusqu'à la formation d'une membrane continue, soit de l'augmentation de la largeur du ruban hélicoïdal (Figure I-19C)<sup>74</sup>.



**Figure I-19 : (A) Cliché de microscopie électronique illustrant la formation d'un tube dont les bords du ruban hélicoïdal précurseur sont encore visibles [73]. Représentation schématique de la formation de tubes à partir de rubans hélicoïdaux par un phénomène de diminution du pas de l'hélice (B) ou d'augmentation de l'épaisseur du ruban (C).**

Cependant, si la majorité des tubes résultent d'un mécanisme nécessitant une transition de structure chirale, la formation de tubes auto-assemblés à partir de structures achirales, telles que les vésicules, a également été décrite<sup>75</sup>.

## 6.2 Contrôle des morphologies

Ces morphologies chirales, comme la plupart des structures auto-assemblées, peuvent être contrôlées de différentes façons, soit en jouant sur les paramètres environnementaux, soit en modifiant la structure moléculaire des amphiphiles. Parmi les variations expérimentales, la nature du solvant, la vitesse de refroidissement, ou le temps de vieillissement des échantillons sont des paramètres clés. En effet, la formation de fibres étant un phénomène cinétique, ces deux derniers paramètres représentent une stratégie adaptée au contrôle de ces morphologies.

### 6.2.1 Variation des paramètres expérimentaux

La nature du solvant est un des paramètres permettant de moduler la morphologie d'agrégation. En effet, certaines molécules s'auto-assemblent de façon spécifique en fonction du solvant<sup>76,77,78</sup> : de rubans torsadés ou hélicoïdaux à la formation de fibres achirales, la taille et la morphologie des auto-assemblages sont contrôlées finement. Par exemple, les tubes formés à partir du phospholipide **24** présentent une structure unilamellaire de longueur  $65 \pm 10 \mu\text{m}$  dans un mélange eau/méthanol et multilamellaire de longueur  $40 \pm 10 \mu\text{m}$  lorsque le méthanol est remplacé par du propanol<sup>79</sup>.

D'un point de vue cinétique, il est également possible de contrôler la morphologie des rubans formés en variant la vitesse de refroidissement d'un échantillon préalablement solubilisé. De cette façon, le sens d'hélicité<sup>80</sup> ainsi que les dimensions des auto-assemblages peuvent être contrôlés<sup>81</sup>. Par exemple, les fibres formées à partir du phospholipide **24** présentent des longueur et diamètre beaucoup plus importants lorsque la température est diminuée lentement après solubilisation par chauffage (Figure I-20A) que lorsque la température est diminuée rapidement (Figure I-20B).

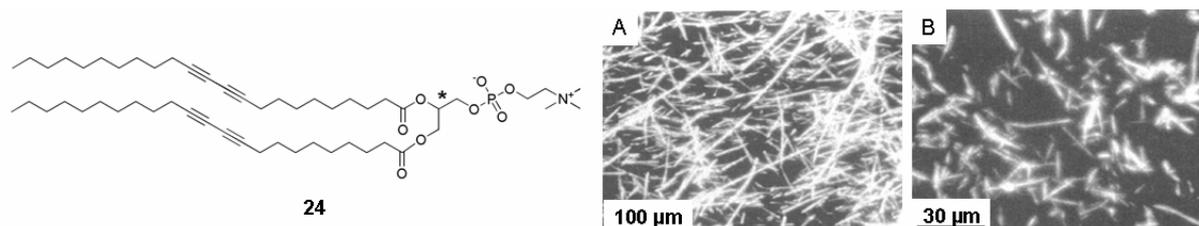
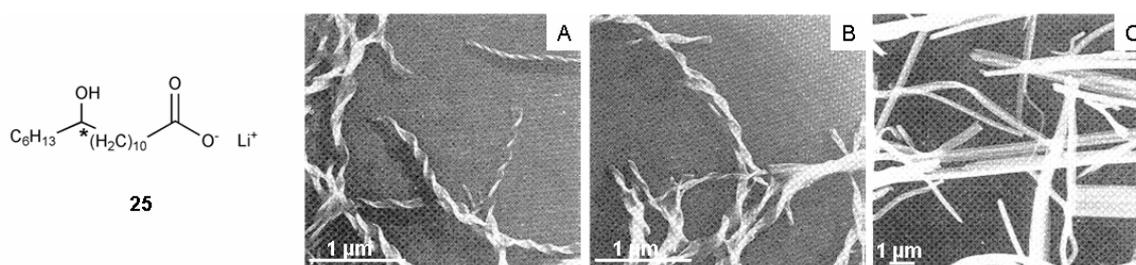


Figure I-20 : Structure moléculaire et photographies présentant les auto-assemblages de molécules **24** après diminution (A) lente de la température (0,08 °C/heure) et (B) rapide (10 °C/heure) [81].

## 6.2.2 Variation de la structure moléculaire

De faibles modifications peuvent affecter le comportement d'auto-assemblage de molécules amphiphiles. Typiquement, la longueur et le nombre d'insaturations des chaînes aliphatiques permettent de moduler les architectures formées<sup>82,83</sup>. Par exemple, nous avons vu précédemment que les molécules **16** et **17** reportées par Fuhrhop<sup>59,60</sup> ne divergent que par la longueur de la chaîne hydrophobe. Si celle-ci est composée de 8 carbones, la formation de rubans hélicoïdaux est observée, alors que des rubans tubulaires sont formés en présence de 11 carbones au sein de la chaîne aliphatique (Figure I-16B, C).

L'hélicité des rubans peut également être modulée par la variation de paramètres moléculaires. L'utilisation d'un énantiomère spécifique (L ou D) de 12-hydroxystéarate en présence de lithium<sup>65,66</sup> (Figure I-21, molécule **25**) permet de contrôler la chiralité de l'hélice formée. Cet exemple a mis en évidence pour la première fois un tel contrôle du sens d'hélicité par la conformation du centre asymétrique du tensioactif. Un sens d'hélicité est associé à un énantiomère particulier. L'énantiomère L permet la formation de fibres torsadées d'hélicité gauche alors que des torsades droites sont formées à partir de l'énantiomère D. Le mélange racémique des deux énantiomères permet la formation de rubans plats ne présentant pas de chiralité supramoléculaire.



**Figure I-21 : Structure moléculaire et photographies présentant les auto-assemblages des énantiomères (A) D- et (B) L-12-hydroxystéarate, et (C) du mélange racémique [65].**

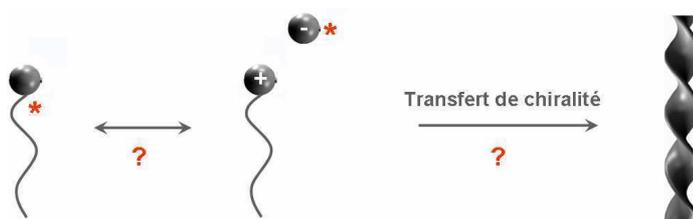
Cependant, quelques exceptions ont été reportées dans la littérature. La coexistence de rubans droits et gauches à partir d'échantillons de tensioactifs énantiomériquement purs<sup>84,85</sup> ou racémiques<sup>86</sup> a notamment été observée.

Les auto-assemblages de molécules achirales en morphologies supramoléculaires chirales ont également été décrits. De cette façon, la diversité d'architectures présentée précédemment apparaît également accessible. Les formations de rubans torsadés<sup>87</sup>, hélicoïdaux<sup>88</sup> et tubulaires<sup>89</sup> ont en effet été observées.

## 7 Conclusion

Ce travail bibliographique permet de dégager principalement deux aspects des auto-assemblages de molécules amphiphiles. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux paramètres structuraux affectant le comportement d'agrégation d'amphiphiles chargés, en particulier en ce qui concerne le phénomène de micellisation. Les forces motrices responsables des auto-assemblages de tensioactifs sont principalement représentées par l'effet hydrophobe et les interactions entre les têtes polaires. D'autres paramètres entrent également en jeu dans ces phénomènes : l'auto-assemblage d'amphiphiles chargés est également modifié par la nature du contre ion complexé. La compréhension de ces mécanismes est fondamentale pour la conception rationnelle de morphologies supramoléculaires modulables par la nature du contre ion.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur les auto-assemblages à une échelle supramoléculaire, en étudiant la diversité morphologique accessible à partir de tels systèmes. En particulier, nous nous sommes intéressés aux morphologies chirales. Toutes les études reportées dans la littérature décrivent la formation de structures chirales à partir de molécules possédant un centre asymétrique au sein même de leur partie amphiphile. Etant donné l'importance de la nature du contre ion sur l'auto-assemblage de tensioactifs chargés, est-il possible d'induire une chiralité supramoléculaire par son biais ? Le transfert de chiralité peut-il être observé dans ce contexte ou nécessite-t-il l'attachement covalent du centre asymétrique (Figure I-22) ?



**Figure I-22 : Est-il possible d'obtenir et de contrôler la formation d'auto-assemblages chiraux de tensioactifs non chiraux *via* la chiralité du contre ion ?**

Si la chiralité supramoléculaire peut être induite à partir d'un contre ion chiral, de quelle manière est-il possible de contrôler ces auto-assemblages ? Quelle est l'incidence des variations moléculaires sur les dimensions des rubans formés avec de tels systèmes ? Des réponses à ces questions seront proposées dans la suite de ce manuscrit.

## Références

- 
- <sup>1</sup> Lehn, J.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 90
  - <sup>2</sup> Ringsdorf, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 113
  - <sup>3</sup> Lehn, J.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 1304
  - <sup>4</sup> Rebek, J.Jr. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 399
  - <sup>5</sup> Martin, T., Obst, U., Rebek, J.Jr. *Science* **1998**, 281, 1842
  - <sup>6</sup> Myers, D. *Surfactant Science and Technology*, Wiley, New York **2006**
  - <sup>7</sup> Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, 78, 330
  - <sup>8</sup> Hofmeister, F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, 24, 247
  - <sup>9</sup> Shkel, I.A., Ballin, J.D., Record, M.T.Jr. *Biochemistry* **2006**, 45, 8411
  - <sup>10</sup> Huang, D.M., Cottin-Bizonne, C., Ybert, C., Bocquet, L. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 98, 177801
  - <sup>11</sup> Collins, K.D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 5553
  - <sup>12</sup> Collins, K.D. *Biophys. J.* **1997**, 72, 65
  - <sup>13</sup> Kiriukhin, M.Y., Collins, K.D. *Biophys. Chem.* **2002**, 99, 155
  - <sup>14</sup> Bauduin, P., Renoncourt, A., Touraud, D., Kunz, W., Ninham, B.W. *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 43
  - <sup>15</sup> Pinna, M.C., Bauduin, P., Touraud, D., Monduzzi, M., Ninham, B.W., Kunz, W. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 16511
  - <sup>16</sup> Renoncourt, A., Vlachy, N., Bauduin, P., Drechsler, M., Touraud, D., Verbavatz, J.M., Dubois, M., Kunz, W., Ninham, B.W. *Langmuir* **2007**, 23, 2376
  - <sup>17</sup> Morgan, J.D., Napper, D.H., Warr, G.G., Nicol, S.K. *Langmuir* **1994**, 10, 797
  - <sup>18</sup> Cassidy, M.A., Warr, G.G. *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 1065
  - <sup>19</sup> Thalody, B., Warr, G.G. *Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 193
  - <sup>20</sup> Saito, S., Moroi, Y., Matuura, R., *J. Colloid Interface Sci.*, **1982**, 88, 578
  - <sup>21</sup> Nishikido, N., Kobayashi, H., Tanaka, M., *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3170
  - <sup>22</sup> Buwalda R. T., Jonker J. M., Engberts J. B. F. N., *Langmuir* **1999**, 15, 1083
  - <sup>23</sup> Buwalda R. T., Engberts J. B. F. N., *Langmuir* **2001**, 17, 1054
  - <sup>24</sup> Chaudhuri, A., Romsted, L.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5052
  - <sup>25</sup> Chaudhuri, A., Loughlin, J.A., Romsted, L.S., Yao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8361
  - <sup>26</sup> Soldi, V., Keiper, J., Romsted, L.S., Cuccovia, I., Chaimovich, H. *Langmuir*, **2000**, 16, 59
  - <sup>27</sup> Geng, Y., Romsted, L.S. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 23629
  - <sup>28</sup> Romsted, L.S. *Langmuir*, **2007**, 23, 414
  - <sup>29</sup> Geng, Y., Romsted, L.S., Menger, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 492
  - <sup>30</sup> Bunton, C.A., Robinson, L.B., Schaak, J., Stam, M.F. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 2346

- <sup>31</sup> Menger, F.M., Littau, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1451
- <sup>32</sup> Zana R. *Gemini Surfactants*, Raoul Zana and Jiang Xia (Ed.), **2004**
- <sup>33</sup> Zana, R., Benrraou, M., Rueff, R. *Langmuir*, **1991**, *7*, 1072
- <sup>34</sup> Oda, R., Huc, I., Candau, S.J. *Chem. Commun.* **1997**, 2105
- <sup>35</sup> Geng, Y., Romsted, L.S. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 23629
- <sup>36</sup> Oda, R., Huc, I., Danino, D., Talmon, Y. *Langmuir* **2000**, *16*, 23629
- <sup>37</sup> Menger, F., Peresykin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5340
- <sup>38</sup> Sharma, V., Borse, M., Aswal, V.K., Pokhriyal, N.K., Joshi, J.V., Goyal, P.S., Devi, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *277*, 450
- <sup>39</sup> De, S., Aswal, V., Goyal, P., Bhattacharya, S. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6152
- <sup>40</sup> Menger, F.M., Keiper, J.S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 1906
- <sup>41</sup> Benrraou, M., Bales, B.L., Zana, R., *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 13432
- <sup>42</sup> Zana, R., Benrraou, M., Bales, B.L., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 18195
- <sup>43</sup> Sabine Manet, Effet de contre ion sur les propriétés d'amphiphiles cationiques. *Thèse de Doctorat*, **2007**
- <sup>44</sup> Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans 2* **1976**, *72*, 1525
- <sup>45</sup> Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *470*, 185
- <sup>46</sup> Mitchell, D.J., Ninham, B.W. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans 2* **1981**, *77*, 601
- <sup>47</sup> Israelachvili, J.N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: London, 1985
- <sup>48</sup> Kunitake, T., Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3860
- <sup>49</sup> Kunitake, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 709
- <sup>50</sup> Kunitake, T., Okahata, Y., Shimomura, M., Yasunami, S., Takarabe, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5401
- <sup>51</sup> Okahata, Y., Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5231
- <sup>52</sup> Nakashima, N., Asakuma, S., Kim, J.M., Kunitake, T. *Chem. Lett.* **1984**, 1709
- <sup>53</sup> Nakashima, N., Asakuma, S., Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 509
- <sup>54</sup> Kunitake, T., Yamada, N. *Chem. Commun.* **1986**, 655
- <sup>55</sup> Brizard, A., Oda, R., Huc, I. *Top. Curr. Chem.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2005**, *256*, 167
- <sup>56</sup> McCrea, J.F., Angerer, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *42*, 357
- <sup>57</sup> Ramanathan, N., Currie, A.L., Colvin, J.R. *Nature* **1961**, *190*, 779
- <sup>58</sup> Köning, J., Boettcher, C., Winkler, H., Zeitler, E., Talmon, Y., Fuhrhop, J.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 693
- <sup>59</sup> Fuhrhop, J.H., Schnieder, P., Boekema, E., Helfrich, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2861
- <sup>60</sup> Fuhrhop, J.H., Boettcher, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1768
- <sup>61</sup> Fuhrhop, J.-H., Helfrich, W. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1565
- <sup>62</sup> Helfrich, W., Prost, J. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3065
- <sup>63</sup> Selinger, J.V., Spector, M.S., Schnur, J.M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7158.
- <sup>64</sup> John, G., Jung, J.H., Minamikawa, H., Yoshida, K., Shimizu, T. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5494
- <sup>65</sup> Tachibana, T., Kambara, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3015
- <sup>66</sup> Tachibana, T., Kayama, S., Takeno, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3422
- <sup>67</sup> Oda, R., Huc, I., Candau, S.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2689
- <sup>68</sup> Yager, P., Schoen, P.E. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1984**, *106*, 371

- 
- <sup>69</sup> Georger, J.H., Singh, A., Price, R.R., Schnur, J.M., Yager, P., Schoen, P.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6175
- <sup>70</sup> Yanagawa, H., Ogawa, Y., Furuta, H., Tsuno, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, *111*, 4567
- <sup>71</sup> Schnur, J.M. *Nature* **1993**, *262*, 1669
- <sup>72</sup> Schnur, J.M., Ratna, B.R., Selinger, J.V., Singh, A., Jyothi, G., Easwaran, K.R.K. *Science* **1994**, *264*, 945
- <sup>73</sup> Jung, J.H., John, G., Yoshida, K., Shimizu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10674
- <sup>74</sup> Shimizu, T., Masuda, M., Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401
- <sup>75</sup> Chiruvolu, S., Warriner, H.E., Naranjo, E., Idziak, S.H.J., Rädler, J.O., Plano, R.J., Zasadzinski, J.A., Safinya, C.R. *Science* **1994**, *266*, 1222
- <sup>76</sup> Lin, Y.C., Kachar, B., Weiss, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5542
- <sup>77</sup> Boettcher, C., Schade, B., Fuhrhop, J.H. *Langmuir* **2001**, *17*, 873
- <sup>78</sup> Koumoto, K., Yamashita, T., Kimura, T., Luboradzki, T., Shinkai, S. *Nanotechnology* **2001**, *12*, 25
- <sup>79</sup> Ratna, B.R., Baral-Tosh, S., Kahn, B., Schnur, J.M., Rudolph, A.S. *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *63*, 47
- <sup>80</sup> Murata, K., Aoki, M., Suzuki, T., Harada, T., Kawabata, H., Komori, T., Ohseto, F., Ueda, K., Shinkai, S. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 6664
- <sup>81</sup> Thomas, B., Safinya, C.R., Plano, R.J., Clark, N.A. *Science* **1995**, *267*, 1635
- <sup>82</sup> Hanabusa, K., Maesaka, Y., Kimura, M., Shirai, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2385
- <sup>83</sup> Becerril, J., Burguete, M.I., Escuder, B., Luis, S.V., Miravet, J.F., Querl, M. *Chem. Commun.* **2002**, 738
- <sup>84</sup> Zastavker, Y.V., Asherie, N., Lomakin, A., Pande, J., Donovan, J.M., Schnur, J.M., Benedek, G.B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 7883
- <sup>85</sup> Thomas, B.N., Lindemann, C.M., Corcoran, R.C., Cotant, C.L., Kirsch, J.E., Persichini, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 122
- <sup>86</sup> Gulik-Krzywicki, T., Fouquey, C., Lehn, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 163
- <sup>87</sup> Lindsell, W.E., Preston, P.N., Seddon, J.M., Rosair, G.M., Woodman, T.A.J. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1572
- <sup>88</sup> Yang, W., Chai, X., Chi, L., Liu, X., Cao, Y., Lu, R., Jiang, Y., Tang, X., Fuchs, H., Li, T. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1144
- <sup>89</sup> Pakhomov, S., Hammer, R.P., Mishra, B.K., Thomas, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3040

## **Chapitre 2 :**

### **Etude de complexes gemini – contre ions en phase gaz**

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de la rédaction d'une publication.

Aimé, C., Plet, B., Manet, S., Schmitter, J.M., Huc, I., Sauers, R., Romsted, L.S., Oda, R.  
*Competing Gas Phase Reactions of Gemini Surfactants with Anionic counterions. Mass Spectrometry and Ab Initio Calculations correlation.* En préparation.

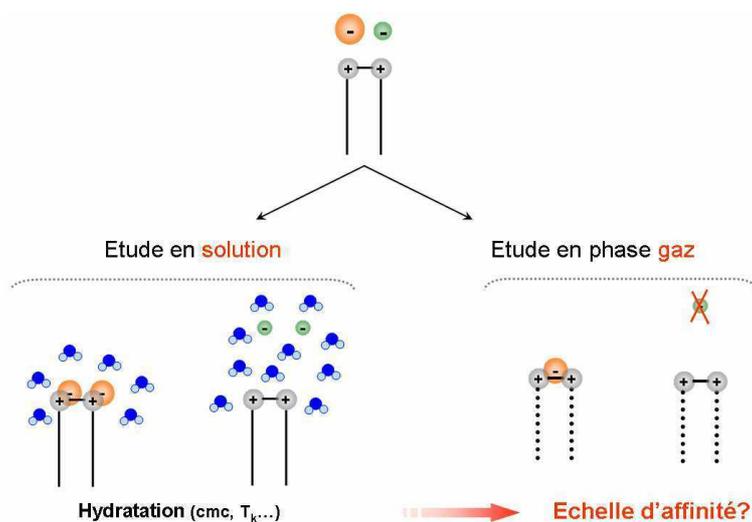


## 1 Introduction

Un des principaux enjeux des thématiques développées au sein de notre équipe consiste à comprendre et à contrôler les phénomènes d'auto-assemblage de molécules amphiphiles. Particulièrement, nous développons des molécules dicationiques (gemini) complexées à des contre anions. Différents paramètres physico-chimiques contrôlent leur auto-organisation dans l'eau, dont le principal est l'effet hydrophobe. Cependant, le travail bibliographique présenté au chapitre précédent illustre l'influence de la structure des ions sur les assemblages de molécules chargées. La spécificité d'interaction amphiphile - contre ion joue un rôle clé dans l'acquisition des propriétés et des morphologies des auto-assemblages. Il est ainsi essentiel d'étudier cette spécificité ionique et sa contribution dans l'auto-organisation des agrégats.

Si les méthodes présentées dans le chapitre précédent utilisent le milieu aqueux, une stratégie différente peut également être envisagée. En étudiant ces complexes en phase gaz, il est possible de s'affranchir de l'effet hydrophobe et de se concentrer sur l'interaction électrostatique. La spectrométrie de masse est un outil qui permet de se placer dans un tel contexte, et qui a prouvé son efficacité dans l'étude des interactions non covalentes pour de nombreux systèmes<sup>1</sup> : interactions entre protéines<sup>2</sup> et stabilité de complexes d'acides nucléiques<sup>3,4</sup> notamment. Ces complexes résultent d'interactions faibles (liaisons électrostatiques, hydrogène, de Van der Waals, effet hydrophobe) et nécessitent des conditions opératoires optimisées pour la conservation des complexes non covalents. Cette approche requiert l'utilisation de sources d'ionisation dites « douces »<sup>5</sup>, transférant le moins d'énergie interne aux assemblages. Dans ce cadre, l'ionisation par électronébulisation est couramment utilisée. Dans le contexte des colloïdes, l'ionisation par électronébulisation a ainsi permis de mettre en évidence la conservation de la structure micellaire en phase gaz<sup>6,7</sup>.

Dans ce chapitre, nous utiliserons cette technique pour évaluer la stabilité de gemini complexés à différents contre ions. Le principe de cette stratégie repose schématiquement sur le fait qu'il est possible de détecter en phase gaz un complexe de forte affinité. Si un complexe d'affinité plus faible entre les deux partenaires ioniques (contre ion très hydraté par exemple) n'est pas détecté, il semble alors possible de déterminer une échelle d'affinité électrostatique des différents contre ions pour le gemini (Figure II-1).



**Figure II-1 : Représentation schématique des stratégies d'études parallèles de gemini - contre ions en solution et en phase gaz. Est-il possible de distinguer les contre ions plus ou moins confinés en solution par leur observation (ou non) en phase gaz ?**

L'étude de gemini en phase gaz pose de nouveaux problèmes, car le comportement des molécules est différent dans chacun des milieux (solution et gaz). Les interactions faibles se trouvent très largement amplifiées en phase gaz du fait de l'absence de molécules d'eau écrantant les interactions électrostatiques. Ce projet nécessite d'avoir recours à des techniques analytiques complémentaires. Une collaboration impliquant différentes équipes de recherche à l'IECB et aux Etats-Unis a ainsi été mise en place. Lawrence S. Romsted à l'université de Rutgers, aux Etats-Unis, participe à ce projet en tant que spécialiste des phénomènes de spécificité ionique au sein de systèmes amphiphiles, et dans un futur proche pour la détermination des concentrations interfaciales des contre ions. Une étude de calcul quantique *ab initio* a été menée en parallèle de nos expériences par Ronald Sauers, également à l'université de Rutgers. Au cours de cette étude, mon travail a consisté à étudier une série de complexes gemini – contre ions en phase gaz par spectrométrie de masse. Ces expériences ont été possibles grâce à l'aide précieuse de l'équipe de spectrométrie de masse de l'IECB dirigée par le Professeur Jean-Marie Schmitter, et particulièrement grâce à Benoît Plet, en doctorat dans cette équipe.

En combinant les études en phase gaz et en solution nous essayons de comprendre l'origine de la spécificité ionique et des facteurs contribuant à l'établissement de la série de Hofmeister des ions. L'enjeu de ce projet consiste à développer une approche rationnelle pour le contrôle des morphologies d'auto-assemblage de molécules amphiphiles ioniques.

## 2 Matériel et méthode

### 2.1 Spectrométrie de masse et résolution en énergie

#### 2.1.1 Ionisation par électronébulisation et piège ionique

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un piège ionique couplé à une source d'ionisation par électronébulisation (Electrospray). Cette technique d'ionisation produit ou transmet des ions d'une phase condensée liquide vers la phase gazeuse en entités isolées. Les ions sont générés depuis une solution diluée traversant un petit orifice quand une haute tension lui est appliquée. La source d'ionisation par électronébulisation peut être considérée comme une cellule électrolytique. Le champ électrique que subit le liquide impose un mouvement électrophorétique des ions. Par exemple, en mode positif, les cations vont vers la surface, et les anions migrent vers le capillaire métallique (Figure II-2). Lorsque les répulsions coulombiennes des charges dépassent la tension de surface du liquide, les gouttes chargées se scindent en de multiples petites gouttes dont la densité surfacique de charge a diminué. Sous l'action d'un courant d'azote et de la température de la source notamment, ces gouttelettes vont être davantage désolvatées pour produire des ions unimoléculaires.

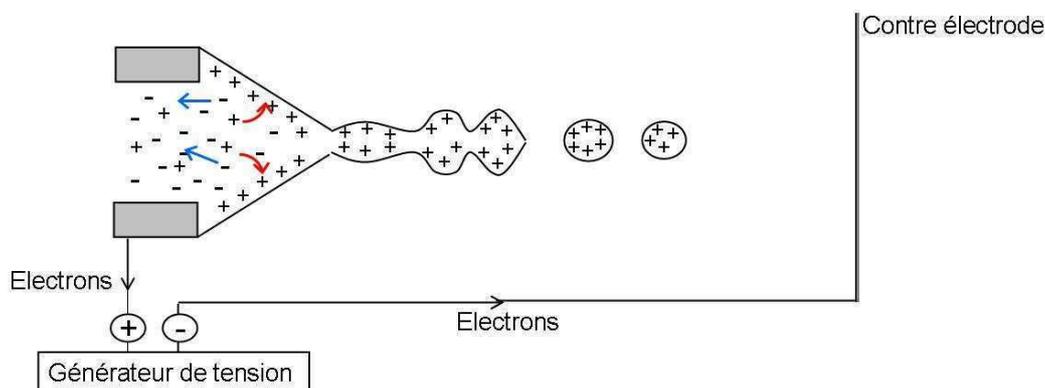


Figure II-2 : Représentation schématique du principe d'ionisation par électronébulisation.

La source, orthogonale au reste de l'appareil, est suivie d'un capillaire de transfert métallique (CT) chauffé entre 20 et 400 °C, d'une quinzaine de centimètres de long qui permet de poursuivre la désolvatation des ions par évaporation du solvant. Ce capillaire est prolongé d'une lentille tube (LT) permettant de focaliser les ions issus du capillaire, qui seront accélérés par deux octopôles (O1 et O2) pour entrer dans l'analyseur : le piège ionique (PI) (Figure II-3).

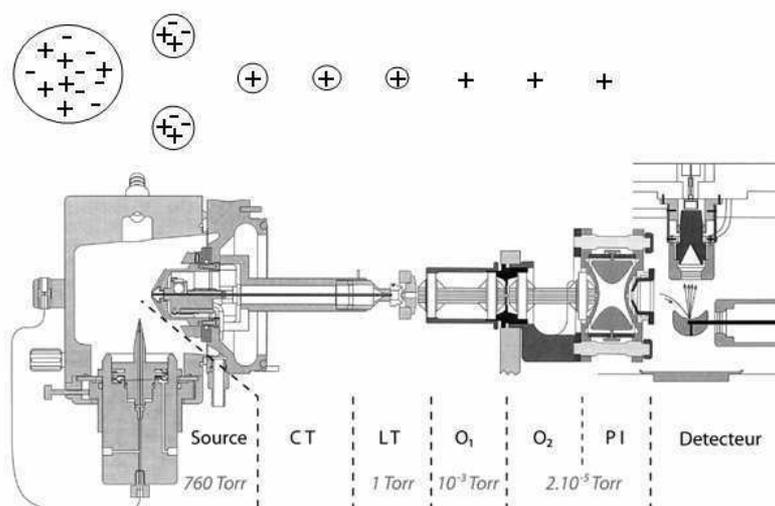


Figure II-3 : Schéma en coupe du dispositif utilisé au cours de nos expériences de spectrométrie de masse.

CT = Capillaire de Transfert, LT = Lentille Tube, O = Octopôle, PI = Piège Ionique.

Le piège ionique est constitué de trois électrodes : une électrode circulaire et deux électrodes chapeau (Figure II-4). A l'entrée de l'analyseur, les ions passent à travers l'une des électrodes chapeau. Leur capture est facilitée par la présence d'un gaz tampon (hélium). Une fois piégés dans l'analyseur, un champ électrique appliqué leur impose une trajectoire stable. Le nuage d'ions est focalisé au centre du piège ionique quadripolaire par collision avec l'hélium pendant généralement 1 à 30 ms. Une fois piégés dans le potentiel quadripolaire, la déstabilisation des trajectoires provoque leur éjection à travers la deuxième électrode chapeau vers le détecteur.

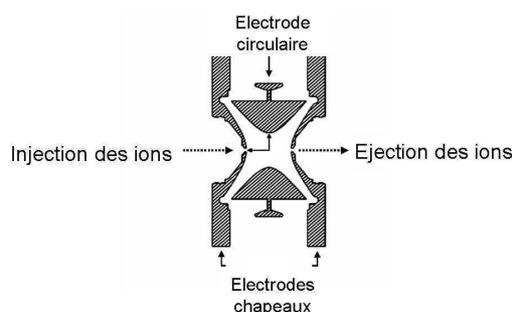


Figure II-4 : Représentation schématique en coupe d'un piège ionique quadripolaire.

Lorsque les ions sont piégés dans l'analyseur, il est possible d'isoler une espèce de rapport  $m/z$  donné par application d'une radiofréquence aux électrodes. De cette façon, il est possible d'éjecter tous les ions du piège, à l'exception de l'ion d'intérêt. Il s'agit d'appliquer une large gamme de fréquences possédant une rupture au niveau de la fréquence de résonance de l'ion sélectionné. Une deuxième étape d'analyse peut être réalisée sur l'ion isolé. Cette approche est appelée spectrométrie de masse en tandem, également appelée SM/SM ou SM2.

Cette dernière notation sera adoptée dans la suite de ce manuscrit. Une fois l'espèce d'intérêt isolée il est possible d'augmenter son énergie interne par excitation résonante. Cette technique consiste à appliquer à l'électrode chapeau un potentiel de faible amplitude dont la fréquence est égale à celle de l'oscillation de l'ion. Par conséquent, les ions subissent des collisions avec les atomes du gaz tampon. Par conversion de l'énergie translationnelle en énergie vibrationnelle, l'énergie interne de l'ion augmente, provoquant sa fragmentation.

L'Electrospray est un mode d'ionisation très répandu en spectrométrie de masse. Cette méthode d'ionisation douce permet le transfert de complexes non covalents intacts en phase gazeuse et d'en étudier leur stabilité par SM2.

### 2.1.2 Principe de l'expérience

Nous nous sommes intéressés à certains des contre ions étudiés précédemment en solution par Sabine Manet. Dans notre cas, la longueur des chaînes aliphatiques est de 16 carbones. La diversité des molécules étudiées est augmentée en faisant varier la taille de l'espaceur (2, 3, 4 et 6 carbones) (Figure II-5). Etant donné que la variation de l'espaceur influence les morphologies d'auto-assemblage, nous nous intéresserons à l'effet de son augmentation sur l'interaction électrostatique avec le contre ion. Dans cette étude, la longueur des chaînes n'a pas été variée étant donné l'absence d'effet hydrophobe en phase gaz.

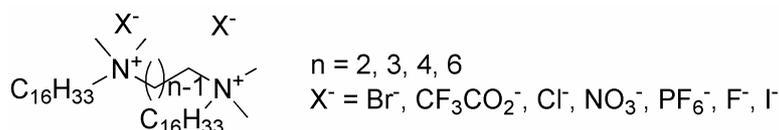


Figure II-5 : Structure moléculaire des gemini – contre ions étudiés par spectrométrie de masse.

Dans le but d'observer les gemini et leurs dérivés, toutes les expériences ont été réalisées en mode positif. Dans ces conditions, deux espèces sont principalement observées<sup>a</sup> :

- le **gemini sans contre ion**, dicationique, noté  $\text{M}^{2+}$ . Etant donné que le signal caractéristique d'une espèce apparaît à une valeur égale au rapport  $m/z$  ( $m$  étant la masse molaire et  $z$  le nombre de charge), le gemini est attendu à une valeur égale à la moitié de sa masse molaire.
- une espèce monocationique résultant de la complexation électrostatique du **gemini avec un seul contre ion**, notée  $\text{M}^{2+}\text{X}^-$ . Dans ce cas,  $z = 1$  et le pic est attendu à une valeur

<sup>a</sup> Le gemini complexé à deux contre ions n'est pas observé étant donnée sa charge globalement neutre.

égale à la masse molaire du complexe. Dans la suite des expériences, nous nous intéresserons particulièrement à cette espèce.

Après obtention d'un spectre représentatif des ions présents en phase gaz ( $M^{2+}$  et  $M^{2+}X^-$ ), le complexe d'intérêt, que l'on appellera **précurseur**, est isolé afin de coupler une seconde étape d'analyse (SM2). L'énergie interne du précurseur est augmentée par collision avec l'hélium afin d'étudier son comportement. Au-delà d'une certaine énergie dépendante du précurseur, l'espèce se dissocie et on enregistre le spectre des différents fragments obtenus (dès lors qu'ils possèdent une charge, dans notre cas positive) (Figure II-6).

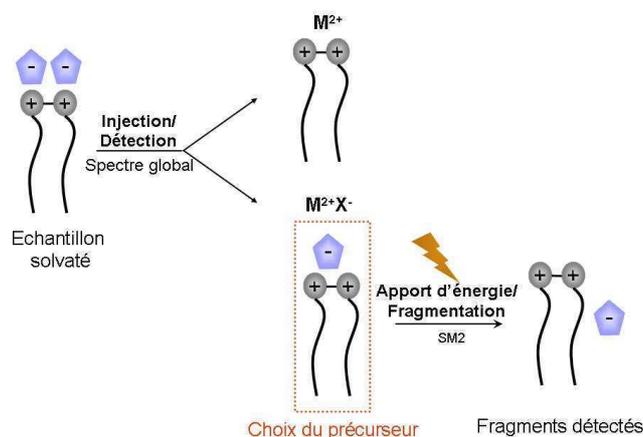
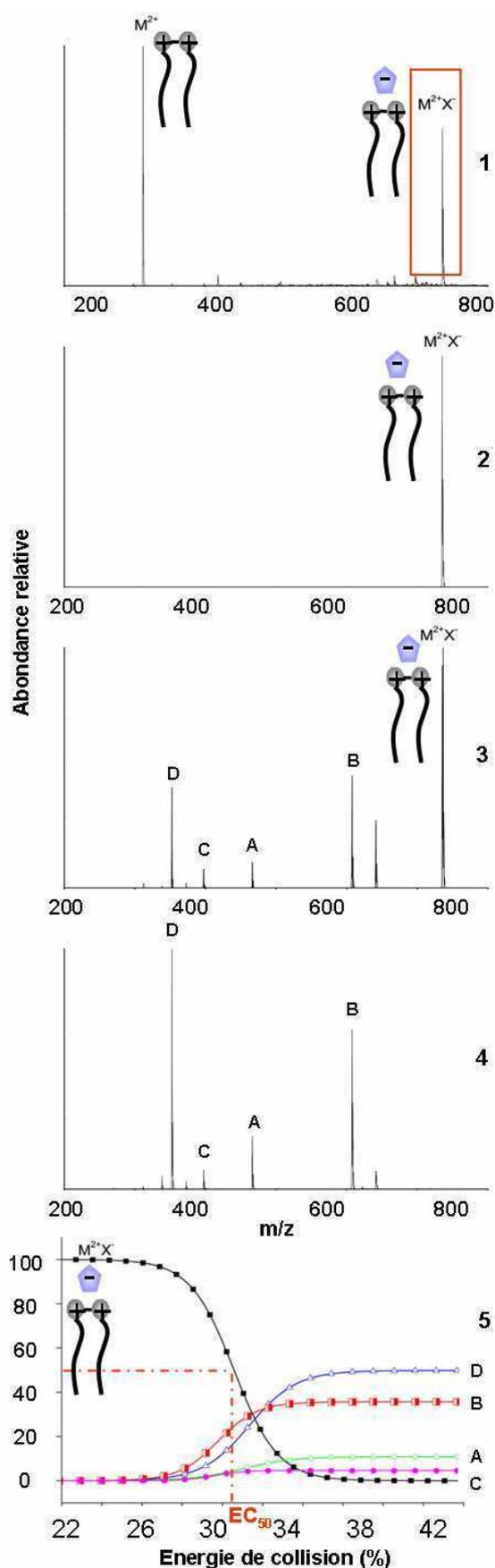


Figure II-6 : Représentation schématique du déroulement de l'expérience.

Dans le cadre de nos expériences, le précurseur isolé est l'espèce formée par le gemini complexé à un contre ion,  $M^{2+}X^-$ . Si l'apport d'énergie permet la dissociation du complexe, il est possible de classer les contre ions par ordre d'affinité électrostatique pour le gemini.

### 2.1.3 Spectrométrie de masse résolue en énergie

Pour obtenir des informations quantitatives, nous avons augmenté l'énergie de collision de façon progressive et enregistré simultanément la disparition du complexe précurseur et l'apparition des fragments résultant pour chaque pallier d'énergie. Cette méthode est appelée spectrométrie de masse résolue en énergie (SMRE). Il s'agit en fait d'une succession d'expériences de SM2 réalisées à des énergies de collision croissantes. En intégrant les spectres obtenus pour chaque valeur d'énergie de collision, on obtient une courbe appelée courbe de rupture (Figure II-7.5). Cette courbe nous permet de suivre la disparition du précurseur et l'apparition simultanée des fragments en fonction de l'énergie. Le déroulement de l'expérience est présenté Figure II-7, de l'injection de l'échantillon et l'obtention d'un spectre représentatif des espèces en phase gaz à la disparition totale du précurseur.



1. **Spectre** obtenu après injection d'une solution de gemini 16-6-16( $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ )<sub>2</sub>. Les pics observés correspondent aux espèces  $\text{M}^{2+}$ , gemini (2+), et  $\text{M}^{2+}\text{X}^-$ , gemini complexé à un contre ion  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$  (1+).

2. **Spectre obtenu en mode SM2** après sélection du précurseur  $\text{M}^{2+}\text{X}^-$  (gemini 16-6-16 complexé à un contre ion  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ). L'énergie de collision appliquée est la même qu'en A.

3. L'augmentation de l'énergie de collision provoque la fragmentation du précurseur : les premiers fragments apparaissent. A ce stade, le précurseur n'a pas encore disparu.

4. L'énergie de collision est encore augmentée, jusqu'à disparition totale du précurseur. A ce stade, seuls les fragments produits sont observés.

5. **Courbe de rupture** intégrant les spectres obtenus en SM2 pour chaque valeur d'énergie de collision. Cette courbe permet de suivre la disparition du précurseur et l'apparition simultanée des fragments en fonction de l'énergie de collision.

Figure II-7 : Différents spectres obtenus au cours de l'expérience. Les lettres A, B, C, et D désignent les fragments obtenus au cours de nos expériences. Leur structure sera détaillée par la suite.

## 2.2 Traitement des données

Dans cette étude, la structure des gemini – contre ions est variée *via* deux paramètres : la nature du contre ion et la longueur de l'espaceur. A chaque fois qu'un paramètre sera modifié, on s'attachera à étudier de façon systématique toutes les combinaisons possibles en changeant le deuxième paramètre. Pour une longueur d'espaceur donnée, les complexes mettant en jeu chacun des contre ions de l'étude seront comparés. A l'inverse, pour un même contre ion, les quatre longueurs d'espaceur seront étudiées.

Les données de ces expériences seront traitées et interprétées de deux façons :

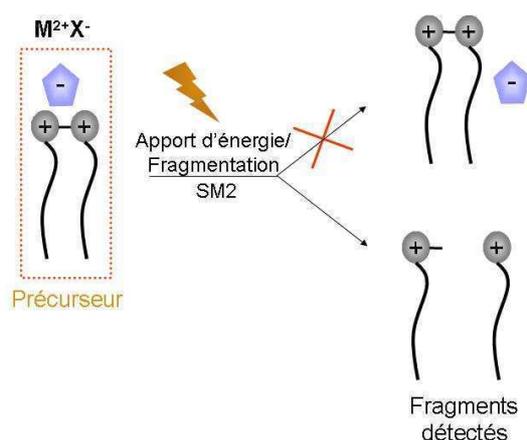
- Etude des fragments obtenus lorsque la totalité du précurseur a disparu.
- Etude de l'énergie de collision nécessaire à la dissociation du précurseur, quelles que soient les espèces produites. La courbe de rupture obtenue en fin d'expérience nous permet d'obtenir une mesure de l'énergie nécessaire à la fragmentation de 50 % du précurseur. On notera cette énergie **EC<sub>50</sub>** (pour Energie de Collision à 50 %). Cette mesure nous permet d'évaluer la stabilité du complexe gemini – contre ion et la facilité avec laquelle il se dissocie, en fonction de la longueur de l'espaceur et du contre ion.

Ces résultats seront confrontés avec les calculs quantiques obtenus en parallèle à l'université de Rutgers avec certains de nos gemini.

## 3 Etude d'amphiphiles géminés en phase gaz

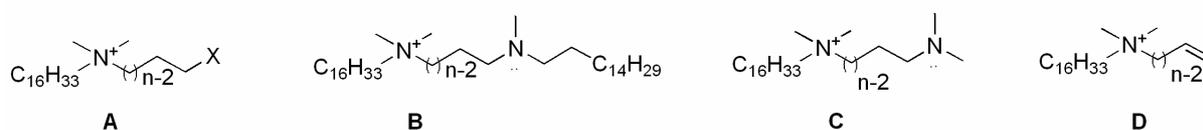
### 3.1 Fragmentation d'un gemini

Une fois le complexe gemini – contre ion isolé, son énergie interne est augmentée. Suite à cette élévation, les premiers résultats ont montré que le gemini ne se dissocie pas mais se casse, des liaisons covalentes sont rompues, produisant des fragments caractéristiques (Figure II-8). En phase gaz, la rupture d'une liaison covalente est favorisée par rapport à la dissociation du complexe et à la perte du contre ion.



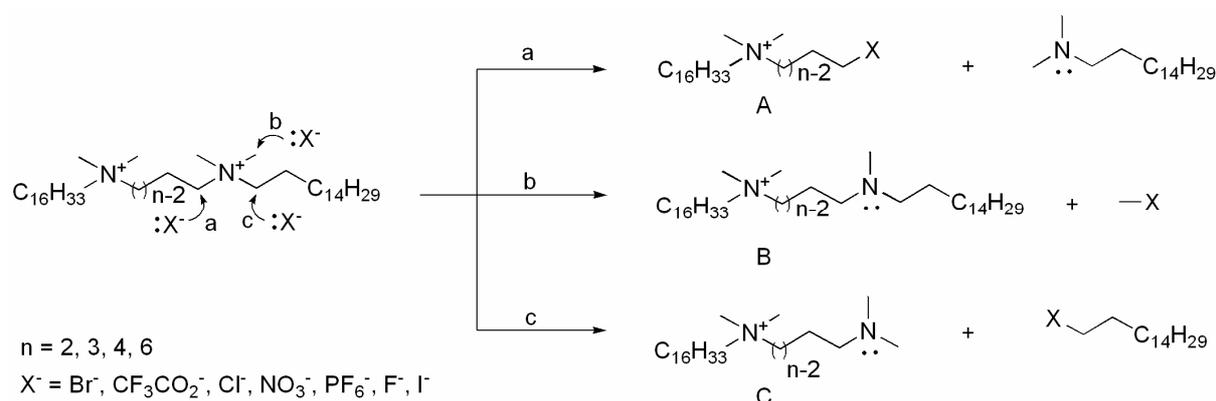
**Figure II-8 : Représentation schématique des premiers résultats obtenus : la fragmentation (rupture d'une liaison covalente) du gemini est favorisée par rapport à la dissociation du complexe.**

L'énergie de collision est ensuite augmentée jusqu'à disparition totale du précurseur. Pour une longueur d'espaceur donnée, quatre fragments différents sont présents de façon récurrente. A chaque longueur d'espaceur correspond un jeu de quatre fragments. A partir de la masse de ces fragments, de leur charge et des hypothèses de réactions ayant pu les produire, les structures moléculaires présentées sur la Figure II-9 ont été déterminées.

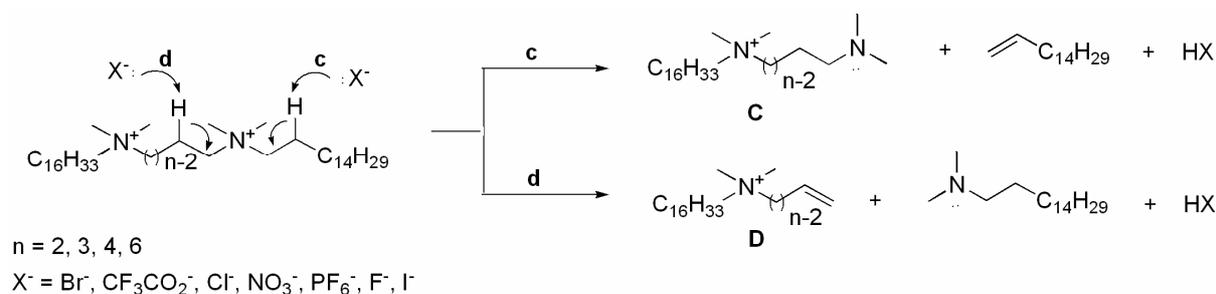


**Figure II-9 : Structures moléculaires des fragments observés après disparition totale du précurseur  $M^{2+}X^-$ .**

Ces fragments sont des produits de réactions de substitution nucléophile ( $S_N2$ ) ou d'élimination ( $E2$ ) sur le complexe  $M^{2+}X^-$ . Suivant la structure de ce complexe, les produits de substitution, d'élimination, ou des deux réactions sont observés. Les fragments **A** et **B** sont issus de réactions de substitution nucléophile (Schéma II-1). Le fragment **D** provient d'une réaction d'élimination (Schéma II-2). Le fragment **C** peut quant à lui provenir soit d'une réaction de substitution nucléophile, soit d'une réaction d'élimination. En effet, on observe sur ces schémas que ces deux réactions produisent des fragments de structure moléculaire identique. Nous ne distinguerons pas les deux fragments et ne les prendrons pas en compte dans la suite de cette étude. Etant donné la faible proportion de fragments **C** observée, cette hypothèse ne constitue pas une approximation très importante.



**Schéma II-1 : Schéma illustrant les trois différentes réactions de substitution nucléophile (en lettres minuscules). Les lettres majuscules représentent les espèces obtenues par chacune des réactions.**



**Schéma II-2 : Schéma illustrant les deux différentes réactions d'élimination (en lettres minuscules). Les lettres majuscules représentent les espèces obtenues par chacune des réactions.**

Les réactions de substitution ont été très étudiées en solution<sup>8</sup>. En phase gaz, depuis les premiers travaux concernant l'acidité et la basicité dans ce contexte<sup>9,10</sup>, les réactions de substitution nucléophile<sup>11,12</sup> et d'élimination<sup>13,14</sup>, ainsi que la compétition entre ces deux réactions<sup>15</sup> ont été étudiées par spectrométrie de masse utilisant un piège ionique notamment. Particulièrement, Gross et Williams<sup>16</sup> ont étudié les réactions de  $S_N2$  en phase gaz au sein de complexes formés de tétraalkylammonium et d'halogénures. Par rapport à la majorité des systèmes présentés dans la littérature, les gemini apparaissent particulièrement intéressants pour cette étude par spectrométrie de masse car leur état doublement chargé permet la formation de fragments également chargés directement observables par spectrométrie de masse, sans étape d'identification supplémentaire.

## 3.2 Compétition entre substitution nucléophile et élimination

Pour identifier les paramètres contrôlant l'entrée dans l'une ou l'autre des voies de fragmentation, nous avons étudié quatre longueurs d'espaceur ( $n = 2, 3, 4$  et  $6$  carbones) pour chaque contre ion ( $\Gamma$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ) (Figure II-5). Lorsque l'énergie de fragmentation est suffisamment élevée pour provoquer la disparition totale du précurseur, l'intégralité des fragments observés résulte soit d'élimination, soit de substitution nucléophile. Le calcul des proportions de chaque espèce permet d'obtenir une mesure de la tendance d'un gemini à se fragmenter par élimination ou substitution suivant sa structure. Considérons dans un premier temps la répartition des populations de fragments pour chaque contre ion complexé (Figure II-10).

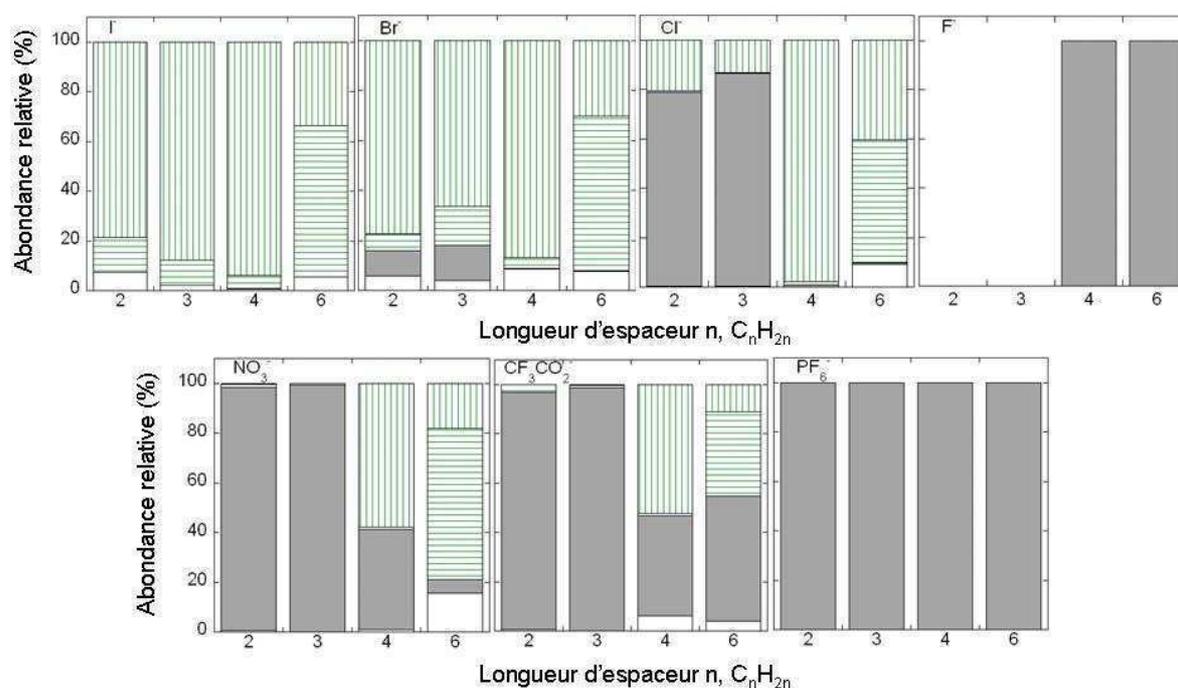
### 3.2.1 E2 / S<sub>N</sub>2, en fonction du contre ion complexé

Les gemini  $\Gamma$  ne se fragmentent que par substitution, quelle que soit la longueur de l'espaceur. A l'inverse, les gemini  $\text{F}^-$ , pour des longueurs d'espaceur de  $4$  et  $6$  carbones ne se fragmentent que par élimination. Les gemini  $\text{F}^-$  ( $n = 2, 3$ ) présentent un cas particulier qui sera développé par la suite. Le gemini  $\text{PF}_6^-$  ne se fragmente également que par élimination quelle que soit la longueur  $n$  d'espaceur considérée.

En ce qui concerne la majorité des contre ions étudiés, les produits d'E2 et de S<sub>N</sub>2 sont observés de façon concomitante. Leur abondance relative varie en fonction de la longueur de l'espaceur. Les gemini  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$  présentent des fragments issus de réactions d'élimination pour les quatre longueurs d'espaceur étudiées, avec de fortes proportions de S<sub>N</sub>2 pour les espaceurs  $4$  et  $6$ . Les gemini  $\text{Cl}^-$  présentent une majorité de produits d'élimination pour les espaceurs  $2$  et  $3$  et presque uniquement des produits de substitution pour les espaceurs  $4$  et  $6$ . La fragmentation des gemini  $\text{Br}^-$  se fait majoritairement par S<sub>N</sub>2, bien que l'on observe une petite proportion de produits d'E2 avec les espaceurs  $2$  et  $3$ .

D'une manière générale, nous observons une faible proportion du produit **C** (représenté par les sections blanches sur la Figure II-10), validant ainsi l'hypothèse formulée précédemment. De plus, si l'on considère les produits **A** et **B** résultant des voies **a** et **b** de substitutions nucléophiles, on observe une faible proportion de produits **B** (sections hachurées horizontalement sur la Figure II-10) pour des longueurs d'espaceur de  $2, 3$  et  $4$  carbones, alors que ce produit devient majoritaire par rapport au produit de substitution **A** lorsque que la

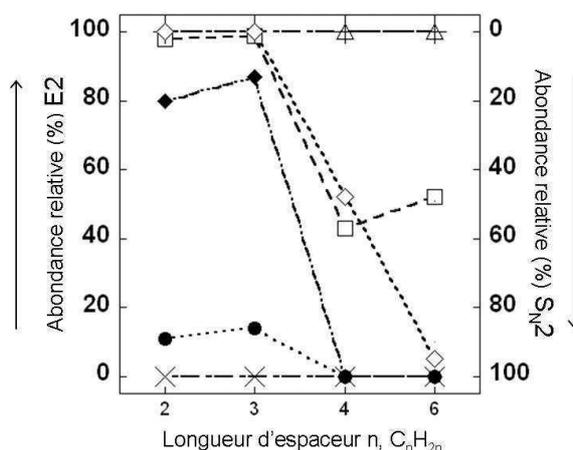
longueur d'espaceur est augmentée à 6 carbones. La diminution de la proportion de produit **A** (sections hachurées verticalement sur la Figure II-10) peut s'expliquer par le fait que le carbone de l'espaceur en position  $\alpha$  de l'ammonium quaternaire possède un caractère d'autant plus électro-négatif que l'espaceur est long. De ce fait, la probabilité d'attaque nucléophile sur ce carbone diminue, malgré un encombrement stérique réduit, et donc plus favorable.



**Figure II-10 : Abondance relative des produits de substitution nucléophile (A : régions hachurées verticalement, B : régions hachurées horizontalement) et d'élimination (régions grisées) observés à la suite de la fragmentation du précurseur  $M^{2+}X^{-}$  en fonction de la longueur de l'espaceur, pour chaque contre ion étudié. Les sections blanches représentent le produit C et ne seront pas considérées ici.**

### 3.2.2 E2 / S<sub>N</sub>2, en fonction de la longueur de l'espaceur

Considérons désormais les variations de proportions de fragments observées en fonction de la longueur de l'espaceur. La Figure II-11 montre une diminution de l'abondance relative des produits d'élimination pour des longueurs d'espaceur croissantes (excepté dans le cas des contre ions F<sup>-</sup> et PF<sub>6</sub><sup>-</sup> qui ne se fragmentent que par élimination).



**Figure II-11 : Abondance relative des fragments observés suite à la fragmentation du précurseur  $M^{2+}X^{-}$  en fonction de la longueur de l'espaceur et du contre ion ( $Br^{-}$  ●;  $CF_3CO_2^{-}$  □;  $Cl^{-}$  ◆;  $NO_3^{-}$  ◇;  $PF_6^{-}$  +;  $F^{-}$  Δ;  $I^{-}$  ×).**

Quel que soit le contre ion, l'augmentation de la taille de l'espaceur induit une augmentation de la propension des gemini – contre ions à se fragmenter par S<sub>N2</sub> (Figure II-11). Le gemini CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> suit également cette tendance, même s'il apparaît que la proportion de fragments issus de S<sub>N2</sub> est légèrement supérieure pour n = 4 que pour n = 6.

### 3.3 Energie de fragmentation du précurseur $M^{2+}X^{-}$

Connaissant les tendances des différents gemini - contre ions à se fragmenter par S<sub>N2</sub> ou E2 en fonction de la nature du contre ion et de la longueur de l'espaceur, nous nous intéressons désormais à l'énergie nécessaire à cette fragmentation, quelle que soit la voie empruntée. Cette énergie ne possède pas d'unité car les EC appliquées sont des énergies normalisées par rapport à la masse molaire des espèces isolées en SM2. De ce fait, elles ne peuvent pas être comparées avec l'énergie de collision appliquée au moment de l'injection.

La Figure II-12 présente les énergies de collision nécessaires à la fragmentation de 50 % du précurseur  $M^{2+}X^{-}$  isolé (EC<sub>50</sub>), en fonction des deux paramètres étudiés. Deux cas se distinguent sur ce graphique : le gemini PF<sub>6</sub><sup>-</sup> présente les EC<sub>50</sub> les plus élevées pour chaque espaceur, alors que les gemini F<sup>-</sup> (n = 4 et 6 carbones) présentent les plus faibles EC<sub>50</sub>.

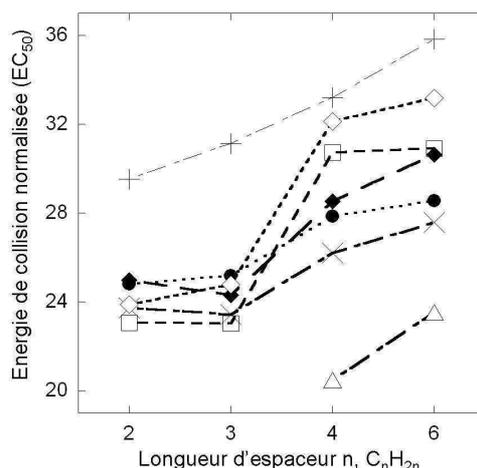
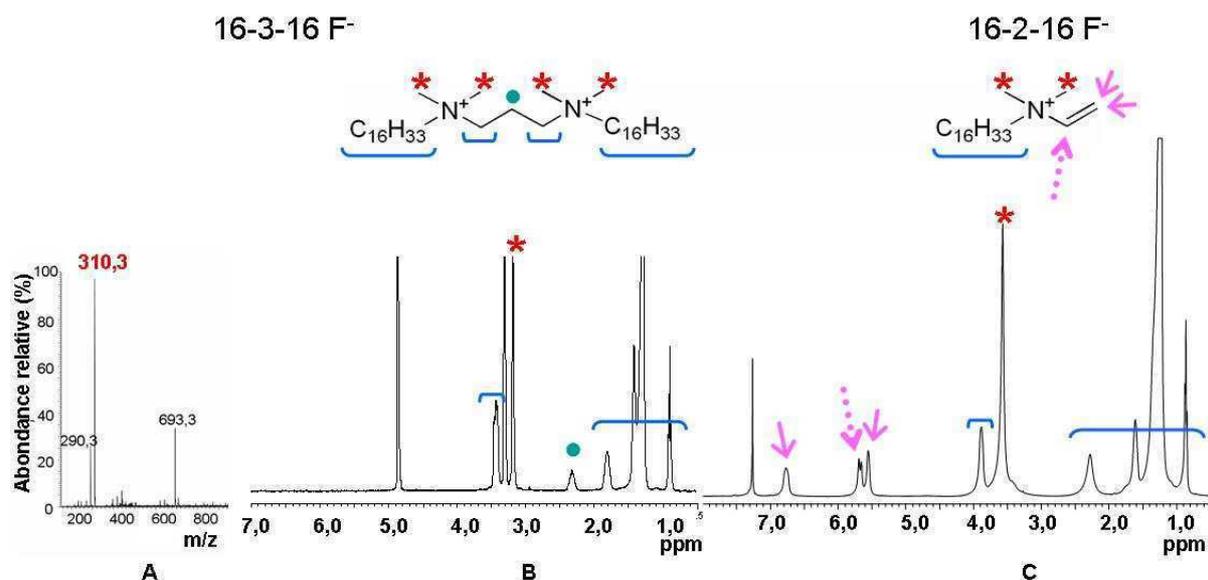


Figure II-12 : EC<sub>50</sub> mesurées par SM en fonction du contre ion et de la longueur de l'espaceur (Br<sup>-</sup> ●; CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> □; Cl<sup>-</sup> ◆; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ◇; PF<sub>6</sub><sup>-</sup> +; F<sup>-</sup> Δ; I<sup>-</sup> ×).

Les cinq autres contre ions ont des EC<sub>50</sub> intermédiaires et relativement proches. Une variation importante est observée entre les longueurs d'espaceur n = 3 et 4 pour la plupart des contre ions étudiés. De plus, la dispersion des EC<sub>50</sub> mesurées est plus importante pour les valeurs n = 4 et 6 carbonés que pour n = 2 et 3.

#### Cas particulier des gemini F<sup>-</sup>

La Figure II-10 présente les produits observés après fragmentation des gemini F<sup>-</sup> ayant des longueurs d'espaceurs de 4 et 6 carbonés. Dans les deux cas, on observe uniquement des produits d'E2. Ces éliminations sont provoquées pour des énergies de collision particulièrement faibles (Figure II-12). Lors de l'injection dans le spectromètre de masse d'une solution de gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> d'espaceur 3, le spectre « global » obtenu ne montre pas le complexe M<sup>2+</sup>X<sup>-</sup>. Le produit d'élimination **D** est déjà observé à ce stade (signal à m/z 310,3, Figure II-13A). Cependant, le spectre RMN dans le méthanol deutéré de ce gemini avant injection, indique que le gemini n'est pas dégradé (Figure II-13B). L'élimination a lieu au moment de l'injection de l'échantillon. A ce stade, l'énergie de collision au sein du spectromètre est faible mais non nulle. Si l'on extrapole les données présentées sur la Figure II-12, en considérant la forte variation observée avec les autres espèces entre n = 2-3 et n = 4-6, on trouve une énergie beaucoup plus faible dans ce cas que dans tous les autres cas étudiés. Le gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> (n = 3) apparaît particulièrement enclin à se fragmenter par élimination.



**Figure II-13 :** (A) Spectre de masse obtenu après injection d'une solution de gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> (n = 3) présentant les signaux caractéristiques des espèces M<sup>2+</sup> (m/z = 290,3) et D (m/z = 310,3). Le signal à m/z = 693,3 correspond au gemini complexé à de l'acide trifluoroacétique (TFA) présent à l'état de traces au sein du dispositif<sup>b</sup>. (B) Spectre RMN <sup>1</sup>H 400 MHz dans CD<sub>3</sub>OD du gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> (n = 3) présentant le gemini intact. (C) Spectre RMN <sup>1</sup>H 400 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> (n = 2) présentant les produits d'élimination. Les attributions des spectres RMN sont reportées en partie expérimentale.

En ce qui concerne le gemini (F<sup>-</sup>)<sub>2</sub> possédant un espaceur à 2 carbones, le spectre RMN obtenu avant injection ne présente pas le gemini intact, mais les produits **D**. L'élimination a déjà eu lieu en solution. Le gemini F<sup>-</sup> est particulièrement instable et se fragmente par élimination d'autant plus facilement que son espaceur est court. Le fait que ce gemini soit aussi instable est intrigant étant donné qu'aucun autre gemini ne présente de dégradation en solution. Ceci peut s'expliquer par la différence importante de pKa entre F<sup>-</sup> (3,17) et les différents contre ions considérés dans cette étude, qui présentent des pKa bien inférieurs (de 0,23 à -16) (cf Annexe TableauIIA-1). En effet, plus le pKa est important, plus la propension de ce contre ion à l'élimination est forte. Cependant, le gemini acétate (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), utilisé comme intermédiaire dans la synthèse de certains des gemini contre ions (cf partie expérimentale) montre une grande stabilité en solution. Etant donné que le pKa de l'acétate est de 4,76, ce paramètre physico-chimique ne peut pas expliquer le comportement observé avec le gemini F<sup>-</sup>. Sa grande instabilité reste à ce jour inexpliquée.

<sup>b</sup> Ce signal est observé pour tous les gemini étudiés et ne disparaît pas après de multiples lavages du spectromètre. Cependant, l'expérience n'est pas affectée par la présence de TFA (ou de tout autre signal additionnel) puisque l'on isole un précurseur de choix en SM2, seule espèce alors présente pour la fragmentation.

Cette étude en phase gaz par spectrométrie de masse montre que le gemini ne se dissocie pas. Au lieu de dissociation, une liaison covalente est rompue. L'interaction électrostatique montre une stabilité importante, supérieure à celle d'une liaison covalente. Cette stabilité des liaisons électrostatiques est caractéristique de la phase gaz. En absence de solvant écrantant les charges, les interactions électrostatiques sont beaucoup plus fortes qu'en solution. Une telle différence n'est pas observée en ce qui concerne la liaison covalente (cf Annexe Tableau IIA-2).

Il apparaît à la suite de cette étude, que la voie de fragmentation empruntée ( $S_N2$  ou E2) dépend à la fois de la nature du contre ion complexé et de la longueur de l'espaceur. Dans le but de comprendre l'influence de ces deux paramètres sur la fragmentation du complexe, nous nous sommes en parallèle tournés vers une approche calculatoire. Les calculs quantiques permettent en effet dans de nombreux cas d'obtenir des données quantitatives sur les mécanismes réactionnels chimiques.

### 3.4 Calculs *ab initio*

Les calculs réalisés par Ronald Sauer à l'université de Rutgers (Etats-Unis), utilisent la méthode DFT (Density Functional Theory). Cette théorie permet la description quantique de systèmes complexes, en considérant uniquement la distribution de densité électronique ( $\rho$ ). Cette méthode, développée en 1927 par Thomas et Fermi, repose sur la relation entre l'énergie totale ( $E$ ) des électrons et la densité électronique globale. En d'autres termes,  $E$  est une fonctionnelle unique de  $\rho$ . D'une manière générale, la DFT est une méthode intéressante pour la compréhension de résultats expérimentaux nécessitant un temps de calcul peu élevé au regard d'autres méthodes calculatoires. Cette approche permet de déterminer les énergies associées aux états de plus basse énergie ainsi qu'aux états de transition potentiellement adoptés au cours d'une réaction chimique donnée.

Dans le cadre de ce travail, les calculs réalisés par Ronald Sauer ont permis de déterminer les enthalpies de complexation de différents gemini - contre ions ainsi que les enthalpies d'activation des réactions de  $S_N2$  et d'E2 dans le vide. En ce qui concerne les enthalpies d'activation des réactions d'élimination, l'état de plus basse énergie a été déterminé comme étant celui présentant une configuration *trans* des méthylènes de l'espaceur.

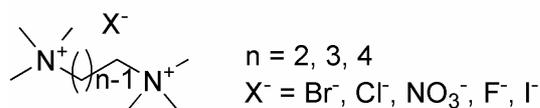
En effet, les états de transitions calculés montrent une énergie plus faible dans le cas d'une configuration *trans* que dans le cas d'une configuration *syn* (Tableau II-1, à l'exception du contre ion  $F^-$  avec  $n = 2$ ). Dans cette configuration le contre ion est placé entre les deux charges positives. Ceci permet d'éloigner les charges positives et ainsi d'optimiser les interactions entre la charge négative du contre ion et les charges positives des ammoniums.

N ( $C_nH_{2n}$ )	2		3		4	
Halogénure	Syn	Anti	Syn	Anti	Syn	Anti
F	<b>12,1</b>	16,2	15,3	<b>11,4</b>	23,0	<b>21,2</b>
Cl	24,2	<b>24,0</b>	29,1	<b>23,6</b>	30,6	<b>28,7</b>
Br	28,9	<b>28,4</b>	33,9	<b>29,5</b>	33,8	<b>32,5</b>
I	28,2	<b>27,3</b>	34,0	<b>28,8</b>	32,9	<b>31,6</b>

**Tableau II-1 : Comparaison des enthalpies d'activation calculées pour les réactions d'élimination, en fonction de la configuration *syn* ou *anti* du dication.**

Les calculs d'enthalpie de réactions d'E2 et de  $S_N2$  ont été menés en effectuant le minimum de changements structuraux (rotation d'une seule liaison C-C, et repositionnement du contre ion).

Pour obtenir des informations comparables aux données obtenues par spectrométrie de masse, ces calculs ont été menés sur les complexes  $M^{2+}X^-$  : un seul contre ion est complexé au gemini. Pour permettre ces calculs, les chaînes aliphatiques des gemini ont été remplacées par des groupements méthyle (Figure II-14)<sup>c</sup>.



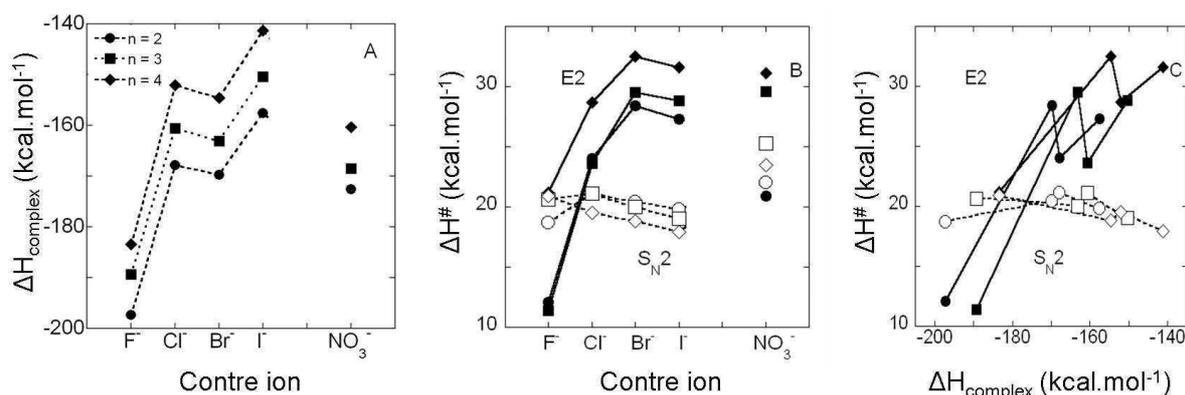
**Figure II-14 : Structure moléculaire des gemini – contre ions étudiés par calcul quantique.**

Les contre ions  $CF_3CO_2^-$  et  $PF_6^-$  n'ont pas été étudiés étant donné le nombre trop élevé d'atomes mis en jeu. Pour les mêmes raisons, les gemini possédant un espacement de longueur égale à 6 carbones ont été exclus de cette étude. De ce fait, la compétition entre les deux voies de substitution nucléophile **a** et **b** décrite précédemment (paragraphe 3.2.1) ne sera pas abordée ici.

<sup>c</sup> Cette approximation n'a pas d'incidence sur la fiabilité des mesures étant donnée l'absence d'effet hydrophobe en phase gaz.

### 3.4.1 Complexation et fragmentation

L'enthalpie de complexation ( $\Delta H_{\text{complex}}$ ) représente l'énergie nécessaire à la formation du complexe  $M^{2+}X^-$  (d'un gemini avec les contre ions  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  et  $NO_3^-$ ) à partir des deux entités non liées. Les calculs obtenus (Figure II-15A) montrent des valeurs largement négatives pour tous les complexes considérés ainsi qu'une grande dispersion des valeurs en fonction du contre ion (de -197,3 à -141,3 kcal.mol<sup>-1</sup>, Annexe Tableau IIA-3). En revanche, la dispersion est moindre pour un même contre ion, lorsque les valeurs obtenues pour les trois longueurs d'espaceur étudiées ( $n = 2, 3$  et  $4$ ) sont comparées (moins de 10 kcal.mol<sup>-1</sup>). Les enthalpies calculées augmentent avec la longueur de l'espaceur quel que soit le contre ion. La stabilité des complexes  $M^{2+}X^-$  suit l'ordre  $n = 2 > n = 3 > n = 4$ . Les complexes les plus stables sont obtenus avec le contre ion  $F^-$  alors que les complexes gemini  $I^-$  présentent les enthalpies de complexation les plus grandes. Les contre ions  $Cl^-$ ,  $Br^-$  et  $NO_3^-$  montrent des enthalpies intermédiaires relativement proches les unes des autres.



**Figure II-15 : Enthalpies de complexation (A) et d'activation (B) calculées par la méthode DFT, en fonction du contre ion et enthalpie d'activation en fonction de l'enthalpie de complexation. Les enthalpies d'activation sont calculées pour les réactions d'E2 (traits pleins) et de S<sub>N</sub>2 (traits discontinus) pour des longueurs d'espaceur  $n = 2$  (cercles),  $n = 3$  (carrés) et  $n = 4$  (losanges).**

*Les données relatives à  $NO_3^-$  sont isolées car cet ion n'appartient pas à la famille des halogénures.*

A l'inverse, les enthalpies d'activation des réactions de substitution et d'élimination présentent des valeurs faiblement positives (Figures II-15B et C, Annexe Tableau IIA-4). Les enthalpies relatives à l'élimination présentent une dispersion beaucoup plus importante que celles relatives à la substitution, en fonction de l'espaceur mais également du contre ion. Si les enthalpies d'activation pour les réactions d'élimination sont d'autant plus faibles que l'espaceur est court, ce n'est pas le cas des enthalpies relatives à la substitution nucléophile : cette réaction n'est pas favorisée par les espaceurs courts.

Si les enthalpies d'activation calculées sont représentées non plus en fonction des contre ions étudiés spécifiquement mais des enthalpies de complexation qui leur sont associées, le même phénomène est observé (Figure II-15C) : alors que les  $\Delta H^\ddagger$  d'E2 calculées varient de façon importante et augmentent avec la longueur de l'espaceur, les  $\Delta H^\ddagger$  de  $S_N2$  ne varient que faiblement.

La comparaison des Figures II-15A et B montre deux ordres de valeurs d'enthalpies très différents. La complexation est largement favorisée par rapport à l'état d'entités isolées  $M^{2+} + X^-$ . A l'inverse, la dissociation du complexe requiert une énergie importante.

Cette énergie apparaît très supérieure aux enthalpies d'activation calculées (d'un facteur 5 environ). Ceci explique le fait que le complexe ne se dissocie pas mais se fragmente.

De plus, les enthalpies d'activation d'E2 et de  $S_N2$  sont suffisamment importantes pour assurer la stabilité des complexes en phase gaz lorsque l'énergie interne n'est pas augmentée. La formation du complexe est une étape clé de ces processus (Figure II-16). Ce phénomène avait précédemment été reporté pour des systèmes de polarité inverse (dianion complexé à un contre cation<sup>17</sup>).

Enfin, les barrières énergétiques associées à l'entrée dans les voies d'élimination et de substitution nucléophile sont du même ordre de grandeur et expliquent la compétition entre ces deux réactions.

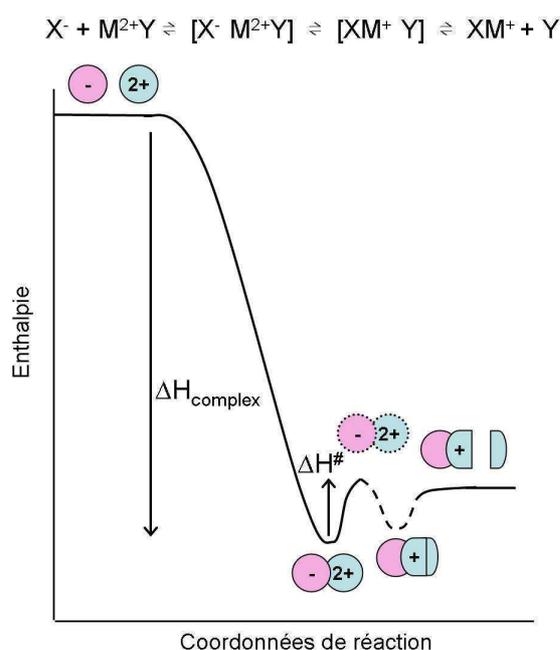


Figure II-16 : Diagramme d'énergie représentant les états de transition et les enthalpies associées au cours de la complexation et de la fragmentation d'un gemini dicationique et de son contre anion.

### 3.4.2 Substitution nucléophile et élimination

D'une manière générale, les enthalpies d'activation des réactions d'élimination calculées (Figure II-17A) augmentent avec la longueur de l'espaceur quel que soit le contre ion considéré. Les réactions d'élimination sont favorisées par des espaceurs courts. La dispersion des valeurs (12,1 à 34 kcal.mol<sup>-1</sup>) est plus importante dans ce cas que pour les  $\Delta H^\ddagger$  de substitution nucléophile mesurées (17,9 à 25,3 kcal.mol<sup>-1</sup>) (Annexe Tableau IIA-4).

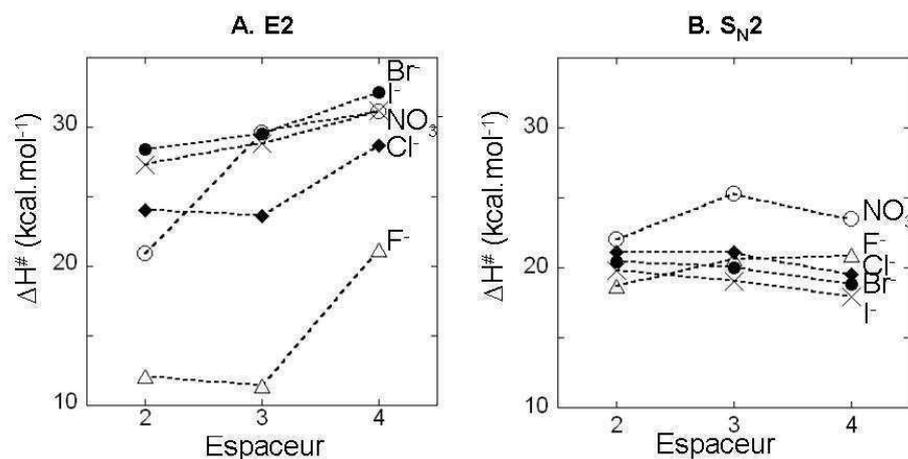


Figure II-17 : Enthalpies d'activation calculées par la méthode DFT, en fonction du contre ion et de la longueur de l'espaceur (A) pour les réactions d'E2 et (B) de S<sub>N</sub>2 (Br<sup>-</sup> ●, Cl<sup>-</sup> ◆, F<sup>-</sup> △, I<sup>-</sup> ×, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ○).

La Figure II-17B présente les enthalpies d'activation ( $\Delta H^\ddagger$ ) des réactions de substitution nucléophile, en fonction du contre ion et de la longueur de l'espaceur. En ce qui concerne les contre ions Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> et I<sup>-</sup>, une diminution progressive de  $\Delta H^\ddagger$  avec une augmentation de la longueur de l'espaceur est observée. Dans le cas du contre ion F<sup>-</sup>,  $\Delta H^\ddagger$  augmente de façon constante avec la longueur de l'espaceur. Enfin, dans le cas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $\Delta H^\ddagger$  augmente entre n = 2 et 3 carbones et diminue entre n=3 et 4.

### 3.5 Confrontation des données

Les calculs quantiques obtenus ont permis de soutenir la majorité des résultats observés par spectrométrie de masse. Les enthalpies de complexation mesurées montrent des valeurs négatives (-197,3 à -141,3 kcal.mol<sup>-1</sup>) largement inférieures aux enthalpies d'activation calculées pour les réactions de S<sub>N</sub>2 (17,9 à 25,3 kcal.mol<sup>-1</sup>) et d'E2 (12,1 à 34

kcal.mol<sup>-1</sup>). Ceci illustre la stabilité du complexe formé par le gemini - contre ion et explique la non dissociation du complexe, telle qu'observée par spectrométrie de masse. En phase gaz, les interactions électrostatiques sont très fortement amplifiées et le retour à l'état initial des entités séparées apparaît énergétiquement beaucoup plus coûteux que la fragmentation du complexe et la rupture d'une liaison covalente (Figure II-16). En effet, nous avons montré par spectrométrie de masse que le gemini – contre ion  $M^{2+}X^-$  ne se dissocie pas pour donner les espèces  $M^{2+} + X^-$ . Suite à une augmentation de son énergie interne, le complexe se fragmente en différents produits caractéristiques. Suivant la nature du complexe isolé (nature du contre ion et longueur de l'espaceur), des produits de substitution nucléophile ou d'élimination sont obtenus.

L'entrée dans l'une ou l'autre voie de fragmentation résulte des contributions de divers paramètres : la nucléophilie du contre ion, son électrophilie, la nature du groupe partant et l'encombrement stérique. Si l'on considère dans un premier temps l'encombrement stérique, il apparaît que ce facteur se révèle être particulièrement important dans le cas des substitutions nucléophiles puisque l'attaque par le nucléophile peut être empêchée par la présence de groupes volumineux (Schéma II-1). En revanche, ce facteur apparaît moins prépondérant dans le cas de l'élimination : l'électrophilie sera alors déterminante pour le choix de la voie de fragmentation.

Ainsi, la longueur de l'espaceur et la nature du contre ion sont des facteurs clé pour déterminer la voie de fragmentation.

L'étude du complexe gemini -  $PF_6^-$  présente une exception, dans le sens où ce contre ion est peu basique et non nucléophile. Ainsi, il apparaît être un très mauvais candidat, à la fois pour les réactions d'E2 et de  $S_N2$  en solution. Ce faisant, si ces propriétés induisent une augmentation des enthalpies d'activation de  $S_N2$  et E2 (non calculées), la dissociation du complexe aurait pu être envisagée à partir de ce système. Les résultats obtenus par spectrométrie de masse montrent que quelle que soit la longueur d'espaceur considérée, des produits d'élimination sont systématiquement obtenus. Cependant, nous avons observé que les énergies de collision requises à la fragmentation des complexes gemini –  $PF_6^-$  sont particulièrement importantes. La dissociation du complexe n'a pas pu être forcée par l'utilisation d'un contre ion particulièrement peu enclin à entrer dans l'une ou l'autre des voies de fragmentation observées. Ceci illustre une nouvelle fois la stabilité de l'interaction électrostatique gemini – contre ion en phase gaz.

### 3.5.1 Effet de la longueur de l'espaceur

Les expériences de spectrométrie de masse montrent que l'énergie requise à la fragmentation augmente avec la longueur de l'espaceur (Figure II-12). C'est également ce qui est observé en ce qui concerne les  $\Delta H^\ddagger$  calculées des réactions d'E2, favorisées pour des espaceurs courts. La proximité des deux charges portées par les ammoniums quaternaires confère un caractère particulièrement acide (d'autant plus que l'espaceur est court) au proton impliqué dans le mécanisme d'élimination **d**. En revanche, la proximité des ammoniums quaternaires augmente l'encombrement stérique et ne favorise pas la  $S_N2$ . Ceci explique les résultats obtenus par spectrométrie de masse : l'E2 est favorisée pour des espaceurs courts, alors qu'on observe une augmentation des populations des produits de  $S_N2$  lorsque  $n$  est augmenté, et que l'encombrement stérique diminue. Cependant, les  $\Delta H^\ddagger$  calculées des réactions de  $S_N2$  n'évoluent pas de façon similaires avec  $n$  en fonction du contre ion. Les enthalpies d'activation de  $S_N2$  ne diminuent pas avec l'augmentation de la longueur de l'espaceur. L'évolution de ces enthalpies en fonction de la longueur de l'espaceur restent à ce jour inexplicées.

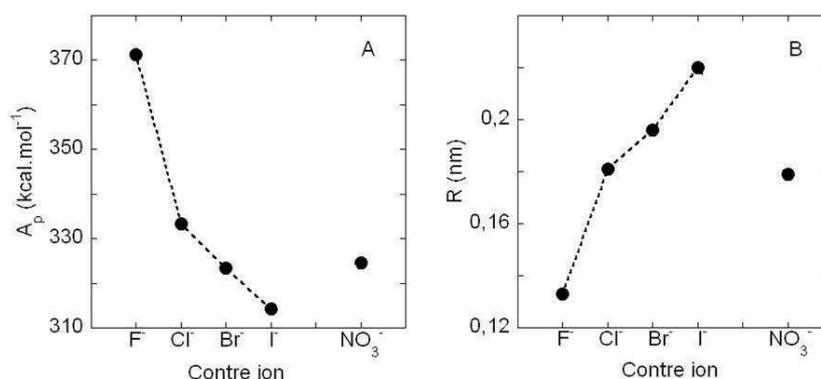
En plus de la longueur de l'espaceur, la nature du contre ion est également déterminante. En effet, pour une même longueur d'espaceur, les  $\Delta H^\ddagger$  calculées et les proportions de produits d'E2 et de  $S_N2$  varient. Pour une longueur d'espaceur donnée, la nature du contre ion est responsable de l'entrée dans l'une ou l'autre voie de fragmentation.

### 3.5.2 Effet de la nature du contre ion

Etant donné que le complexe précurseur ne se fragmente que par élimination ou substitution nucléophile, il est possible d'interpréter les données de façon équivalente par la propension des gemini – contre ions à entrer dans l'une ou l'autre voie. La Figure II-11 montre l'ordre décroissant des contre ions à induire une réaction de substitution nucléophile :  $I^- > Br^- > Cl^- > NO_3^- > CF_3CO_2^- > PF_6^- = F^-$ . La propension de ces contre ions à induire une réaction d'élimination suit donc l'ordre inverse.

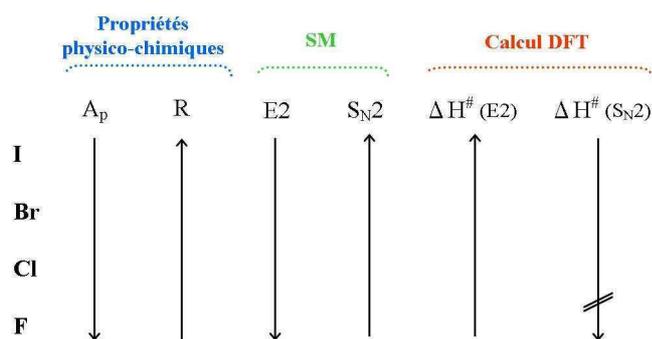
Dans le but de corrélérer ces résultats avec les propriétés physiques de ces contre ions, nous nous sommes intéressés aux valeurs d'affinité pour les protons ( $A_p$ ) et de rayon ionique ( $R$ ) dans le cristal (Figure II-18 et Annexe Tableau IIA-5).  $F^-$  présente une valeur d' $A_p$

(371 kcal.mol<sup>-1</sup>) très différente de celle des quatre autres anions considérés (de 314 à 333 kcal.mol<sup>-1</sup>). Particulièrement, Br<sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont des A<sub>p</sub> similaires (323,5 et 324,5 kcal.mol<sup>-1</sup> respectivement). Etant donné que l'affinité pour les protons est un facteur favorisant les réactions d'élimination, la valeur obtenue pour le contre anion F<sup>-</sup> explique les résultats obtenus par SM et par calcul. Le gemini F<sup>-</sup> ne se fragmente que par élimination et nécessite une augmentation d'énergie interne particulièrement faible. Dans le cas d'un espaceur constitué de 2 carbones, les produits d'élimination sont observés en solution. De plus, les calculs *ab initio* montrent les ΔH<sup>#</sup> de réactions d'élimination les plus basses dans le cas de cet anion. D'une manière générale, les valeurs reportées dans la littérature pour les contre ions étudiés en *ab initio* (Figure II-18A et Annexe Tableau IIA-5) présentent l'ordre de basicité croissante suivant : I<sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> ≈ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> < Cl<sup>-</sup> < F<sup>-</sup>. Cette échelle est en accord avec celle obtenue expérimentalement ainsi qu'avec les données obtenues par le calcul.



**Figure II-18 : Affinité pour les protons (A<sub>p</sub>) en phase gaz (A) et rayon ionique (R) dans le cristal (B). Le tableau de valeurs est reporté en Annexe (Tableau IIA-5).**

Les valeurs de R présentent l'ordre inverse des A<sub>p</sub> décrit précédemment : I<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ≈ Cl<sup>-</sup> > F<sup>-</sup>, puisqu'une augmentation du rayon ionique s'accompagne généralement d'une diminution de basicité. L'augmentation de R suit l'augmentation des ΔH<sup>#</sup> de réactions d'élimination calculées pour tous les contre ions étudiés. Ceci est en accord avec les diminutions de propension à entrer dans les voies d'élimination observées par spectrométrie de masse. Cette tendance s'inverse en ce qui concerne les réactions de substitution nucléophile, comme observé par SM. Si l'on exclue le contre ion NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, difficile à classer parmi les halogénures, on observe une concordance parfaite entre les propriétés physico-chimiques des halogénures et les données obtenues par spectrométrie de masse et par calcul quantique (Figure II-19).



**Figure II-19 : Comparaison des propriétés physico-chimiques (A<sub>p</sub> et R) des halogénures avec les données obtenues par spectrométrie de masse et calcul quantique par la méthode DFT.**

Le contre ion F<sup>-</sup> présente un cas particulier. Quelle que soit la longueur d'espaceur considérée, la fragmentation du complexe gemini – F<sup>-</sup> se fait par élimination. Cependant, les ΔH<sup>#</sup> de S<sub>N</sub>2 calculées (particulièrement pour n = 2) sont plus faibles que dans le cas de contre ions dont les complexes se fragmentent par S<sub>N</sub>2. Il apparaît que dans le cas de F<sup>-</sup>, le ΔH<sup>#</sup> d'élimination, largement favorable est déterminant dans le choix de la voie de fragmentation.

D'une manière générale, les enthalpies d'activation des réactions de substitution nucléophile calculées montrent de faibles variations par rapport à celles observées dans le cas des ΔH<sup>#</sup> de réactions d'élimination. Ceci indique que la nucléophilie n'est pas l'unique propriété physico-chimique déterminant la voie de fragmentation du complexe. Les variations de proportions des différents fragments obtenus sont davantage illustrées par les variations de ΔH<sup>#</sup> d'élimination et donc par la propension d'un complexe à se fragmenter par cette voie. Il apparaît de l'ensemble de ces études, que l'entrée dans l'une ou l'autre de ces deux voies est contrôlée de façon coopérative par différentes propriétés des ions, nucléophilie et électrophilie notamment.

## 4 Conclusion

Les ions ont une influence particulièrement importante sur les assemblages de molécules chargées. Cependant, dans le cas d'auto-assemblages de molécules amphiphiles dans l'eau, l'effet hydrophobe reste une force motrice prépondérante pour la détermination des propriétés d'assemblage. Pour comprendre les mécanismes fondamentaux des interactions ioniques mises en jeu dans le cas d'amphiphiles fonctionnalisés par complexation, nous nous sommes concentrés sur l'étude des interactions électrostatiques. Dans ce but, l'approche par spectrométrie de masse a été choisie puisqu'elle permet de s'affranchir de l'effet hydrophobe. Nous avons étudié en phase gaz des gemini dicationiques complexés à des contre anions de différentes natures. Cette étude a été menée de façon systématique : la structure moléculaire de l'amphiphile n'est variée qu'au niveau de la longueur de l'espaceur et permet d'étudier l'effet spécifique de chaque contre ion.

Après injection d'une solution de gemini complexés à des contre ions de nature spécifique ( $M^{2+}2X^-$ ), la spectrométrie de masse permet d'isoler le complexe  $M^{2+}X^-$  constitué du gemini et d'un unique contre anion. La stabilité du complexe précurseur est ensuite testée en augmentant son énergie interne. Suite à cette élévation, aucun phénomène de dissociation (perte du contre ion) n'est observé : le gemini se fragmente. L'attribution des fragments obtenus après disparition du précurseur indique que le complexe se fragmente par élimination ou substitution nucléophile. Les proportions de fragments issus de chacune des réactions dépendent de la structure du complexe et illustrent la sélectivité de réaction. La longueur de l'espaceur ainsi que la nature du contre ion sont des facteurs déterminant pour l'entrée dans l'une ou l'autre voie. D'une manière générale, l'augmentation de la longueur de l'espaceur (de 2 à 6 carbones) favorise la substitution nucléophile au détriment des réactions d'élimination (Figure II-20). Cependant, cette augmentation ne suffit pas à provoquer la fragmentation par substitution nucléophile des complexes  $M^{2+}PF_6^-$  et  $M^{2+}F^-$ . Ces deux complexes se fragmentent exclusivement par élimination, quelle que soit la longueur d'espaceur considérée. A l'inverse, le complexe  $M^{2+}I^-$  ne se fragmente que par substitution nucléophile, quelle que soit la longueur de l'espaceur. Ceci illustre la spécificité de réaction liée à l'interaction gemini - contre ion. En ce qui concerne les ions de la famille des halogénures, nous avons observé que les gemini complexés à des contre ions à faible rayon

ionique dans le cristal présentent une affinité importante pour les protons et entrent préférentiellement dans la voie d'élimination. A l'inverse, les gemini complexés à des contre ions de rayon ionique dans le cristal important possèdent des affinités pour les protons plus faibles et ont tendance à se fragmenter de façon préférentielle par substitution nucléophile.

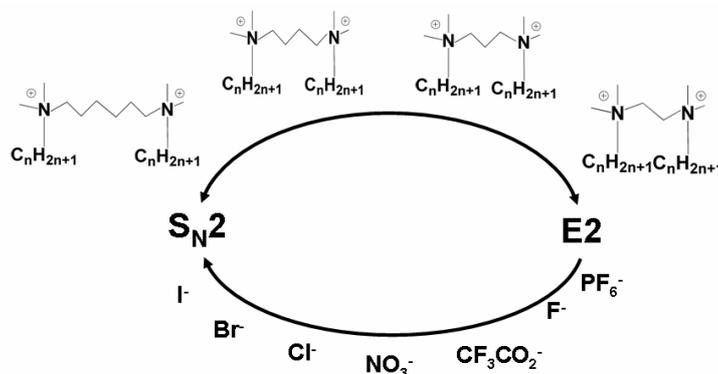


Figure II-20 : Représentation schématique des paramètres favorisant l'élimination et la substitution nucléophile en ce qui concerne la longueur de l'espaceur du gemini et la nature du contre ion complexé.

La complémentarité des études menées par spectrométrie de masse et par calculs quantiques permet de déterminer la stabilité du complexe gemini – contre ion d'un point de vue de l'interaction électrostatique. Cependant, malgré la pertinence des informations obtenues en phase gaz, l'application à la phase condensée reste délicate. En effet, les réactions ion – molécule, écrantées en solution, sont largement favorisées dans le vide. Ainsi, la dynamique et l'orientation moléculaire des collisions ion – molécule est différente dans les deux milieux. De plus, l'effet hydrophobe (non spécifique) particulièrement important au niveau des chaînes aliphatiques du gemini joue un rôle clé en solution alors qu'il n'intervient d'aucune façon dans le vide. L'étude complémentaire des interactions ioniques en solution nécessite le contrôle de l'état d'agrégation des molécules amphiphiles pour mesurer les concentrations ioniques interfaciales par exemple. Une perspective d'étude en solution différente consiste à s'affranchir de l'effet hydrophobe en remplaçant les chaînes aliphatiques par des groupements méthyle par exemple. Ainsi, il est possible d'obtenir des informations précises sur l'interaction de complexation et de comparer ces données à celles obtenues en phase gaz pour déterminer les contributions de solvation spécifiques de la nature du contre ion. De telles informations sont particulièrement intéressantes dans le but de développer une stratégie rationnelle pour la conception et le contrôle des propriétés et morphologies d'auto-assemblages de molécules amphiphiles ioniques. Le chapitre 3 présente un exemple de contrôle de ces propriétés par la spécificité d'interaction ionique à travers la complexation de gemini à des contre anions tartrate.

## 5 Partie expérimentale

### 5.1 Synthèse

Fonctionnaliser les amphiphiles géminés par simple complexation présente divers avantages, comme celui de pouvoir synthétiser rapidement des gammes de gemini contre ions riches. Néanmoins, même si les procédures d'échanges d'ions sont relativement simples à mettre en œuvre, celles-ci doivent conduire à une stoechiométrie parfaite entre l'amphiphile cationique et le contre anion. Deux protocoles de synthèse sont utilisés suivant la nature du contre ion à complexer.

- $X^- = F^-$  : l'échange d'ion se fait directement à partir d'un gemini  $Br^-$ , par ajout d'un équivalent par charge positive de fluorure d'argent, la précipitation du sel d'argent déplaçant l'équilibre de la réaction.

- $X^- = Cl^-, NO_3^-, PF_6^-, CF_3COO^-, \Gamma$ . La synthèse de ces gemini se fait *via* deux échanges d'ions successifs. Le premier met en jeu le tensioactif complexé au contre ion bromure (1 eq. par charge positive) et permet la synthèse d'un tensioactif complexé au contre ion acétate ( $Ac^-$ ) (1 eq. par charge positive). Les contre-ions  $Ac^-$  ont été choisis car ils sont facilement échangeables avec les formes acides des contre ions, du fait de leur pKa supérieur (4,7) à celui des contre ions que l'on souhaite échanger. De plus, l'acide acétique, généré par la réaction est volatil, ce qui rend son élimination relativement aisée par la suite. Le tensioactif acétate est synthétisé par l'ajout d'un équivalent par charge positive d'acétate d'argent à une solution de gemini bromure, la précipitation du sel d'argent déplaçant l'équilibre de la réaction. Le deuxième échange d'ion permet le remplacement du contre ion acétate par le contre ion désiré. Après recristallisations successives, le tensioactif est isolé et additionné à un équivalent par charge positive du contre ion désiré. L'acide acétique formé est ensuite éliminé par évaporation du milieu réactionnel.

Cette méthode a conduit à des résultats intéressants, puisque des taux d'échange de l'ordre de 95% à 98% ont pu être observés.

Le tensioactif de départ complexé au contre ion bromure est synthétisé à partir de bromoalcane. Tous les autres réactifs sont obtenus commercialement et utilisés sans purification supplémentaire. Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Metler-Toledo d'une précision de 0,01 mg. Ces pesées sont effectuées dans une pièce climatisée à 22°C. L'eau ultrapure (18,2mΩ. cm) est issue d'un système Purelab ultra ELGA.

#### 5.1.1 Synthèse des gemini Br

Une solution de 1-bromoalcane ( $m = 13$  g, 3 éq.) dans 100 mL d'acétonitrile est placée dans un ballon monocol de 250 mL muni d'un réfrigérant. Un équivalent de tétraméthyléthylènediamine (TMEDA,  $M = 116,21$  g.mol<sup>-1</sup>,  $d = 0,77$ ) est ajouté à la solution. Le milieu réactionnel est placé sous agitation à 80°C pendant 48 h. A l'issue de la réaction, le milieu réactionnel est placé à température ambiante. Le précipité obtenu est alors filtré et le solide résultant est recristallisé. Le gemini est solubilisé dans un minimum de chloroforme, puis précipité dans l'acétone et filtré. Une seconde recristallisation est ensuite conduite en solubilisant la poudre dans un minimum de chloroforme et en ajoutant le minimum d'acétonitrile pour précipiter le produit. Lorsque la précipitation apparaît, le milieu est chauffé de manière à solubiliser le tout ; la cristallisation opère ensuite lentement à température ambiante. Le solide est obtenu par filtration sous la forme d'un solide blanc.

La synthèse des gemini à espaceurs 3, 4 et 6 utilise le même protocole, excepté que le milieu réactionnel est placé sous agitation à 80 °C pendant une semaine dans le cas de l'espaceur 4.

Rendement moyen = 80%.

### 5.1.2 Synthèse des tensioactifs Ac<sup>-</sup> et F<sup>-</sup> par échange d'ions

500 mg d'amphiphiles bromés sont solubilisés dans 50 mL de méthanol. 1 équivalent par charge positive d'acétate d'argent ou de fluorure d'argent est additionné au mélange. La suspension obtenue est agitée pendant 30 minutes, à 40°C. Le milieu réactionnel passe progressivement d'une couleur « crème » à grise, ce qui indique la formation du précipité de bromure d'argent. Le précipité de bromure d'argent, insoluble dans le méthanol, est filtré sur Célite. Le filtrat est récupéré et le solvant évaporé sous vide. La poudre est ensuite recristallisée par solubilisation dans un minimum de CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH (9 : 1, v/v), typiquement 2 à 3 mL, puis précipitée dans l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'éther éthylique (typiquement 20 à 30 mL). Le solide blanc obtenu est filtré et séché sous vide.

La pureté de l'échange est contrôlée par ajout d'une petite quantité d'acétate d'argent à une fraction du gemini obtenu en fin de synthèse, dissout dans le méthanol. Si l'apparition d'un précipité noir indiquant la présence de contre ion bromure est observée, une petite quantité d'acétate d'argent ou de fluorure d'argent est ajoutée et les étapes de filtration et de recristallisation répétées.

### 5.1.3 Synthèse des tensioactifs Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> et I<sup>-</sup> par échange d'ions

100 mg d'amphiphiles Ac<sup>-</sup> sont solubilisés dans 20 mL de méthanol. 1 équivalent par charge positive d'acide concentré contenant le contre ion désiré est additionné au mélange. La solution obtenue est agitée pendant 15 minutes, à température ambiante. Le méthanol est ensuite évaporé sous vide. Le produit est recristallisé par solubilisation dans un minimum de CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH (9 : 1, v/v), puis précipité dans l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'éther éthylique. Le solide blanc obtenu est filtré et séché sous vide.

La pureté de l'échange est contrôlée par RMN <sup>1</sup>H : la disparition du pic caractéristique du contre ion Ac<sup>-</sup> (à 1,9 ppm) indique que l'échange est complet. Le pH d'une solution aqueuse d'une petite quantité du gemini contre ion obtenu est également contrôlé (pH = 7 ± 0.5) afin de s'assurer que l'acide n'est pas en excès.

**Exemple type du 16-2-16 Br<sub>2</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 4,81 (4H, s), 3,72 (4H, m), 3,51 (12H, s), 1,81 (4H, m), 1,38 (4H, m), 1,25 (m), 0,88 (6H, t, <sup>3</sup>J=6,59 Hz) **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 65,98 ; 56,79 ; 51,14 ; 31,98 ; 29,79 ; 29,75 ; 29,66 ; 29,62 ; 28,44 ; 29,42 ; 26,36 ; 23,13 ; 22,75 ; 14,19

**Exemple type du 16-3-16 Br<sub>2</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 3,84 (4H, m), 3,49 (4H, m), 3,38 (12H, s), 2,61 (2H, m), 1,76 (4H, m), 1,34 (4H, m), 1,23 (48H, m), 0,85 (6H, m) **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 66,55; 60,97; 51,24; 31,87; 29,66; 29,48; 29,42; 29,32; 29,22; 26,28; 22,92; 22,63; 18,80; 14,07

**Exemple type du 16-4-16 Br<sub>2</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 4,00 (4H, m), 3,40 (4H, m), 3,27 (12H, s), 2,17 (4H, m), 1,76 (4H, m), 1,35 (4H, m), 1,24 (48H, m), 0,87 (6H, m) **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 65,59; 63,63; 50,83; 31,88; 29,60; 29,55; 29,41; 29,32; 29,14; 26,28; 22,85; 22,65; 19,82; 14,09

**Exemple type du 16-6-16 Br<sub>2</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 3,71 (4H, m), 3,45 (4H, m), 3,37 (12H, s), 1,99 (4H, m), 1,68 (4H, m), 1,55 (4H, m), 1,32 (4H, m), 1,22 (48H, m), 0,85 (6H, m) **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C, δ ppm) :** 64,70; 64,07; 50,94; 31,85; 29,77; 29,62; 29,58; 29,53; 29,41; 29,34; 29,28; 29,21; 26,26; 24,29; 22,82; 22,61; 21,56; 14,05

## 5.2 Spectrométrie de masse

Du choix du solvant va dépendre la réponse à l'ionisation (ou séparation de charges dans le cas d'ions déjà présents en solution) des composés d'intérêt. Une solution d'eau pure sera ainsi difficile à ioniser de façon stable car sa tension de surface est trop élevée. Dans notre cas, 1 mg de produit est solubilisé dans 1 mL de MeOH. Les solutions injectées sont solubilisées suivant un rapport 1/1000.

Les expériences ont été effectuées sur un spectromètre de masse à trappe ionique LCQ Advantage (ThermoFinnigan, San Jose, CA) équipé d'une source d'ionisation par électronebulisation (ESI) orthogonale. Les spectres ont été obtenus en mode positif dans la gamme M/z 150-2000 dans les conditions suivantes :

Source (ESI +)		Analyseur	
Gaz de nébulisation (u.a.)	20	Octopôle 1	-3 V
Gaz auxiliaire (u.a.)	0	Tension de lentille inter octopôles	-16 V
Tension de spray	4,5 kV	Octopôle 2	-7 V
Température du capillaire de transfert	130 °C		
Tension du capillaire de transfert	10 V		
Lentille de tube	0 V		

Les expériences de SM2 ont été effectuées dans une trappe ionique par dissociation activée par collision utilisant un gaz d'hélium à 0,1 Pa. Les expériences de SMRE ont été réalisées avec un pas de 6 Thomson (M/z) pour isoler le précurseur sélectionné. Cet ion est activé pour des pourcentages d'énergie de collision normalisée (% ECN) croissants (par étapes de 0,2 % ECN toutes les 30 s), avec une valeur de  $q_z$  maintenue à 0,25 % ECN (correction expérimentale de l'efficacité de fragmentation en fonction du rapport M/z)<sup>18</sup>. Deux microscans de 200 msec sont effectués par scan. Le logiciel Xcalibur, version 1,5 (ThermoFinnigan) est ensuite utilisé pour l'acquisition des données. Les ions sont isolés par leur masse exacte. Le courant ionique final est normalisé en divisant le courant ionique mesuré ( $IC^{Raw}$ ) par la somme des courants ioniques des 6 principaux ions (équation 1).

$$IC^{Final} = \frac{IC^{Raw}}{\sum_{i=1}^6 IC_i} \quad (1)$$

Chaque expérience de SMRE pour un gemini particulier est répétée trois fois. La courbe de rupture obtenue est extrapolée par une équation de Boltzman (équation 2), pour obtenir les énergies de collision nécessaires à la fragmentation de 50 % du précurseur ( $EC_{50}$ ).

$$y = \frac{a}{1 + e^{(cE_{50} - x)/c}} \quad (2)$$

où  $a$  est la réponse maximale (100 %) et  $c$  représente la pente de la courbe de rupture.

- Annexe -

1. *pKa* des anions utilisés pour l'étude de gemini – contre ion en phase gaz

X ↓	pKa
F <sup>-</sup>	3,17
Cl <sup>-</sup>	-7
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-1,3
Br <sup>-</sup>	-9
I <sup>-</sup>	-11
PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	-16
CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	0,23

Tableau II A-1 : Valeurs de pKa à 25 °C. F<sup>-19</sup>, Cl<sup>-20</sup>, Br<sup>-21</sup>, I<sup>-22</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-23</sup>.

Le **pKa** est un indicateur de l'affinité d'un anion pour un proton en solution aqueuse. La dissociation de l'acide HA,  $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$ , est reliée à la variation d'énergie libre qui accompagne la dissociation par la relation thermodynamique suivante :

$$RT \ln Ka = \Delta G_{aq}^{\circ} = G_{aq}^{\circ}(H^+) + G_{aq}^{\circ}(A^-) - G_{aq}^{\circ}(AH)$$

A une température donnée, le pKa s'écrit simplement :

$$pKa = \Delta G_{aq}^{\circ} / 2,303 RT$$

L'énergie libre totale est la somme des contributions électroniques et thermiques en phase gaz et de l'énergie libre de solvation :

$$G_{aq}^{\circ} = E_{elec} + \Delta G_{therm}(T) + \Delta G_{solv}$$

où  $E_{elec}$  est l'énergie électronique totale,  $\Delta G_{therm}$  est la correction de l'énergie libre pour une température T donnée, et  $\Delta G_{solv}$  est l'énergie de solvation. En solution aqueuse, l'énergie libre de solvation correspond à l'énergie libre d'hydratation.

## 2. Interactions en solution et en phase gaz

Les forces d'interaction sont extrêmement différentes en solution et en phase gaz. En solution, les champs électriques locaux engendrés par les charges et autres dipôles sont écrantés par le solvant (l'eau possède une constante diélectrique particulièrement élevée) et les interactions sont donc moins intenses qu'en phase gaz. De la même façon, les molécules d'eau entrent en compétition avec les molécules d'intérêt pour la création de liaisons hydrogène. Enfin, les interactions hydrophobes sont absentes en phase gaz du fait de l'évaporation du solvant au cours des différentes étapes de désolvation des ions.

Type d'interaction	Rayon d'action (Å)	Force (kcal.mol <sup>-1</sup> )	
		Dans l'eau	Dans le vide
Covalente	1,5	90	90
Electrostatique	> 25	3	80
Hydrogène	2,8 – 4,5	1 – 2,5	4
Van der Waals	8 - 10	0,1	0,1
Hydrophobe		20 – 50 cal.mol <sup>-1</sup> .Å <sup>2</sup>	inexistante

Tableau IIA-2 : Caractéristiques des liaisons faibles en solution et en phase gazeuse.

## 3. Calculs ab initio

### Enthalpies de complexation

X <sup>-</sup> ↓	Espaceur →	2	3	4
	F <sup>-</sup>	-197.3	-189.3	-183.4
	Cl <sup>-</sup>	-167.8	-160.6	-152.1
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-172.6	-168.5	-160.3
	Br <sup>-</sup>	-169.7	-163.1	-154.6
	I <sup>-</sup>	-157.6	-150.4	-141.3

Tableau IIA-3 : Valeurs des enthalpies de complexation (kcal.mol<sup>-1</sup>) calculées par la méthode DFT pour les gemini de longueur d'espaceur 2, 3 et 4 carbones, complexés aux contre ions X<sup>-</sup> = F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> et I<sup>-</sup>.

Enthalpies d'activation

Espaceur →	2		3		4	
X <sup>-</sup> ↓	E2	S <sub>N</sub> 2	E2	S <sub>N</sub> 2	E2	S <sub>N</sub> 2
F <sup>-</sup>	12,1	18,7	11,4	20,6	21,2	20,9
Cl <sup>-</sup>	24,0	21,1	23,6	21,1	28,7	19,5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20,9	22,0	29,6	25,3	31,1	23,5
Br <sup>-</sup>	28,4	20,4	29,5	20,0	32,5	18,8
I <sup>-</sup>	27,3	19,8	28,8	19,0	31,6	17,9

Tableau IIA-4 : Valeurs des enthalpies d'activation  $\Delta H^\ddagger$  des réactions d'E2 et de S<sub>N</sub>2 (kcal.mol<sup>-1</sup>) calculées par le méthode DFT pour les gemini de longueur d'espaceur 2, 3 et 4 carbones, complexés aux contre ions X<sup>-</sup> = F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> et I<sup>-</sup>.

4. Propriétés physico-chimiques des anions étudiés

X ↓	A <sub>p</sub>	R (nm)
F <sup>-</sup>	371,3	0,133
Cl <sup>-</sup>	333,4	0,181
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	324,5	0,179
Br <sup>-</sup>	323,5	0,196
I <sup>-</sup>	314,3	0,220

Tableau IIA-5 : Valeurs d'affinité pour les protons (A<sub>p</sub>) (F<sup>-24</sup>, Cl<sup>-25</sup>, Br<sup>-26</sup>, I<sup>-27</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-28</sup>) et rayon ionique dans le cristal (R)<sup>29</sup>.

## Références

- 
- <sup>1</sup> Loo, J.A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 175
- <sup>2</sup> Borch, J., Jorgensen, T.J.D., Roepstorff, P. *Curr. Opin. Struct. Biol*
- <sup>3</sup> Hofstadler, S.A., Griffey, R.H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 377
- <sup>4</sup> Pan, S., Sun, X., Lee, J.K. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 238
- <sup>5</sup> Benesch, J.L.P., Robinson, C.V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 509
- <sup>6</sup> Nohara, D., Bitoh, M. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1434
- <sup>7</sup> Sharon, M., Ilag, L.L., Robinson, C.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8740
- <sup>8</sup> Streitwieser, A.Jr. **1962**. Solvolytic displacement reactions. New-York: MacGraw-Hill.
- <sup>9</sup> Brauman, J.I., Blair, L.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5986
- <sup>10</sup> Brauman, J.I., Riveros, J.M., Blair, L.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3914
- <sup>11</sup> Olmstead, W.N., Brauman, J.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4219
- <sup>12</sup> Riveros, J.M., José, S.M., Takashima, K. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1985**, *21*, 197
- <sup>13</sup> Gronert, S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 329
- <sup>14</sup> Gronert, S. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 100
- <sup>15</sup> Gronert, S. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 848
- <sup>16</sup> Gross, D.S., Williams, E.R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1996**, *158*, 305
- <sup>17</sup> Gronert, S., Azebu, J. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 503
- <sup>18</sup> Lopez, L.L., et al.,. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1999**, *13*, 663
- <sup>19</sup> Blondel, C., Delsart, C., Goldfarb, F. *J. Phys. B.* **2001**, *34*, 281
- <sup>20</sup> Martin, J.D.D., Hepburn, J.W. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 8139
- <sup>21</sup> Blondel, C., Cacciani, P., Delsart, C., Trainham, R. *Phys. Rev. A.* **1989**, *40*, 3698
- <sup>22</sup> Hanstorp, D., Gustafsson, M. *J. Phys. B.* **1992**, *25*, 1773
- <sup>23</sup> Ferguson, E.E., Dunkin, D.B., Fehsenfeld, F.C. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 1459
- <sup>24</sup> Blondel, C., Delsart, C., Goldfarb, F. *J. Phys. B.* **2001**, *34*, 281
- <sup>25</sup> Martin, J.D.D., Hepburn, J.W. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 8139
- <sup>26</sup> Blondel, C., Cacciani, P., Delsart, C., Trainham, R. *Phys. Rev. A.* **1989**, *40*, 3698
- <sup>27</sup> Hanstorp, D., Gustafsson, M. *J. Phys. B.* **1992**, *25*, 1773
- <sup>28</sup> Ferguson, E.E., Dunkin, D.B., Fehsenfeld, F.C. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 1459
- <sup>29</sup> Marcus Yizhak. Ion properties, **1997**



## Chapitre 3 :

### Contrôle des morphologies d'auto-assemblage de gemini tartrate

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de la rédaction de deux publications.

Brizard, A., Aime, C., Labrot, T., Huc, I., Berthier, D., Artzner, F., Desbat, B., Oda, R. (2007) *Counterion, Temperature, and Time Modulation of Nanometric Chiral Ribbons from Gemini-Tartrate Amphiphiles*. J. Am. Chem. Soc. 129, 3754

Delclos, T., Aimé, C., Brizard, A., Pouget, E., Delville, M.H., Huc, I., Oda, R. *Individualized silica nano helices and nano tubes formation. Tuning inorganic nano structures with lipidic self-assemblies*. En préparation.

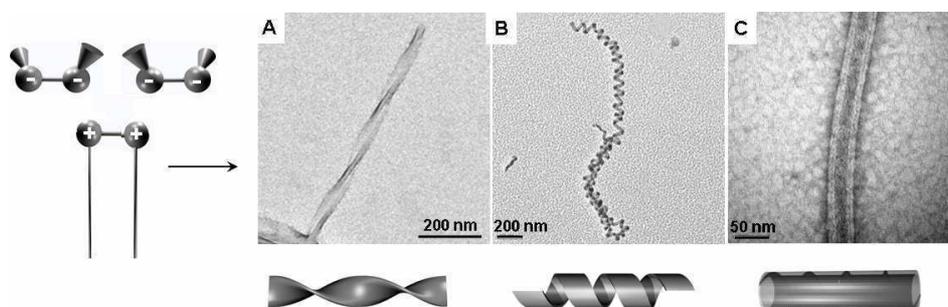


## 1 Introduction

Le travail bibliographique présenté au chapitre 1 illustre la diversité des molécules amphiphiles et des morphologies résultant de leur auto-assemblage. La principale force motrice responsable de ce phénomène est l'effet hydrophobe. Cependant, l'auto-organisation de molécules chargées varie de façon importante en fonction du contre ion complexé. Ainsi, un choix judicieux de contre ion peut conférer aux auto-assemblages des propriétés déterminées. C'est le cas par exemple de l'utilisation du contre ion tartrate.

Le tartrate est un dianion chiral. Lorsqu'il est complexé à un gemini, le tensioactif ionique résultant présente deux propriétés particulièrement intéressantes. Les gemini tartrate ont la propriété de former des gels à des concentrations faibles (de l'ordre de quelques millimolaires), aussi bien dans l'eau qu'en solvants organiques<sup>1</sup>. Ce comportement ambivalent est permis par la formation de bicouches à la fois en milieu aqueux et organique<sup>2</sup>. A la différence des gels de polymères, les gels de gemini tartrate reposent sur des interactions non covalentes. Ces gels, caractérisés par leur état métastable, sont maintenus au-delà de plusieurs années.

De plus, l'auto-assemblage résultant présente une chiralité supramoléculaire : la formation de rubans torsadés, hélicoïdaux et de tubules est observée (Figure III-1). Partant d'un amphiphile achiral, ce comportement représente un nouvel exemple de transfert de chiralité. La chiralité du contre anion tartrate s'exprime à l'échelle supramoléculaire. Cette étude a fait l'objet d'une partie des travaux de doctorat de Damien Berthier<sup>3</sup> et d'Aurélié Brizard<sup>4</sup>.



**Figure III-1 : Clichés de microscopie électronique en transmission (MET) présentant la diversité de morphologies obtenue par la complexation d'un contre anion tartrate chiral à un gemini achiral :**

(A) torsade, (B) hélice, et (C) tubule.

La singularité de ce système réside dans le fait que la chiralité mésoscopique est induite non pas par l'amphiphile lui-même, mais par son contre ion. Ces systèmes permettent l'accès à une grande variété de morphologies, modulables de façon indépendante par différents biais. Par exemple, si un gemini 16-2-16<sup>a</sup> est complexé à un contre ion L-tartrate (Figure III-2), la chiralité supramoléculaire résultante (sens d'hélicité) est droite. A l'inverse, lorsque le D-tartrate est complexé, la chiralité supramoléculaire est gauche.

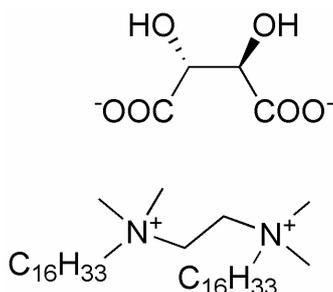


Figure III-2 : Structure moléculaire du gemini 16-2-16 L-tartrate.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les différents paramètres expérimentaux et structuraux permettant de contrôler les architectures supramoléculaires obtenues. Nous nous intéresserons ensuite particulièrement aux tubules et à leur cinétique de formation. Du fait de leurs nombreuses applications potentielles, ces structures font l'objet d'études de leurs propriétés physico-chimiques.

Enfin, la diversité des morphologies accessibles avec ces systèmes sera exploitée pour tenter de reproduire ces architectures par réplique et ainsi s'inscrire dans le domaine des matériaux inorganiques.

Au sein de ce projet, ma participation a consisté essentiellement à affiner les divers paramètres déterminant les morphologies d'assemblages chiraux (présentés dans le paragraphe *Travaux antérieurs*), ainsi qu'à étudier la cinétique de formation des tubes. Enfin, j'ai également participé au développement de l'axe représenté par la réplique inorganique des morphologies chirales obtenues à partir de gels de gemini tartrate.

---

<sup>a</sup> La notation utilisée ici est identique à celle décrite dans le chapitre 1. Un gemini possédant deux chaînes symétriques à 16 carbones attachées à des têtes hydrophiles reliées par un espaceur éthylénique (2 carbones) sera noté 16-2-16.

## 2 Contrôle des morphologies. Travaux antérieurs

La complexation du contre anion chiral tartrate à un gemini induit la formation de structures supramoléculaires chirales, telles que les rubans torsadés et hélicoïdaux. Différents paramètres permettent de contrôler les morphologies des auto-assemblages de gemini tartrate de façon indépendante<sup>5</sup>. Il s'agit à la fois de paramètres expérimentaux (temps, température, additifs) et de paramètres structuraux (excès énantiomérique et structure moléculaire de l'amphiphile).

### 2.1 Contrôle des morphologies en fonction du temps

Parmi les divers paramètres permettant de contrôler les morphologies supramoléculaires d'assemblage, le temps de vieillissement du gel permet d'accéder à l'ensemble de la diversité structurale obtenue à partir des gemini tartrate.

Le vieillissement de chaque échantillon est déterminé à partir de sa solubilisation au dessus de sa température de Krafft (43°C). Après l'obtention d'un gel, les premières observations par MET des échantillons montrent la formation de rubans torsadés (Figure III-3A). Au cours du temps, ces structures se transforment en rubans hélicoïdaux (Figure III-3B), qui évoluent eux-mêmes en tubules (Figure III-3C).

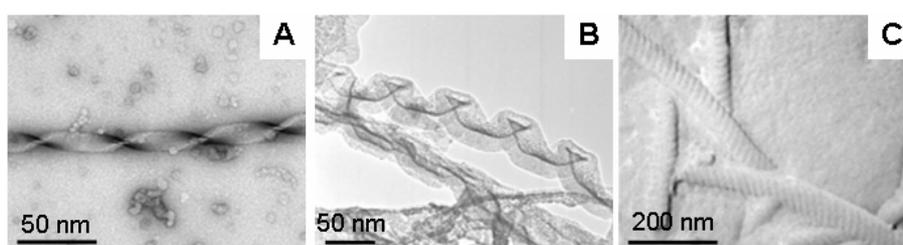


Figure III-3 : Clichés de MET présentant les variations de morphologies en fonction du temps.

La cinétique de transition d'une structure à l'autre est fortement dépendante d'autres paramètres, notamment la proportion des énantiomères L et D-tartrate complexés au gemini. Ainsi, les cinétiques de transition de morphologies et de formation des tubes feront l'objet d'une présentation détaillée dans le cadre de ma contribution à ce projet.

## 2.2 Contrôle des morphologies en fonction de la température

Après solubilisation de l'échantillon et retour à température ambiante (22 °C), un gel est rapidement formé (moins d'une heure). Le paragraphe précédent montre la succession de structures observées : de rubans torsadés à hélicoïdaux et aux tubules. Si la température est contrôlée et fixée à 40 °C, seuls les rubans torsadés sont observés (Figure III-4A). La diminution de la température en dessous de 35 °C permet la formation de rubans hélicoïdaux puis de tubes (Figure III-4B). Après retour à 40 °C, des torsades sont à nouveau formées.

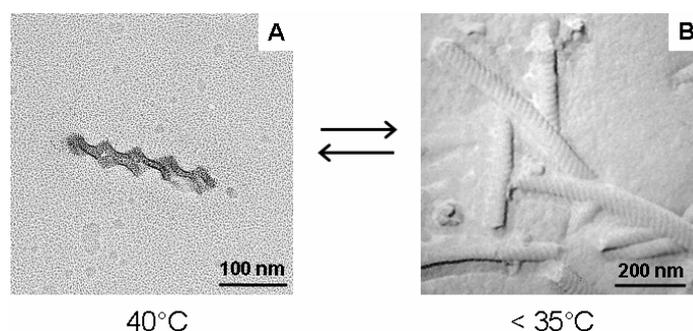


Figure III-4 : Clichés de MET présentant les variations de morphologies en fonction de la température de formation du gel.

En variant la température de l'échantillon, il est ainsi possible de varier les morphologies d'auto-assemblage des rubans chiraux et de les contrôler de façon réversible.

## 2.3 Contrôle des morphologies en fonction de la présence d'additifs

La variation de la stoechiométrie du système permet un contrôle fin des morphologies. Nous avons vu dans les paragraphes précédents, que la complexation de tartrate à un gemini 16-2-16 achiral permet la formation de structures tubulaires. Ces auto-assemblages chiraux résultent de la chiralité du contre anion, transférée de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire. L'ajout d'un gemini achiral complexé à un contre anion également achiral peut ainsi diminuer la chiralité résultante de l'échantillon et par conséquent modifier les morphologies d'auto-assemblage. C'est le cas de l'addition d'un gemini 16-2-16 complexé à deux contre ions bromure ( $\text{Br}^-$ ) par exemple. La présence du tensioactif achiral perturbe de façon importante les auto-assemblages en provoquant le déroulement des tubes. Si l'ajout d'1 % de tensioactif achiral n'est pas suffisant pour empêcher la formation de tubules (Figure III-5A), la présence d'1,5 % de 16-2-16 ( $\text{Br}$ )<sub>2</sub> provoque le déroulement des tubes. La

formation de rubans torsadés est observée : la chiralité supramoléculaire est conservée (Figure III-5B). A l'inverse, l'ajout de 4,7 % de 16-2-16 (Br)<sub>2</sub> induit la formation de rubans plats ne présentant plus de chiralité supramoléculaire (Figure III-5C).

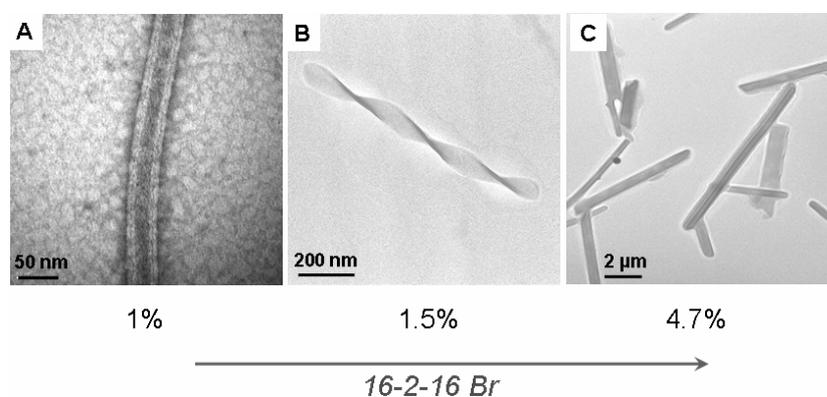


Figure III-5 : Clichés de MET présentant les variations de morphologies en fonction de l'addition de gemini 16-2-16 (Br)<sub>2</sub>.

Cet exemple de contrôle morphologique illustre le principe du transfert de chiralité de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire. La variation de la chiralité moléculaire globale du système a des répercussions directes sur les morphologies d'auto-assemblage qui présentent également une variation de chiralité supramoléculaire.

Une approche différente permettant de jouer sur la chiralité moléculaire consiste à varier l'énantiomère complexé. Ainsi, nous avons observé précédemment la formation de rubans torsadés droit dans le cas de gemini 16-2-16 D-tartrate, et gauche dans le cas de gemini L-tartrate. Nous nous intéresserons désormais aux cas intermédiaires, c'est-à-dire au mélange de différentes proportions de gemini L- et D-tartrate.

## 2.4 Contrôle des morphologies en fonction de l'excès énantiomérique

L'excès énantiomérique décrit la proportion des deux énantiomères complexés au gemini au sein d'un même échantillon. Lorsque les gemini d'un échantillon sont complexés à un énantiomère particulier (L- ou D-tartrate), l'excès énantiomérique (ee) est de 1 : une seule population d'énantiomères est présente. Ce paramètre est défini par la relation  $ee = (n_L - n_D) / (n_L + n_D)$ , où  $n_L$  et  $n_D$  sont les pourcentages d'énantiomères L- et D-tartrate complexés. Ainsi, un échantillon constitué de 60 % de 16-2-16 L-tartrate et 40 % de 16-2-16 D-tartrate est défini par un ee de 0,2.

### 2.4.1 Contrôle des morphologies des rubans

La variation de l'excès énantiomérique permet de modifier la chiralité moléculaire *globale* de l'échantillon. De cette façon, il est possible de contrôler les morphologies de manière subtile<sup>6</sup>.

Par exemple, dans le cas d'un mélange L-tartrate : D-tartrate (1 : 1), l'échantillon est racémique : l'excès énantiomérique est nul ( $ee = 0$ ). Dans ce cas, la chiralité globale de l'échantillon est également nulle. Cette information se traduit à l'échelle supramoléculaire par la formation de rubans plats ne présentant pas de chiralité (Figure III-6A). Si l' $ee$  est augmenté et devient non nul, une chiralité supramoléculaire apparaît. Par exemple, la formation de torsades est observée pour un  $ee$  de 0,2 (Figure III-6B). A partir d'une valeur de  $ee$  seuil (0,8), les rubans torsadés se transforment en rubans hélicoïdaux, puis en tubes (Figure III-6D, E). Les tubes sont obtenus à partir des rubans hélicoïdaux, du fait de la diminution du pas d'hélicité. Les bords de l'hélice se rapprochent jusqu'à entrer en contact, formant une structure continue. La Figure III-6E montre la présence d'une cavité à l'intérieur du tube formé. Cette cavité est ici matérialisée par un canal coloré, dû à l'insertion du colorant (acétate d'uranyle) utilisé lors de la préparation des échantillons pour l'observation par MET (cf partie expérimentale).

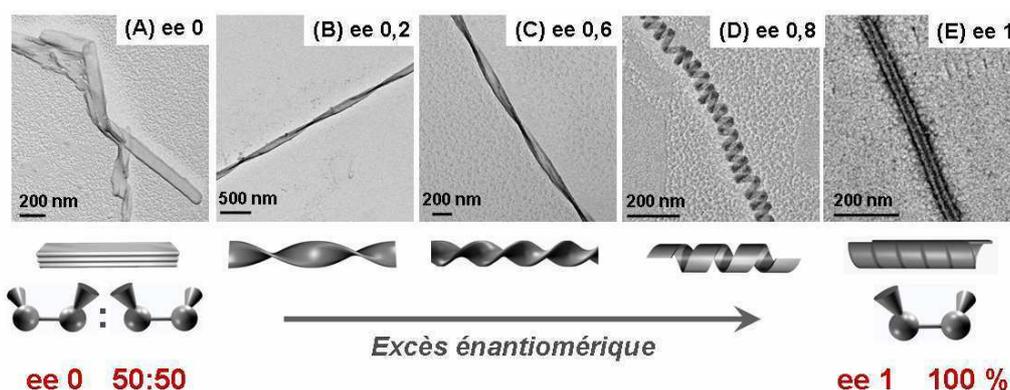


Figure III-6 : Clichés de MET présentant les variations de morphologies en fonction de l' $ee$ .

De plus, nous avons observé que la variation de l'excès énantiomérique induit une modulation continue des dimensions des rubans (épaisseur, largeur et pas d'hélicité).

## 2.4.2 Contrôle des dimensions des rubans

### Variation de la largeur et de l'épaisseur des rubans torsadés

L'étude statistique des caractéristiques structurales des rubans torsadés montre que la largeur et l'épaisseur de ces objets diminuent continûment avec l'augmentation d'excès énantiomérique (Figure III-7).

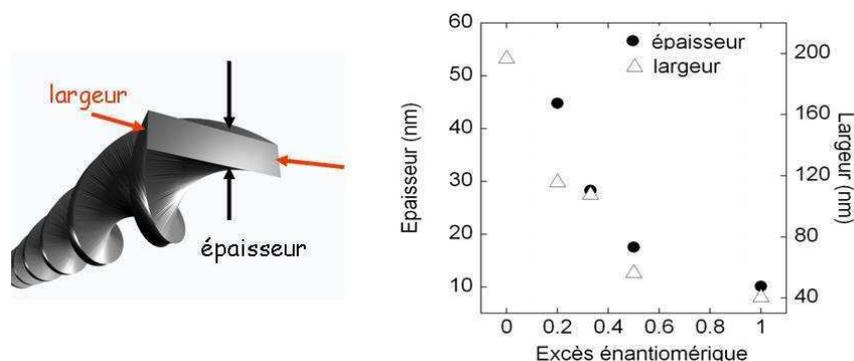


Figure III-7 : Variations de la largeur et de l'épaisseur des torsades en fonction de l'ee.

La diminution de l'épaisseur est associée à la variation du nombre de bicouches empilées au sein des auto-assemblages. Les travaux de thèse d'Aurélié Brizard<sup>4</sup> ont permis de décrire une relation entre le nombre de bicouches et l'ee. Le nombre de bicouches empilées varie ainsi suivant la relation  $n=2/ee$ . Lorsque l'ee est nul, l'empilement de bicouches est théoriquement infini. Ce nombre diminue avec l'augmentation de ee jusqu'à une valeur de deux bicouches dans le cas d'un échantillon d'ee 1.

### Variation du pas des rubans

Le pas des rubans torsadés est également affecté par la variation d'excès énantiomérique. L'augmentation progressive de l'ee de l'échantillon provoque la diminution continue du pas des rubans (Figure III-8).

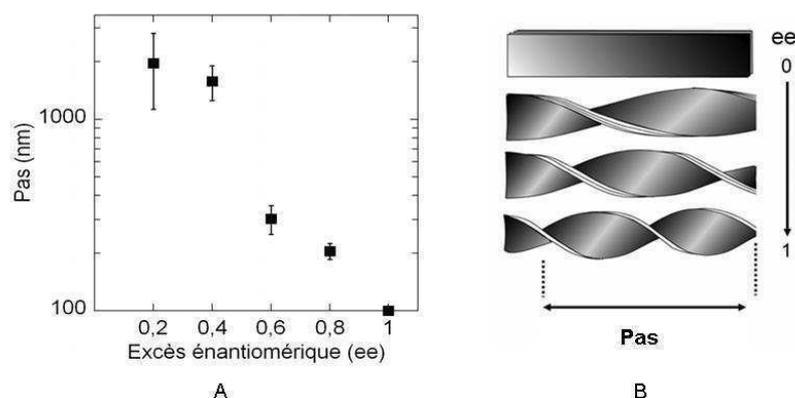
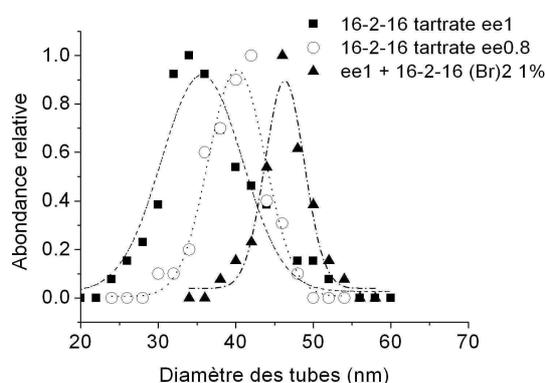


Figure III-8 : (A) Variation du pas des torsades en fonction de l'ee. (B) Le pas d'une torsade correspond à un tour complet du ruban.

Plus l'excès énantiomérique augmente, plus le caractère chiral est exprimé à l'échelle supramoléculaire : le pas des torsades diminue (Figure III-6B, C). Ceci se traduit par la formation de tubules dans le cas d'échantillons d'ee 0,8 et 1. De la même façon, le diamètre de ces tubes est modulé par l'excès énantiomérique.

#### Variation du diamètre des tubes

Si l'on considère la structure des tubules obtenues avec les échantillons d'ee 0,8 et 1, on observe une variation des diamètres extérieurs mesurés. Les tubes obtenus avec un échantillon 16-2-16 L-tartrate d'ee 0,8 présentent un diamètre de  $40,1 \pm 3,7$  nm. Dans le cas d'un échantillon 16-2-16 L-tartrate d'ee 1, le diamètre des tubes est diminué. L'étude statistique révèle alors une valeur de  $35,6 \pm 5,4$  nm (Figure III-9).



**Figure III-9 : Statistique des diamètres des tubes obtenus à partir des échantillons de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 0,8 (statistique mesurée sur un panel de 42 échantillons), d'ee 1 (40 échantillons) et d'ee 1 en présence d'1 % de gemini 16-2-16 (Br)<sub>2</sub> (35 échantillons).**

Enfin, nous avons vu précédemment que l'addition d'1 % du gemini achiral 16-2-16 (Br)<sub>2</sub> permet également l'obtention de tubules. L'ajout de ce tensioactif achiral affecte le diamètre des tubes de façon importante en provoquant son augmentation : de  $35,6 \pm 5,4$  nm à  $46,3 \pm 2,5$  nm (Figure III-9).

Cette étude montre qu'en jouant simplement sur les rapports des populations des deux énantiomères, il est possible d'obtenir une grande diversité de structures : rubans plats, torsadés, hélicoïdaux et tubules. De plus, de cette façon les dimensions des structures obtenues peuvent être contrôlées finement.

Ce système représente ainsi le premier exemple de contrôle continu de la chiralité supramoléculaire d'un auto-assemblage de molécules amphiphiles, dans lequel la chiralité de contre ions tartrate de quelques Angströms est transférée à une échelle micrométrique.

## 2.5 Contrôle du diamètre des tubes en fonction de la structure du gemini

Le diamètre des tubes auto-assemblés peut être contrôlé par la variation de l'excès énantiomérique de l'échantillon de gemini tartrate, ainsi que par l'addition d'un tensioactif achiral. Ainsi nous avons vu que les tubes obtenus à partir de gemini 16-2-16 présentent des diamètres de 35 à 46 nm. Une approche différente permettant de contrôler cette dimension consiste à modifier la structure du gemini, en variant la longueur des chaînes aliphatiques.

Nous avons observé que les gemini 14-2-14 et 18-2-18 tartrate (d'ee 1) s'auto-assemblent également en tubules. En considérant les trois longueurs de chaînes étudiées (14, 16 et 18 carbones), nous constatons l'augmentation du diamètre des tubes avec la longueur des chaînes. Alors que dans le cas d'un échantillon de gemini 16-2-16 tartrate d'ee 1 le diamètre mesuré est de  $35,6 \pm 5,4$  nm, il est réduit à  $33 \pm 4,2$  nm dans le cas de gemini 14-2-14 tartrate et augmenté à  $48,5 \pm 1,2$  nm dans le cas de gemini 18-2-18 tartrate (Figure III-10). Ainsi, le diamètre des tubules de gemini tartrate est modulable par différentes voies de contrôle.

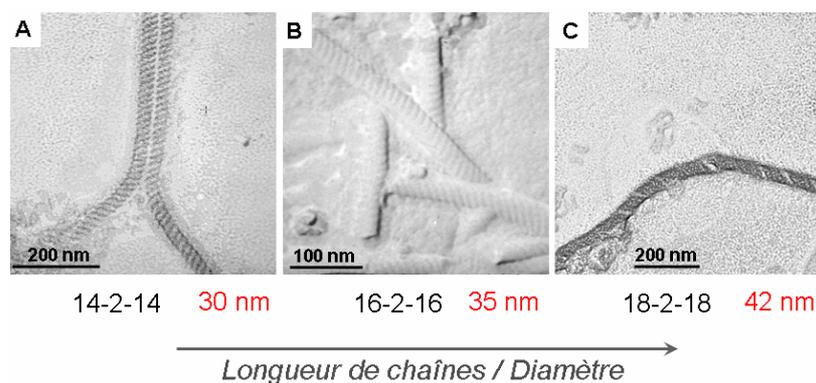


Figure III-10 : Clichés de MET présentant les variations de diamètres des tubes en fonction de la longueur des chaînes aliphatiques du gemini.

Parmi les systèmes tubulaires auto assemblés reportés dans la littérature, les systèmes de gemini tartrate se distinguent par une cinétique de formation des tubes relativement lente, présentant un polymorphisme de structures intermédiaires particulièrement riche.

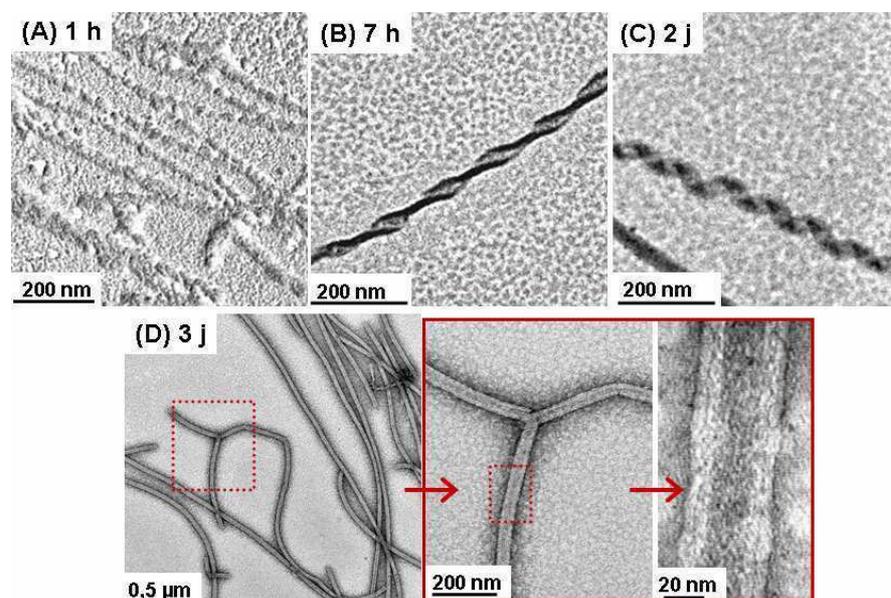
L'obtention de tubes est intéressante notamment pour l'encapsulation de substances organiques ou inorganiques, et pour leur utilisation en tant que vecteurs ou nanocanaux. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à la formation de ces structures, d'un point de vue cinétique et morphologique. Nous avons ainsi étudiés les échantillons de gemini 16-2-16 tartrate d'ee 0,8 et 1, permettant la formation de telles structures.

### 3 Cinétique de formation des tubes

Dans ces expériences, l'échantillon est solubilisé (au-dessus de sa température de Krafft, 43 °C) puis laissé à température ambiante. Des fractions de l'échantillon sont ensuite prélevées à différents temps après solubilisation et observées par MET.

#### 3.1 Excès énantiomérique 0,8

La Figure III-11 présente la cinétique de formation de tubes à partir d'un échantillon de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 0,8. Une heure après solubilisation, de longues structures fibrillaires ne présentant pas de chiralité supramoléculaire apparaissent. Sept heures après solubilisation de l'échantillon, les premières torsades se forment : la chiralité supramoléculaire est observée sans ambiguïté. Après deux jours, les rubans torsadés se transforment en rubans hélicoïdaux, et les premiers tubes apparaissent après trois jours.



**Figure III-11 : Clichés de MET présentant la cinétique de formation de tubes à partir de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 0,8 (5 mM). Les clichés encadrés ont été obtenus à partir de l'échantillon présenté en (D) à des grossissements plus importants.**

Les clichés de MET obtenus à de forts grossissements (Figure III-11D) montrent clairement la structure des tubes obtenus. Ces tubes sont constitués d'une double paroi (double bicouche) et possèdent une cavité d'un diamètre légèrement inférieur à 20 nm.

### 3.2 Excès énantiomérique 1

En ce qui concerne l'échantillon de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 1, la cinétique de formation des tubes est différente (Figure III-12). Une heure après solubilisation de l'échantillon, des fibres ne possédant pas de chiralité supramoléculaire sont observées. Les fibres présentant un début de chiralité sont formées après seulement deux heures. Les premiers rubans hélicoïdaux apparaissent après trois heures. A ce stade, on observe toujours des fibres non chirales. La population s'homogénéise avec le temps en faveur des rubans hélicoïdaux jusqu'à environ 21 h : des rubans plus larges apparaissent. Rapidement, ces derniers rubans deviennent majoritaires. L'échantillon est à nouveau mono disperse après 24h. Enfin, le pas des rubans hélicoïdaux diminue avec le diamètre des objets formés. Les premiers tubes sont observés après 36 h. Ces tubes présentent une structure similaire à ceux observés avec l'échantillon ee 0,8. Leurs parois présentent un empilement de deux bicouches et délimitent une cavité interne de diamètre 18 nm.

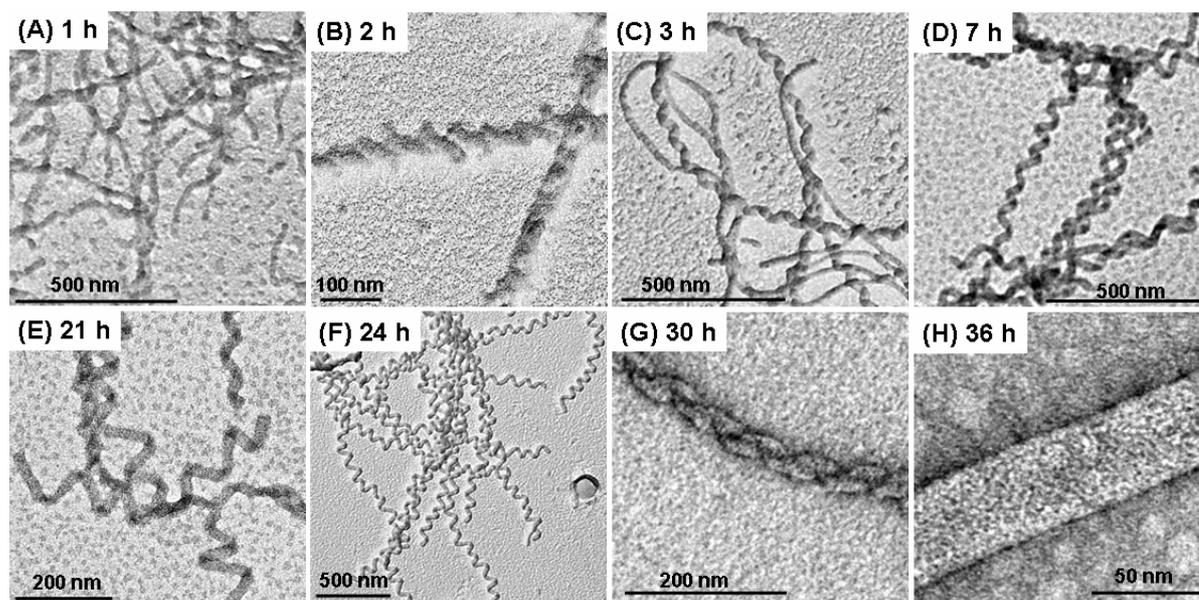


Figure III-12 : Cinétique de formation de tubes de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 1 (5 mM) par MET.

Si la cinétique de formation des tubules est plus rapide dans le cas de l'ee 1 que pour l'ee 0,8 (36 heures contre 3 jours respectivement), une variation des transitions de morphologies est également observée (Figure III-13). Dans le cas de l'échantillon d'ee 0,8, la formation de tubes nécessite les transitions de fibres achirales à torsadées, puis de rubans torsadés à hélicoïdaux, les tubes se formant à partir de ces derniers. En revanche, dans le cas de l'échantillon d'ee 1, les torsades ne sont pas observées (Figure III-13).

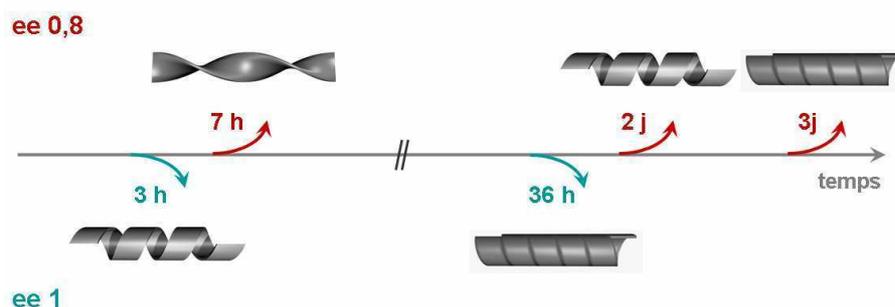


Figure III-13 : Représentation schématique de la cinétique et des transitions de morphologies observées au cours de la formation de tubes à partir de gemini 16-2-16 L-tartrate d'ee 0,8 et 1.

Cependant, nous avons observé précédemment (Figure III-12B) la formation de structures chirales de forme indéterminée, deux heures après solubilisation de l'échantillon d'ee 1. Etant donné la rapidité de la cinétique (les premiers rubans hélicoïdaux apparaissent seulement après 3 h), il est probable que la transition de structures impliquant des torsades ait lieu mais se fasse de façon trop rapide pour être observée par MET.

Les morphologies d'auto-assemblage des gemini tartrate peuvent être contrôlées de façons aussi multiples que variées : temps, température, présence d'additifs, excès énantiomérique et longueur des chaînes aliphatiques. La diversité et le contrôle subtil de ces morphologies permet d'envisager des applications dans le domaine des matériaux. En particulier, ces caractéristiques font de ces objets organiques d'intéressants supports pour la réplique inorganique.

Dans le but d'utiliser ces architectures organiques pour la croissance de matériaux inorganiques et la transcription des différentes morphologies, une collaboration a été mise en place avec les équipes de Marie-Hélène Delville, directrice de recherche à l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB) et d'Ivan Huc, directeur de recherche à l'IECB, et particulièrement avec Thomas Delclos, en doctorat entre ces deux équipes.

## 4 Réplication inorganique

Depuis la fin des années 1990, de nombreux groupes se sont intéressés à la conception de matériaux inorganiques à partir de supports organiques<sup>7,8,9</sup>. Cette approche permet d'obtenir des structures d'échelles variées, d'architecture et de porosité contrôlées<sup>10,11</sup>. Du fait de la stabilité de leur comportement d'agrégation, les gels sont rapidement devenus d'intéressants candidats à la réplication<sup>12</sup>. En 1998, Shinkai a reporté les propriétés de gélifiant de dérivés du cholestérol. La formation de ces gels a permis de confiner le précurseur de silice tétraéthoxysilane (TEOS). Un gel de silice est ainsi obtenu par polymérisation sol-gel. La calcination de ce gel permet l'obtention d'une réplique de silice de structure fibrillaire<sup>13</sup>. Depuis ces travaux, Shinkai a apporté une contribution particulièrement importante à ce domaine, utilisant les gels comme support à la conception de structures de silice de morphologies variées, telles que les fibres linéaires<sup>14</sup>, les lamelles<sup>15,16</sup>, les fibres hélicoïdales<sup>17,18</sup> ainsi que les structures sphériques<sup>19</sup>. Cependant, malgré les nombreux travaux développés à ce jour la morphologie des répliques n'est pas toujours contrôlée<sup>20</sup>.

### 4.1 Méthode de réplication

#### 4.1.1 Polymérisation de la silice

La nature chargée négativement des molécules de TEOS (SiOEt)<sub>4</sub> hydrolysées permet la condensation des précurseurs de silice sur la membrane cationique des gemini auto-assemblés. En effet, le processus de réplication nécessite la présence de sites accepteurs de liaisons hydrogène, ou de charges positives pour permettre la polymérisation de la silice. De ce fait, les tensioactifs cationiques composés d'ammoniums quaternaires ont été fréquemment utilisés comme supports<sup>21</sup>. La force motrice de ce phénomène est la présence de charges cationiques sur les amphiphiles, qui entraîne le confinement des précurseurs anioniques de la silice, à la surface des bicouches (Figure III-14). Dans la majorité des protocoles utilisés, la réplication se fait en présence de benzylamine, catalyseur de la polymérisation de silice<sup>22</sup>.

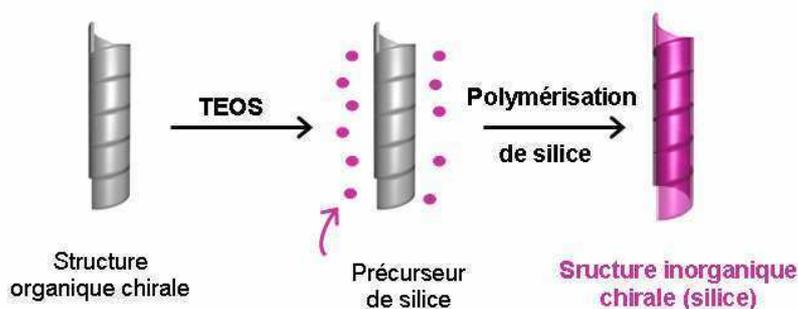


Figure III-14 : Représentation schématique des étapes de la réplique des architectures organiques.

Le projet de réplique des morphologies obtenues avec les gels de gemini tartrate a débuté au début des années 2000, par une collaboration avec le groupe de Shinkai au Japon. L'objectif principal de ce projet consistait à reproduire les variations de pas des rubans suite aux variations d'excès énantiomérique. Le protocole de réplique utilisé au cours de ces travaux consistait à mélanger le gemini et le précurseur de silice en large excès (~ 1000 fois) dans un mélange eau /pyridine (1 :1) en présence de benzylamine (2,3 %). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé jusqu'à obtention d'une solution limpide. L'échantillon est laissé à température ambiante (22 °C) pendant 3 jours, séché sous vide puis calciné. Dans ces conditions, des répliques de silice ont été obtenues, présentant une architecture torsadée de sens d'hélicité conservé par rapport au support organique<sup>23</sup>. De plus, il a été possible de contrôler le pas d'hélicité, en variant l'excès énantiomérique de l'échantillon organique (Figure III-15). Une diminution du pas de la torsade inorganique est observée, de façon comparable à ce qui a été présenté précédemment dans l'eau, à partir des systèmes organiques.

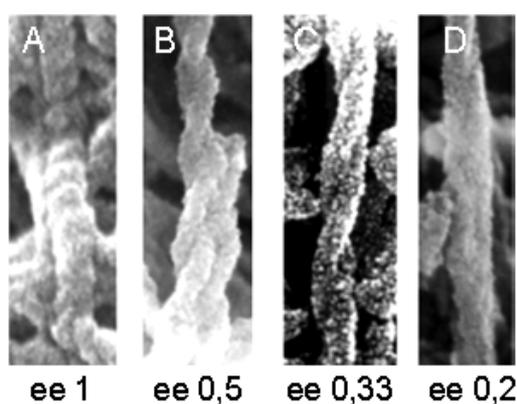


Figure III-15 : Clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) présentant la variation du pas des torsades répliquées en fonction de l'ee du gel organique de gemini tartrate support [23].

Dans le but d'approfondir ces travaux, les expériences ont été poursuivies au sein de notre laboratoire. L'enjeu de ce projet consiste à reproduire la diversité des morphologies

observées avec les systèmes organiques. En particulier, nous nous sommes intéressés à la réplification des tubules, formées à partir de gels de gemini tartrate d'ee 1.

Au sein de ce projet, mon travail a consisté à la participation de la mise en place des stratégies de réplification des différentes structures, notamment en ce qui concerne la préparation du matériel organique, ainsi qu'en l'observation par MET de l'ensemble des structures présentées dans cette section. Les réplifications inorganiques ont été effectuées par Thomas Delclos. Dans un premier temps, nous avons procédé à l'adaptation du protocole de transcription inorganique.

#### **4.1.2 Optimisation des conditions de réplification**

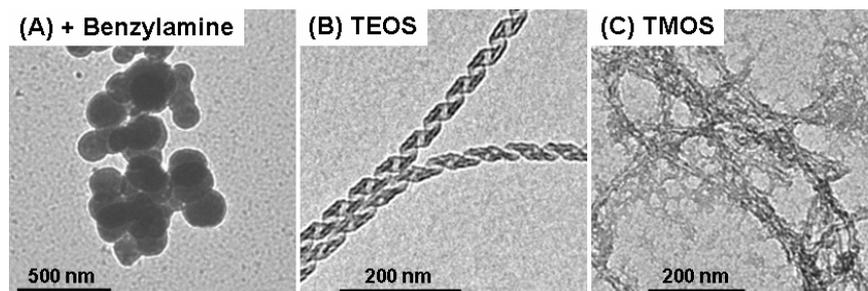
Pour déterminer les conditions nécessaires à l'obtention de répliques, plusieurs paramètres peuvent être testés : la composition du milieu réactionnel, l'influence de la concentration du gel, du temps et de la température de transcription notamment. Au cours de ce processus d'optimisation, en l'absence de précisions supplémentaires, nous avons essayé de transcrire des gels de gemini 16-2-16 L-tartrate d'excès énantiomérique 1 (énantiomère pur). Le gel, de concentration 5 mM, est laissé à vieillir à température ambiante pendant 3 semaines après solubilisation de l'échantillon. A ce stade, le gel formé est constitué d'un réseau de fibres nanométriques de morphologie tubulaire.

##### *Optimisation du milieu réactionnel*

Les premiers essais de réplification ont été réalisés au sein de notre laboratoire par Thomas Labrot. Dans ces expériences, le protocole utilisé est similaire à celui suivi par Shinkai pour la réplification de torsades de gemini tartrate. Ainsi, le milieu réactionnel est composé du précurseur de silice TEOS, dans un mélange eau/pyridine (1 :1) en présence de benzylamine (2,3 % en masse). Dans ces conditions, aucune réplique tubulaire n'a pu être obtenue. Nous avons ainsi choisi de débiter nos expériences en variant la composition du milieu réactionnel, et notamment en supprimant la pyridine.

Dans un premier temps, les réplifications ont été faites en utilisant du TEOS en large excès (~ 1000 fois) en présence de benzylamine dans de l'eau ultra pure. Les clichés de MET montrent la présence d'agrégats d'une centaine de nanomètres de diamètre (Figure III-16A),

résultant de la polymérisation de la silice. L'utilisation de ces conditions provoque l'augmentation de la basicité du milieu réactionnel. La catalyse de la polymérisation de la silice se fait de façon trop rapide. Aucune réplique n'a été obtenue avec ce protocole. En revanche, en absence de benzylamine, les répliques obtenues ont une forme très bien définie et montrent une hélicité conservée par rapport au support organique (Figure III-16B). La présence d'un catalyseur de polymérisation de la silice n'est ici pas nécessaire. Un tel exemple a également été récemment reporté dans la littérature<sup>24</sup>.



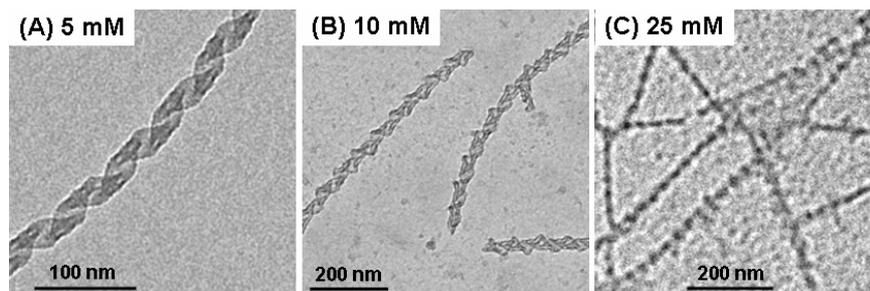
**Figure III-16 : Clichés de MET présentant les répliques obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM) dans différentes conditions de réplification (pendant 36 h à 22 °C).**

Enfin, un deuxième précurseur de silice a également été testé : il s'agit du tétraméthoxysilane (TMOS), plus réactif que le TEOS. Dans ce cas, si des objets fibrillaires sont perceptibles, les échantillons observés ne présentent pas de réplique exploitable (Figure III-16C).

Les échantillons obtenus avec les protocoles utilisant le TEOS en présence de benzylamine, ou le TMOS montrent une polymérisation trop rapide de la silice. Le TEOS en absence de catalyseur permet d'obtenir les meilleurs résultats. Ces conditions seront utilisées dans la suite de cette étude.

#### *Optimisation de la concentration de l'échantillon*

La qualité de la réplification des gels de gemini tartrate d'ee 1 a été testée pour des concentrations du gel de 1 à 25 mM. En dessous de 5 mM, aucune réplique n'est observée. Il semble que la quantité d'objets présents soit insuffisante pour induire la polymérisation de la silice. En revanche, à 5 et 10 mM, des répliques de qualité sont obtenues (Figure III-17A, B). Si la concentration est augmentée à 25 mM, les répliques ont une forme indéterminée : l'échantillon organique apparaît trop dense pour permettre une polymérisation homogène de la silice. La concentration optimale du gel organique est comprise entre 5 et 10 mM.

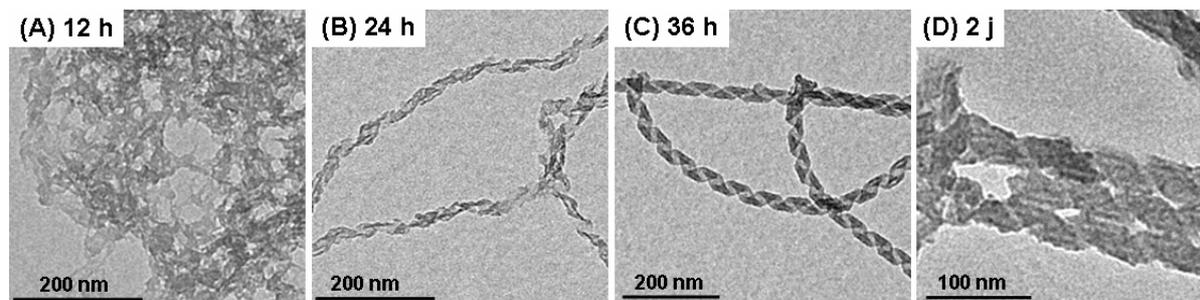


**Figure III-17 :** Clichés de MET présentant les répliques obtenues à partir d'un échantillon ee 1 à différentes concentrations (réplication de 36 h à 22 °C, induite après vieillissement du gel pendant 3 semaines).

Dans le but d'expliquer les résultats obtenus ci-dessus, deux hypothèses peuvent être formulées. En effet, puisque la quantité de TEOS ajoutée est constante, l'obtention de répliques et leur qualité résultent soit de l'augmentation de la concentration du gel, soit de la diminution du rapport TEOS :gel. Etant donné que le TEOS est en large excès par rapport au gel ( $\sim 0,5 \cdot 10^{-3}$  mol de TEOS pour  $2,5 \cdot 10^{-6}$  mol de gemini lorsque le gel a une concentration de 5 mM) une augmentation de la concentration du gel de 5 à 10 ou 25 mM ne modifie pas de façon significative le rapport entre les deux espèces. Dans ces conditions, il semble ainsi que la qualité des répliques résulte de la concentration du gel.

#### *Optimisation du temps de transcription*

Les échantillons, vieux de trois semaines, ont une concentration de 5 mM. Le TEOS est pré hydrolysé pendant 12h en milieu acide, préalablement à l'initiation de la réplique. Le TEOS pré hydrolysé est ensuite ajouté au gel organique, en large excès par rapport à ce dernier ( $\sim 1000$  fois). Le milieu réactionnel est laissé à température ambiante pendant alternativement 12, 24, 36 h et 2j avant rinçage à l'éthanol. Après 12 h, un amas diffus est observé, sans aucune réplique isolée (Figure III-18A). Dans ce cas, il semble que la réplique de silice ne soit pas assez solide pour être conservée après l'étape de rinçage. Les premières répliques sont observées après 24 h (Figure III-18B). Cependant, les objets restent mal définis.



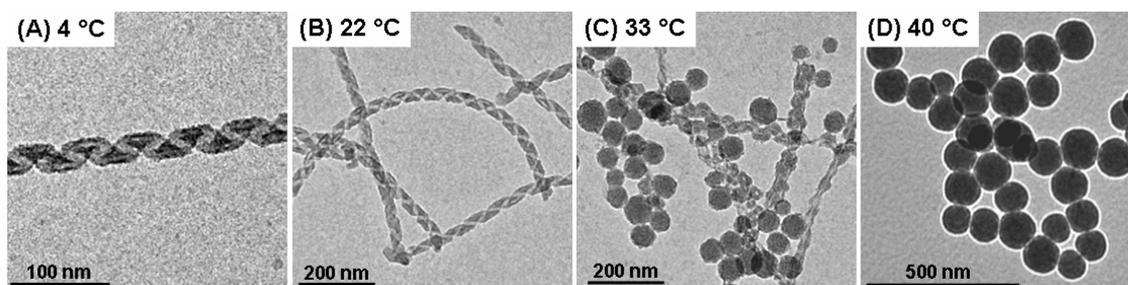
**Figure III-18 :** Clichés de MET présentant les répliques obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM) après différents temps de réplique (TEOS 10 % à 22 °C).

Les premières répliques présentant une morphologie correspondant à celle du support organique sont observées après 36 h de polymérisation (Figure III-18C). Des répliques hélicoïdales sont également observées après 2 jours (Figure III-18D). Cependant, dans ce cas, la paroi des hélices semble moins bien définie : la couche de silice est plus épaisse.

Dans la suite de cette étude, le temps de polymérisation de la silice sera fixé à 36 h.

#### *Optimisation de la température de transcription*

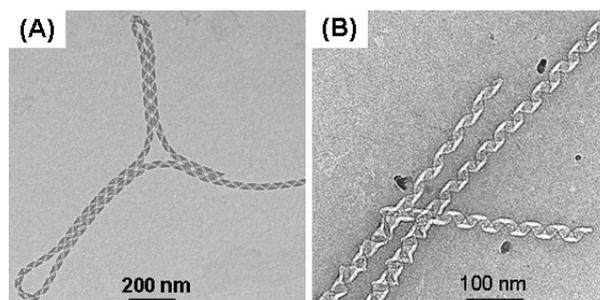
L'effet de la température de réplification a également été étudié. Quatre températures ont été testées (Figure III-19). A 4 et 22 °C, la polymérisation de la silice permet l'obtention de répliques définies, de morphologie conservée. A 33 °C, la polymérisation est trop rapide. Les répliques obtenues s'accompagnent d'agrégats sphériques de silice. Si la température est encore augmentée, ce phénomène est amplifié : seuls les agrégats sont observés.



**Figure III-19 : Clichés de MET présentant les répliques obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM) après réplification (TEOS 10 %, pendant 36 h) à différentes températures.**

#### *Optimisation du traitement post-réplification*

En fin de transcription, deux traitements des répliques peuvent être envisagés dans le but d'éliminer le matériel organique. Un lavage à l'éthanol peut être utilisé, permettant la solubilisation du matériel amphiphile. L'élimination du support organique peut également être réalisée par calcination des répliques. En ce qui concerne les échantillons étudiés jusqu'ici, seul le rinçage à l'éthanol a été utilisé. La Figure III-20 présente les clichés MET obtenus avec des échantillons lavés (A) et calcinés (B). Des répliques hélicoïdales bien définies sont obtenues dans chaque cas. Ces deux traitements semblent être également adaptés à la révélation des répliques.



**Figure III-20 : Clichés de MET présentant les répliques obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM) après réplification (TEOS 10 %, pendant 36 h à 22 °C) après lavage à l'éthanol (A) et calcination (B).**

Cette étude nous a permis d'obtenir des répliques bien définies, de morphologie conservée respectivement au support organique de gemini tartrate utilisé. Ce travail nous a permis de définir de bonnes conditions de réplification de ces objets. L'étude de la réplification de la diversité des architectures se fera dans les conditions de réplification suivantes : utilisation de TEOS en large excès (~ 1000 fois) dans l'eau, pendant 36 h, à 22 °C. Les répliques ne seront pas calcinées.

En l'absence de toute indication, le gel organique de gemini 16-2-16 tartrate utilisé possède un excès énantiomérique de 1 et une concentration de 5 mM. Ce gel est vieilli pendant trois semaines, présentant ainsi la formation de tubules à l'échelle nanométrique.

## 4.2 D'une diversité de morphologies à l'autre

A partir des gels de gemini tartrate, une grande diversité de morphologies est accessible. Etant donné que ces gels peuvent désormais être répliqués, nous nous sommes intéressés aux voies de contrôle des morphologies des répliques, en jouant à la fois sur les paramètres relatifs à la formation du gel et sur les paramètres relatifs à la réplification.

### 4.2.1 Effet du vieillissement du gel

Nous avons dans un premier temps transcrit des gels de concentration constante (5 mM) à différents temps de vieillissement : 5, 25 et 45 jours après solubilisation de l'échantillon. Pour ces trois temps de vieillissement, la formation de nanotubules organiques a été observée avant l'addition de TEOS pré hydrolysé. Cependant, après transcription,

différentes morphologies du matériel inorganique sont obtenues (Figure III-21). En effet, la transcription du gel vieux de 5 jours a permis la formation de torsades. La morphologie tubulaire n'a ainsi pas été conservée : le nanotube est déroulé. De même, 25 jours après solubilisation de l'échantillon, les nanotubes ne sont pas conservés. Les répliques inorganiques obtenues présentent une morphologie hélicoïdale. Au contraire, les répliques obtenues à partir d'un support vieux de 45 jours permettent la production de nanotubes de silice.

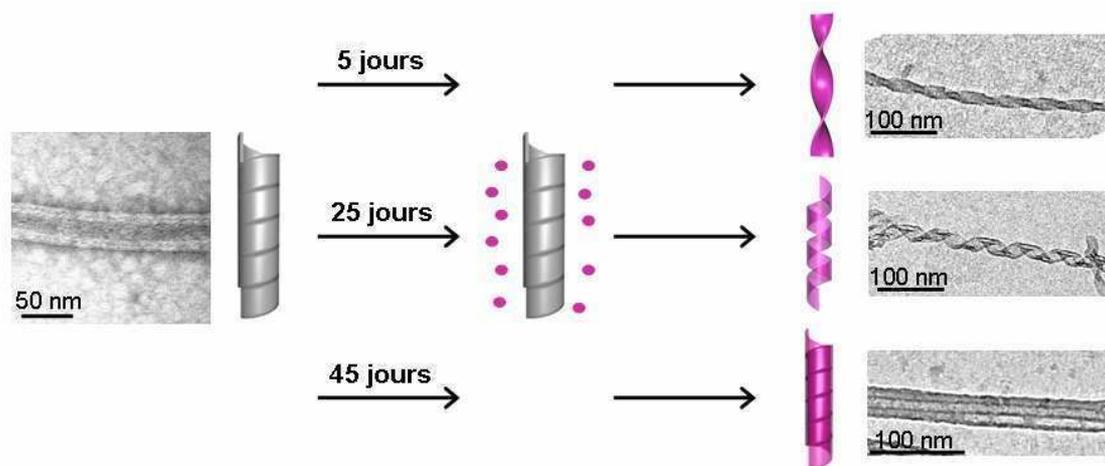


Figure III-21 : Clichés de MET présentant la diversité des morphologies obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM), en fonction du vieillissement du gel.

Partant de structures organiques présentant une morphologie unique, il a été possible de produire trois répliques inorganiques de morphologies différentes. Ceci apparaît surprenant étant donné qu'aucune distinction en MET n'a pu être faite entre les échantillons organiques vieux de 5, 25 et 45 jours. De plus, aucune distinction n'a été observée au cours de la caractérisation de ces gels par rayons X, RMN, ou encore infrarouge. Cependant, la réplification de ces gels apparemment identiques indique clairement que de subtiles différences les distinguent, permettant la transcription de ces diverses structures.

Ceci peut s'expliquer par le mécanisme de polymérisation sol-gel. Ces diverses structures inorganiques résultent de la polycondensation des précurseurs de silice (TEOS pré hydrolysé) puis de leur polymérisation. Etant donné la charge négative des précurseurs, leur condensation sur les membranes cationiques des gemini perturbe les auto-assemblages, du fait de la compétition qui s'établit entre les contre ions tartrate et les monomères hydrolysés du TEOS inorganiques (Figure III-22). Suite à cette perturbation, les rubans tubulaires se déroulent. Cependant, la structure des tubes vieux de 5, 25 ou 45 jours n'est pas perturbée de

la même façon. Cette perturbation semble directement corrélée à la stabilité des tubes organiques (qui augmenterait avec le temps).

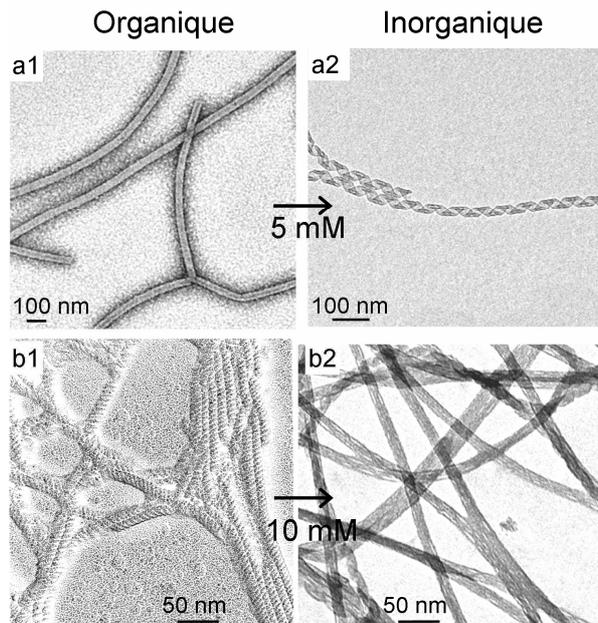


Figure III-22 : Représentation schématique de la compétition entre contre anions tartrate et monomères de TEOS pré hydrolysés au cours de la condensation de TEOS sur les membranes cationiques de gemini.

Du point de vue de la compréhension des mécanismes de formation des tubes, ce phénomène est intéressant puisqu'il rend possible la production de torsades inorganiques, difficiles à isoler dans le cas des systèmes organiques (ee 1). En effet, ces structures n'avaient pas été observées avec l'échantillon organique, étant donnée la cinétique rapide de formation des tubes. Pour un gel de gemini tartrate d'ee 1, les premiers rubans hélicoïdaux apparaissent 3 h après solubilisation de l'échantillon. La compétition entre tartrate et monomères de TEOS pré hydrolysés à la surface des bicouches de gemini révèle ainsi les structures intermédiaires, précurseurs des tubules.

#### 4.2.2 Effet de la concentration du gel organique

Dans le système organique, la formation de tubes est accélérée par l'augmentation de la concentration du gel. La réplique de deux échantillons de gemini tartrate de concentration 5 et 10 mM est induite trois semaines après solubilisation des échantillons. Après polymérisation de la silice et rinçage, les répliques observées sont respectivement hélicoïdales et tubulaires (Figure III-23). L'effet de l'augmentation de concentration est conservé lors de la réplique, et s'exprime ici par la formation de répliques inorganiques présentant deux morphologies différentes.

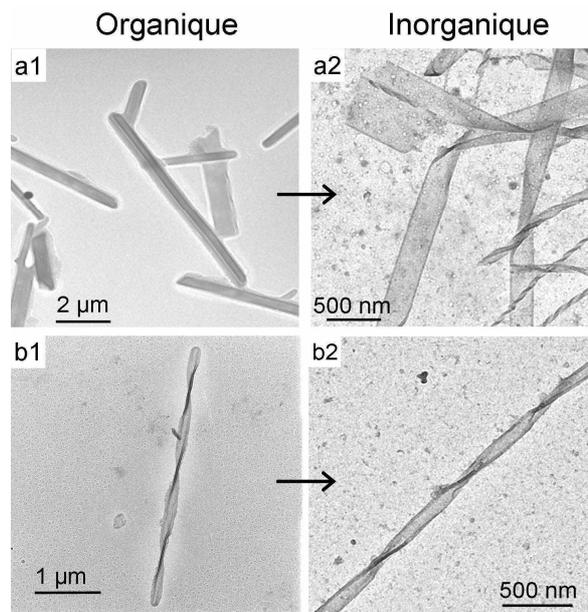


**Figure III-23 : Clichés de MET présentant la diversité des morphologies obtenues à partir d'un échantillon ee 1 en fonction de la concentration.**

Ces résultats peuvent s'expliquer de façon similaire aux résultats obtenus après variation du temps de vieillissement du gel. Si l'augmentation de la concentration du gel induit la formation d'un réseau plus rapidement organisé et stable, la structure résultant de sa transcription devrait être moins perturbée. Dans ce cas, la morphologie tubulaire est conservée au cours de la transcription.

#### **4.2.3 Variation de la stoechiométrie du système et excès énantiomérique**

Nous avons vu précédemment, que la présence d'additifs à un gel de gemini tartrate d'ee 1 perturbe de façon importante les morphologies des auto-assemblages. C'est le cas par exemple de l'addition d'un tensioactif achiral de gemini bromure, ou de l'ajout de l'énantiomère D-tartrate à un gel de L-tartrate d'ee 1 (variation de l'excès énantiomérique). D'une manière générale, ces additifs provoquent un déroulement des tubules. Par exemple, un échantillon organique d'ee 1 en présence de 4,5 % de gemini 16-2-16 Br présente la formation de rubans torsadés. Ces rubans sont également observés dans le cas d'échantillon de gemini 16-2-16 tartrate d'ee 0,33 (Figure III-24(a1) et (b1) respectivement). Après transcription, de chacun de ces échantillons, la conservation des morphologies, relativement au support organique, est observée : des torsades de silice sont obtenues (Figure III-24(a2) et (b2) respectivement).



**Figure III-24 : Clichés de MET présentant la diversité des morphologies obtenues en fonction de la composition de l'échantillon.**

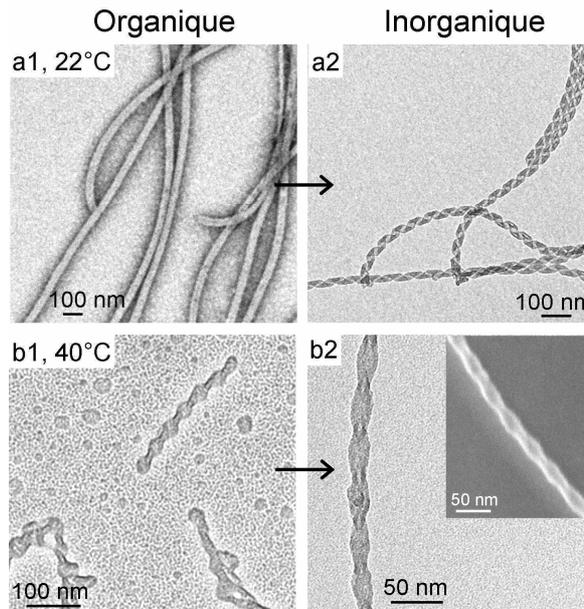
#### 4.2.4 Effet de la température

Nous nous sommes enfin intéressés à l'influence de la température sur les morphologies des répliques. Ce paramètre a été modifié de deux façons : au cours de la formation du gel, et pendant le processus de réplification.

##### *Variation de la température de formation du gel.*

A nouveau, la variation de la température permet de contrôler la morphologie des auto-assemblages. Par exemple, dans le cas d'un gel formé à 22 °C pendant 25 jours, nous avons précédemment décrit la formation de répliques de silice hélicoïdales à partir de structures organiques tubulaires (Figure III-25(a1), (a2)). Le déroulement de ces structures semblent dans ce cas résulter d'un phénomène de compétition entre les contre ions tartrate et les monomères pré hydrolysés de TEOS pour le confinement sur les membranes cationiques de gemini.

Si le gel est désormais formé à une température supérieure, fixée à 40 °C, des rubans torsadés sont formés dans le contexte organique. La réplification d'un tel échantillon a permis d'observer la formation de rubans inorganiques également torsadés (Figure III-25(b1), (b2)).



**Figure III-25 : Clichés de MET présentant la diversité des morphologies obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM), en fonction de la température de formation des gels.**

Ainsi, en jouant sur les paramètres permettant de contrôler les morphologies des rubans organiques, nous avons également pu contrôler l'architecture des objets inorganiques formés.

#### *Variation de la température de transcription.*

Nous avons vu au cours de l'étude d'optimisation des paramètres de réplique, que la polymérisation de la silice à 4 °C permettait l'obtention de répliques présentant une chiralité. Pour un même gel de gemini tartrate vieux de 45 jours, la transcription à 4 et 22 °C produit des répliques de morphologies différentes (Figure III- 26). A 22 °C, des tubes sont observés, alors qu'après réplique à 4 °C, des hélices sont observées. A 4 °C, la polymérisation de la silice est fortement ralentie et provoque le dépliement des tubes. Partant de rubans organiques tubulaires, nous obtenons dans ce cas la formation de rubans inorganiques hélicoïdaux (Figure III- 26(a3)).

Cet exemple illustre le fait que le processus de polymérisation apporte une nouvelle voie de contrôle de la structure des répliques de silice obtenues. En effet, en variant le protocole de transcription, il est possible de contrôler l'architecture des répliques.

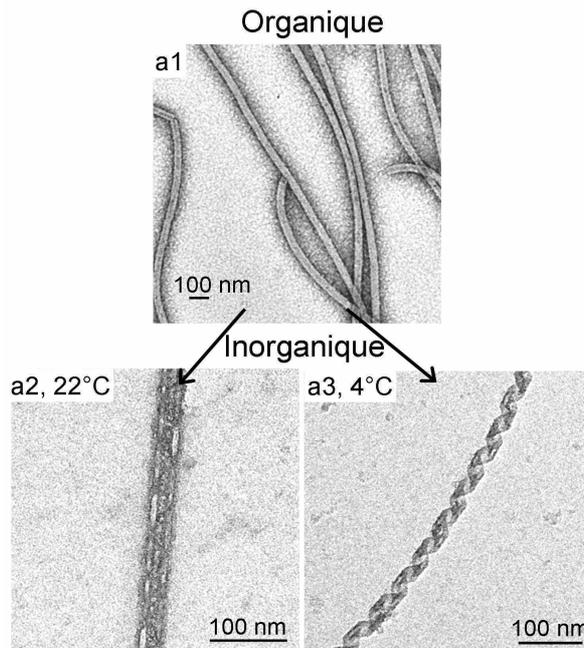


Figure III- 26 : Clichés de MET présentant la diversité des morphologies obtenues à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM), en fonction de la température de réplique.

#### 4.2.5 Dimensions et structure des tubes

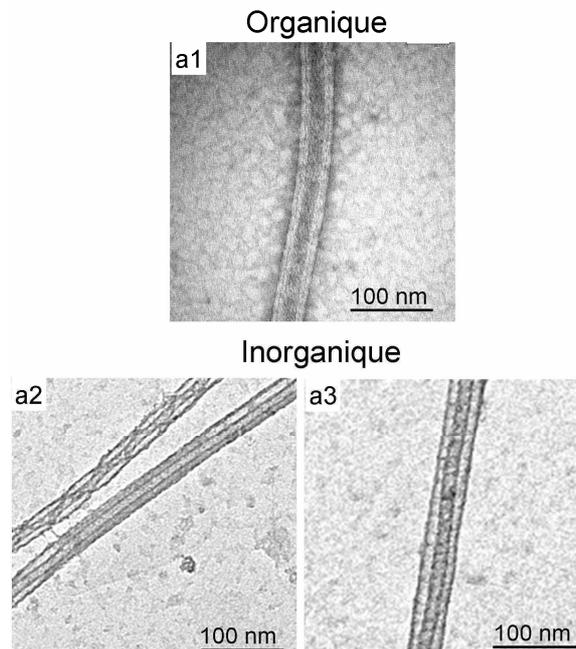
##### *Diamètre extérieur.*

Les tubes organiques de gemini 16-2-16 tartrate d'ee 1 présentent un diamètre de  $35,6 \pm 5,4$  nm. Le diamètre des tubes inorganiques mesuré est de  $33,0 \pm 4,5$  nm. Cette variation peut s'expliquer par la différence de protocole de préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique. En effet, l'observation des gels de gemini tartrate nécessite une étape de métallisation par évaporation de platine. Une fine couche de métal recouvre ainsi les objets. Cette couche est probablement responsable de l'augmentation de diamètre mesurée dans le cas des objets organiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons métallisé les tubes de silice suivant le même protocole. Les mesures effectuées dans ce cas montrent un diamètre de  $35,1 \pm 4,0$  nm, similaire à celui mesuré avec les gemini tartrate. Ceci indique que la couche de silice possède une épaisseur très faible.

Nous noterons également que suite à la calcination des répliques, les tubes de silice présentent un diamètre extérieur de  $30,7 \pm 4,5$  nm. Cette diminution importante peut s'expliquer par un phénomène de contraction de la réplique, caractéristique du traitement par calcination.

*Structure et diamètre intérieur.*

Nous avons précédemment observé que les tubules organiques de 16-2-16 tartrate présentent une cavité intérieure de diamètre 20 nm (Figure III-27(a1)). Après transcription de ces supports, une structure similaire au sein des tubules de silice est obtenue (Figure III-27(a2)). La présence de cette cavité indique que les monomères de TEOS pré hydrolysés pénètrent à l'intérieur du tube, et que condensation et polymérisation ont lieu dans cet environnement confiné. Cependant, ces objets inorganiques présentent un diamètre intérieur de 10 nm, bien inférieur à celui mesuré dans le cas des tubules organiques.



**Figure III-27 : Clichés de MET présentant la structure des nanotubes organiques (a1) et inorganiques (a2) et (a3) observés avant et après polymérisation sol-gel.**

Enfin, l'observation en détail des répliques inorganiques obtenues montrent que certains nanotubes présentent des épaisseurs de parois variables, mais avec un diamètre de cavité intérieure constant (Figure III-27(a3)). Ceci pourrait s'expliquer par l'absence des bicouches lipidiques (éliminées après rinçage à l'éthanol), responsables de l'ossature du tube et de sa cavité.

L'ensemble de ces résultats montre que les gels de gemini tartrate sont d'excellents supports à la réplique inorganique. A partir de la grande diversité de structures des auto-assemblages amphiphiles, et malgré les perturbations liées à la condensation et à la polymérisation de la silice, des répliques inorganiques de morphologies contrôlées sont obtenues. Ainsi, nous avons eu accès à toutes les morphologies observées avec le système organique.

Ce contrôle morphologique a pu être atteint de deux façons différentes. Tout d'abord, des rubans torsadés et hélicoïdaux, ainsi que des tubules inorganiques ont été obtenus en jouant sur les paramètres permettant un tel contrôle au sein des systèmes chiraux organiques (vieillessement et température de formation du gel, ee et pureté de l'échantillon) (Figure III-28). De plus, s'il est possible de jouer sur le matériel organique support pour obtenir une variété architecturale des répliques, une particularité de ce système est la possibilité d'accéder à ce polymorphisme en variant les conditions de réplique, ou en tirant profit du processus de transcription (condensation des monomères de TEOS pré hydrolysés et compétition avec les contre anions tartrate). De cette façon, nous avons augmenté les voies de modulation des morphologies en contrôlant la réplique inorganique.

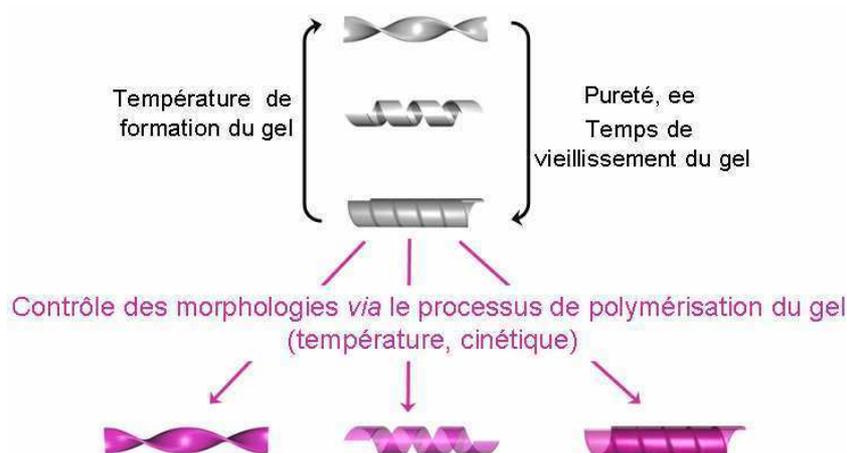


Figure III-28 : Représentation schématique des différentes voies de contrôle des morphologies de rubans chiraux inorganiques.

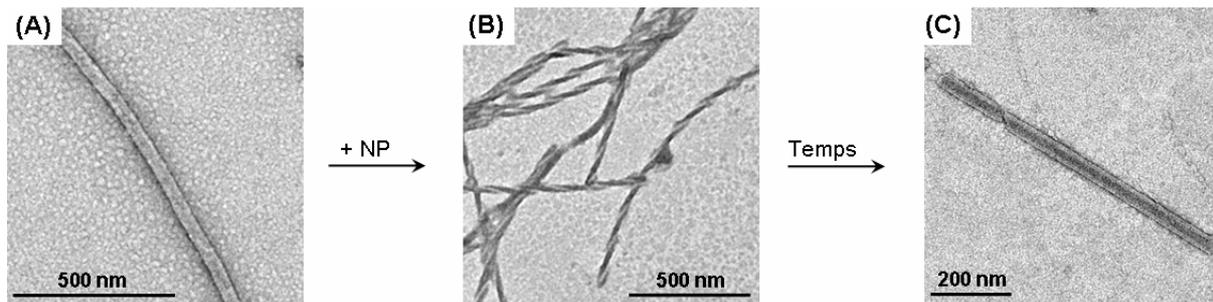
## **5 Conclusion et Perspectives**

A partir de matériel organique et inorganique, nous avons obtenu des objets présentant différentes architectures telles que les torsades, les hélices et les tubes. Ces morphologies sont issues des auto-assemblages dans l'eau de molécules amphiphiles chargées achirales lorsqu'elles sont complexées à un contre anion chiral de tartrate. Le transfert de chiralité s'opère ainsi de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire. Ce phénomène est également exploité dans le domaine de la réplique inorganique pour le développement de nouveaux matériaux.

Ces systèmes organiques et inorganiques sont particulièrement stimulants étant donné la grande diversité de morphologies accessibles ainsi que la subtilité de leur contrôle. Ces deux aspects ouvrent la voie à de nombreuses applications. Particulièrement, la formation de tubes fait de ces systèmes d'intéressants candidats à l'encapsulation et la vectorisation de diverses molécules. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'insertion de nanoparticules (NP) d'or d'un diamètre compris entre 15 et 20 nm. En parallèle, dans le but d'appréhender de façon rationnelle les applications potentielles de telles structures, nous avons débuté un travail de caractérisation mécanique de ces objets. Ces deux projets ont été récemment mis en place au sein de notre équipe, en collaboration avec deux groupes de recherche.

Les premiers essais d'encapsulation de NP d'or ont été réalisés en collaboration avec Fabienne Gauffre-Guirardel et Christophe Mingotaud, chercheurs au sein du Laboratoire Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), à l'université de Toulouse. L'échantillon choisi pour ces études est un gel de gemini L-tartrate (ee 1) présentant des nanotubes de 35 nm de diamètre, capables d'encapsuler du colorant (Figure III-12H). A ce gel est ajoutée une suspension de NP déjà formées, ou les précurseurs de ces NP.

Au cours de ces expériences, il a été observé que l'addition de NP ou des précurseurs perturbe les agrégats de la même façon : la formation de torsades est observée en MET (Figure III-29B). Ceci est surprenant puisque les torsades sont des morphologies de transition vers les tubes (torsade > ruban hélicoïdal > tube). Deux mois après l'addition des NP, l'observation en MET montre un retour aux morphologies tubulaires initiales (Figure III-29C).



**Figure III-29 :** Clichés de MET présentant les morphologies obtenues à partir d'un échantillon de gemini L-tartrate ee 1 (5 mM) (A), 2 jours (B) et 2 mois (C) après addition de nanoparticules d'or (NP).

L'encapsulation des NP n'a pas été observée, ainsi qu'aucune répartition particulière à proximité des auto-assemblages. Cependant, ces résultats montrent que nos systèmes sont particulièrement dynamiques et permettent la formation réversible de structures torsadées et tubulaires. Les propriétés dynamiques et la résistance de ces structures représentent des caractéristiques originales adaptées à des systèmes utilisés pour la vectorisation. Cependant, étant donné les cinétiques lentes des transitions de morphologies, aucune application médicale ne peut être envisagée. Néanmoins, il est aisé de concevoir ainsi le relargage d'une substance encapsulée. Dans le cas de nos systèmes, la réversibilité de formation des tubes permet de plus le recyclage du vecteur.

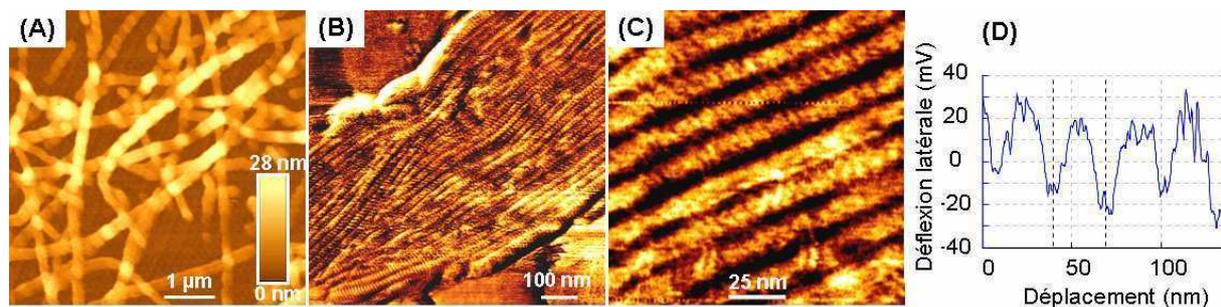
Ces vecteurs auto-assemblés résultant de complexations électrostatiques sont rapidement perturbés lorsqu'il s'agit de l'encapsulation de substances chargées, telles que les NP d'or (chargées négativement). L'encapsulation de substances non chargées reste à tester à ce jour.

En ce qui concerne l'encapsulation de substance chargées, l'utilisation des nanotubes inorganiques présente une alternative intéressante. En effet, ces tubes sont issus de la polymérisation de silice et ne devraient pas être perturbés par une telle addition.

La connaissance des propriétés mécaniques de ces structures est essentielle pour développer l'exploitation de ces objets. Ainsi, en parallèle du développement de leur synthèse, nous avons initié très récemment une collaboration avec Christian Bergaud, chercheur au Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes (LAAS), à Toulouse. Ce projet a pour but de caractériser mécaniquement les nanotubes organiques de gemini tartrate ainsi que les nanotubes inorganiques, par microscopie à force atomique (MFA). L'objectif de ce projet consiste à déterminer et à comparer la résistance et la déformabilité des objets de ces deux systèmes. De telles mesures sont possibles par mesure de la déflexion du levier du MFA, de

constante de ressort connue. Si l'étude mécanique des nanotubes est particulièrement stimulante pour les applications potentielles qui en résultent, nous nous intéresserons également à la caractérisation de chacune des morphologies obtenues avec ces deux systèmes dans un futur proche.

Les études préliminaires ont été réalisées sur les gels organiques de gemini L-tartrate (ee 1). Les premières images de MFA montrent la présence de tubes répartis de façon anarchique sur la lame d'observation (Figure III-30A). Après séchage non contrôlé du solvant, nous avons observé que les tubes s'orientent (Figure III-30B,C).



**Figure III-30 : Clichés de MFA présentant les nanotubes obtenus à partir d'un échantillon ee 1 (5 mM) avant (A) et après (B, C) leur orientation. (D) Mesure de la périodicité de l'organisation des tubes à la surface de la lame d'observation après orientation.**

Les premières mesures réalisées ont permis de déterminer la périodicité du relief de recouvrement de la surface par les nanotubes orientés. Dans notre cas, cette périodicité est de 35 nm (Figure III-30D). Ceci est en accord avec les mesures de diamètre des tubes réalisées par MET. Nos systèmes apparaissent parfaitement adaptés à l'étude par MFA. Cette information est particulièrement importante étant donné qu'il s'agit des tubes organiques auto-assemblés. Ces systèmes montrent une forte cohésion et une résistance aux contraintes mécaniques exercées pour les mesures. Il semble ainsi possible de les manipuler et de procéder à leur caractérisation mécanique.

Les premiers résultats obtenus avec ces deux projets récemment initiés montrent deux caractéristiques différentes des gels organiques de gemini tartrate. Ces objets apparaissent dynamiques et réversibles, mais suffisamment stables d'un point de vue mécanique pour être manipulés. Ces propriétés permettent d'envisager de façon stimulante de plus amples caractérisations en vue de nombreuses applications, pour la vectorisation, l'utilisation de nanocanaux, mais également dans des domaines tels que celui de la microélectronique.

## 6 Partie expérimentale

### 6.1 Synthèse

Les gemini tartrate sont obtenus par échange d'ions dans le méthanol mettant en jeu le tensioactif complexé au contre ion bromure (1 eq. par charge positive) après formation *in situ* du sel d'argent de tartrate dans le méthanol. Le tensioactif de départ complexé au contre ion bromure est synthétisé à partir de bromoalcane (cf. partie expérimentale du chapitre II). Tous les autres réactifs sont obtenus commercialement et utilisés sans purification supplémentaire. Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Metler-Toledo d'une précision de 0,01 mg. Ces pesées sont effectuées dans une pièce climatisée à 22°C. L'eau ultrapure (18,2 M $\Omega$ .cm) est issue d'un système Purelab ultra ELGA.

#### Formation in situ du sel d'argent de tartrate dans le méthanol

Dans un ballon sont introduits 500 mg d'acide tartrique (1 eq.) et 1 équivalent de carbonate d'argent Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 50 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est placé sous agitation et sous vide (évaporateur rotatif) pendant 1 heure à température ambiante pour déplacer l'équilibre de la réaction par élimination du dioxyde de carbone formé. Le gemini bromure est directement additionné sous forme de poudre et solubilisé par chauffage du milieu réactionnel à 40°C. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à 40°C. Le bromure d'argent formé est éliminé par filtration sur Célite. Après évaporation du solvant, le solide est ensuite recristallisé par solubilisation dans un minimum de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (9:1, v/v), typiquement 2 à 3 mL, puis précipité dans l'acétone ou l'acétate d'Ethyle (typiquement 20 à 30mL). Le solide blanc obtenu est filtré et séché sous vide.

**16-2-16 L-tartrate, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 9/1, 25°C,  $\delta$  ppm) :** 4,23 (2H, s), 3,92 (4H, dm), 3,30 (4H, m), 3,10 (12H, d), 1,64 (4H, m), 1,22 (50H, m), 0,81 (6H, t) **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C,  $\delta$  ppm) :** 178,01; 66,10; 51,30; 32,47; 30,70; 30,53; 30,26; 30,20; 30,02; 29,90; 26,75; 23,23; 14,6

### 6.2 Microscopie électronique en transmission

Les gemini tartrate sont solubilisés dans l'eau en chauffant au dessus de la température de Krafft (43°C). La gélification est effective lorsque le système, placé dans un pilulier de diamètre 1cm, ne s'écoule pas lorsque le récipient est renversé. 10  $\mu$ L de l'échantillon sont déposés sur la face carbonée d'une grille cuivre-carbone (400 mesh). L'excès de solvant est éliminé par absorption sur papier filtre qualitatif (Whatman, n°5) en tamponnant délicatement la grille à 90° puis à 180°. Les échantillons sont fixés par évaporation de platine, utilisant une chambre sous vide (Balzers), à un angle de 11° (cf. partie expérimentale du chapitre 5). Les échantillons sont éventuellement colorés à l'acétate d'uranyle avant métallisation. Dans ce cas, une goutte de solution d'acétate d'uranyle (1,5 % massique dans l'eau ultra-pure) est appliquée pendant 30 secondes sur la grille, après le dépôt des échantillons. L'excès de solution est ensuite absorbé sur papier filtre, de la même manière que précédemment. Les observations de MET sont réalisées à l'aide d'un microscope FEI EM120 (120 kV) et les images enregistrées grâce à une caméra 2k  $\times$  2k Gatan ssCCD.

## Références

- 
- <sup>1</sup> Oda, R., Huc, I., Candau, S.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 26
- <sup>2</sup> Oda, R. *Molecular Gels* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands **2005**
- <sup>3</sup> Damien Berthier, Chiralité, Amphiphiles et Polymères. *Thèse de doctorat*, **2002**
- <sup>4</sup> Aurélie Brizard, Confinement de contre ions tartrates et oligo-peptidiques sur des membranes cationiques. *Thèse de doctorat*, **2005**
- <sup>5</sup> Brizard, A., Aime, C., Labrot, T., Huc, I., Berthier, D., Artzner, F., Desbat, B., Oda, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3754
- <sup>6</sup> Oda, R., Huc, I., Schmutz, M., Candau, S.J., MacKintosh, F.C. *Nature* **1999**, *339*, 566
- <sup>7</sup> Shenton, W., Pum, D., Sleytr, U., Mann, S. *Nature* **1997**, *389*, 585
- <sup>8</sup> Davis, S.A., Burkett, S.L., Mendelson, N.H., Mann, S. *Nature* **1997**, *385*, 420
- <sup>9</sup> Kim, S.S., Zhang, W., Pinnavaia, T.J. *Science* **1998**, *282*, 1302
- <sup>10</sup> Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498
- <sup>11</sup> Sonnenburg, K., Adelhelm, P., Antonietti, M., Smarsly, B., Nöske, R., Strauch, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3561
- <sup>12</sup> Esch, J.H. van, Feringa, B.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2263
- <sup>13</sup> Ono, Y., Nakashima, K., Sano, M., Kanekiyo, K., Inoue, K., Hojo, J., Shinkai, S. *Chem. Comm.* **1998**, 1477
- <sup>14</sup> Ono, Y., Kanekiyo, Y., Inoue, K., Hojo, J., Shinkai, S. *Chem. Lett.* **1999**, 23
- <sup>15</sup> Jung, J. H., Ono, Y., Shinkai, S. *Langmuir* **2000**, *16*, 1643
- <sup>16</sup> Jung, J. H., Ono, Y., Shinkai, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1862
- <sup>17</sup> Jung, J.H., Ono, Y., Shinkai, S. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 24
- <sup>18</sup> Jung, J.H., Kobayashi, H., Masuda, M., Shimizu, T., Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8785
- <sup>19</sup> Jung, J. H., Ono, Y., Sakurai, K., Sano, M., Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8648
- <sup>20</sup> Jung, J.H., Shinkai, S., Shimizu, T. *The Chemical Record* **2003**, *3*, 212
- <sup>21</sup> Beck, J.S., Vartuli, J.C., Roth, W.J., Leonowicz, M.E., Kresge, C.T., Schmitt, K.D., Chu, C.T-W, Olson, D.H., Sheppard, E.W., McCullen, S.B., Higgins, J.B., Schlenker, J.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10834
- <sup>22</sup> Adachi, M., Harada, T., Harada, M. *Langmuir* **1999**, *15*, 7097
- <sup>23</sup> Sugiyasu, K., Tamaru, S., Takeuchi, M., Berthier, D., Huc, I., Oda, R., Shinkai, S. *Chem. Comm.* **2002**, 1212
- <sup>24</sup> Q. Ji, Q., R. Iwaura, R., Kogiso, M., Jung, J.H., Yoshida, K., Shimizu, T. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 250

## **Chapitre 4 :**

**Etude bibliographique d'auto-assemblages bio-amphiphiles**

**Exemple des nucléo-amphiphiles**

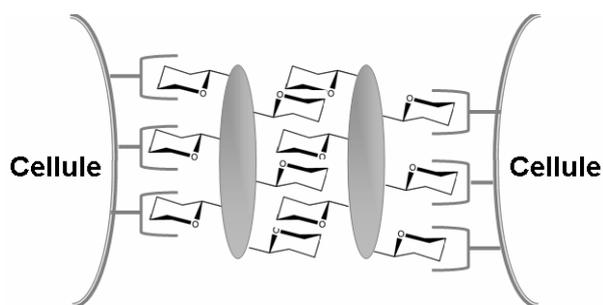


## 1 Introduction

Le monde biologique s'organise autour de l'association non covalente de composants de nature variée capables de reconnaissance. C'est le cas par exemple de l'organisation de complexes protéiques et du recrutement de protéines, des acides nucléiques et de leur réplication, du système immunitaire notamment... Ces interactions spécifiques permettent une communication avec un partenaire de choix et définissent la fonction propre de ces biomolécules. Les sucres, les enzymes et les acides nucléiques sont autant d'exemples développés dans cette introduction, visant à illustrer la relation entre reconnaissance moléculaire et fonction.

### *Les sucres*

De nombreux phénomènes à la surface des membranes naturelles sont initiés par des interactions moléculaires spécifiques. C'est le cas des interactions contrôlant les phénomènes d'adhésion et de communication cellulaire, dans lesquels sont impliqués les sucres<sup>1</sup>. Chez les éponges marines *Microciona Parthena*, la communication cellulaire fait intervenir un facteur d'agrégation coiffé de sucres et procède en deux étapes (Figure IV-1) : la première, indépendante du calcium, assure la spécificité de surface cellulaire et permet la reconnaissance et la fixation du facteur avec les récepteurs cellulaires. La deuxième, calcium dépendante, permet l'interaction entre les facteurs de deux surfaces cellulaires adjacentes.

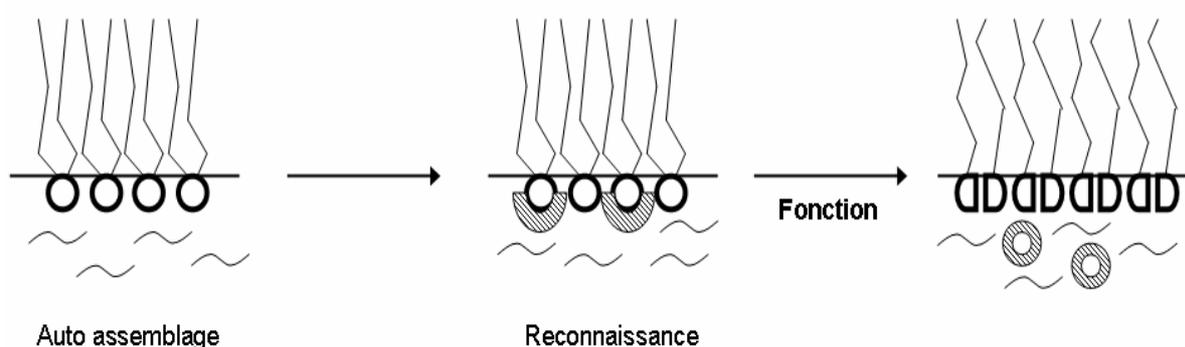


**Figure IV-1 : Schéma représentant le phénomène d'adhésion cellulaire via deux étapes spécifiques mettant en jeu des interactions sucres - récepteurs cellulaires et sucres - sucres. L'ovale grisé représente le facteur d'agrégation coiffé de sucres. Ce schéma est adapté de Rojo, 2002 [1].**

Au sein des systèmes eucaryotes, l'adhésion cellulaire est également assurée par des interactions spécifiques sucre - sucre selon des phénomènes similaires, mettant en jeu des facteurs d'agrégation de nature différente ainsi que des protéines membranaires.

### Les protéines

Un autre exemple de spécificité d'interaction au sein des systèmes biologiques a été étudié par Ahlers et Ringsdorf dans le cas des protéines. Le clivage spécifique d'une monocouche de phospholipides par la phospholipase A<sub>2</sub> illustre la coopération entre auto-organisation et reconnaissance moléculaire dans l'acquisition d'une fonction au sein des systèmes biologiques (Figure IV-2)<sup>2</sup>. Les phospholipases représentent une importante classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester au sein des phospholipides membranaires. La phospholipase A<sub>2</sub> est une molécule relativement petite (de masse molaire 12-14 kDa) soluble dans l'eau. Son activité dépend de l'état physique du substrat et augmente largement avec son organisation en micelles, liposomes ou monocouches.

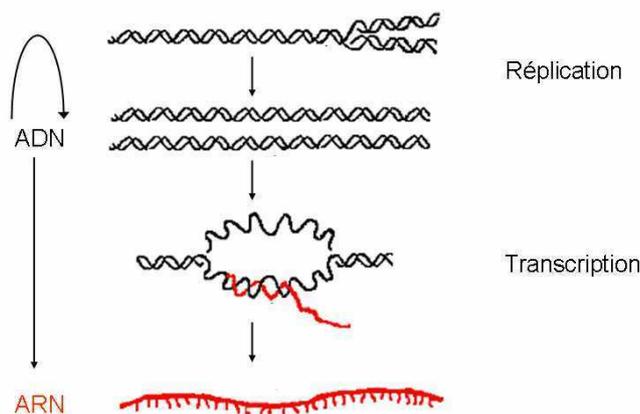


**Figure IV-2 : Schéma représentant l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> (symboles hachurés) au niveau d'une monocouche de phospholipides. Cet exemple illustre la coopérativité des phénomènes d'auto-assemblage et de reconnaissance dans l'acquisition d'une fonction au sein des systèmes biologiques.**

Les enzymes sont un exemple caractéristique des phénomènes de reconnaissance moléculaire. Ce sont des protéines extrêmement sélectives dont la fonction repose sur une interaction hautement spécifique avec un substrat particulier. Elles interagissent avec d'autres protéines, ainsi qu'avec des biomolécules de natures différentes telles que des phospholipides (exemple ci-dessus), des sucres et des acides nucléiques.

### Les acides nucléiques

La troisième classe de biomolécules dont nous parlerons ici est représentée par les nucléotides constitutifs des acides nucléiques naturels. Dans la nature, la conservation et la transmission de l'information génétique est assurée par les acides nucléiques : l'acide désoxyribonucléique (ADN) particulièrement stable et capable de réplication, est le garant de sa conservation. Sa transcription en acide ribonucléique (ARN) permet sa transmission (Figure IV-3). Cet ARN sera enfin traduit pour la synthèse de protéines.



**Figure IV-3 : Schéma représentant la conservation et la transmission de l'information génétique au sein des organismes vivants. La conservation de l'information génétique est assurée par la réplication de l'ADN. Sa transmission résulte de la transcription de l'ADN en ARN.**

Ces mécanismes fondamentaux reposent sur une reconnaissance moléculaire ciblée *via* de multiples liaisons non covalentes spécifiques et non spécifiques entre nucléotides complémentaires, et des structures moléculaires et supramoléculaires appropriées.

Les trois classes de molécules présentées brièvement dans cette introduction interagissent également entre elles de façon spécifique. La réplication et la transcription de l'ADN fait intervenir de nombreuses enzymes telles que l'ADN polymérase (réplication de l'ADN) et l'ARN polymérase (transcription de l'ADN en ARN). Les sucres sont également impliqués dans de nombreux types d'interactions avec des protéines et des acides nucléiques. Les interactions protéines – sucres interviennent notamment dans les phénomènes de formation de tissus, morphogénèse et reconnaissance d'antigènes. La spécificité d'interaction entre sucres et acides nucléiques est quant à elle exploitée dans la conception d'agents anti-tumoraux et antibiotiques. La majorité de ces molécules qui interagissent avec l'ADN sont des composés glycosilés.

De nombreux groupes de recherche se sont intéressés à ces biomolécules dans le but d'exploiter leurs propriétés. Les caractéristiques de reconnaissance moléculaire et d'auto-organisation stimulent de nombreuses applications dans des domaines tels que les bio et nanotechnologies, ainsi que dans le domaine des colloïdes et des auto-assemblages<sup>3,4</sup>. Dans cette étude bibliographique, nous nous limiterons à présenter les nucléotides, leurs caractéristiques propres ainsi que quelques uns des nombreux travaux utilisant des nucléo-amphiphiles dans le but d'exploiter leurs propriétés et de mimer les systèmes biologiques.

## 2 Reconnaissance moléculaire au sein des acides nucléiques

### 2.1 Rappels de nomenclature

Au sein des acides nucléiques naturels, on distingue les bases puriques, guanine (G) et adénine (A), et pyrimidiques, cytosine (C), thymine (T) dans l'ADN, et uracile (U) remplaçant T au sein de l'ARN. Chacune de ces bases possède plusieurs sites accepteurs (A) et donneurs (D) de liaisons hydrogène (Figure IV-4).

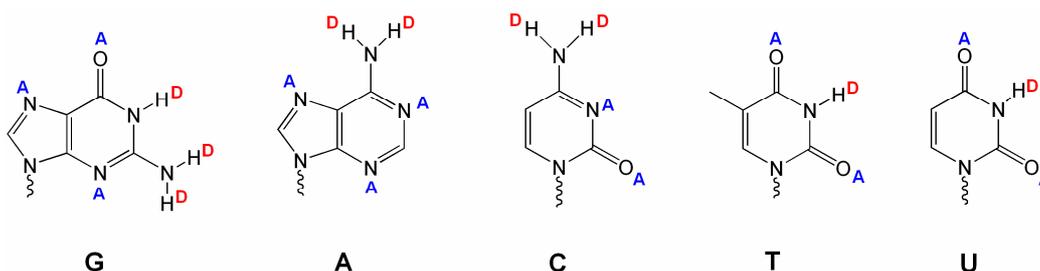


Figure IV-4 : Structures moléculaires des bases nucléiques présentant les positions des sites accepteurs (A) et donneurs (D) de liaisons hydrogène. G : guanine, A : adénine, T : thymine, C : cytosine, U : uracile.

Les nucléosides sont composés d'une base et d'un sucre accroché en position 1' aux positions 9 des bases puriques et 1 des bases pyrimidiques. La présence d'un groupement phosphate en 3' ou 5' du sucre aboutit à la formation d'un nucléotide (Figure IV-5, Tableau IV-1).

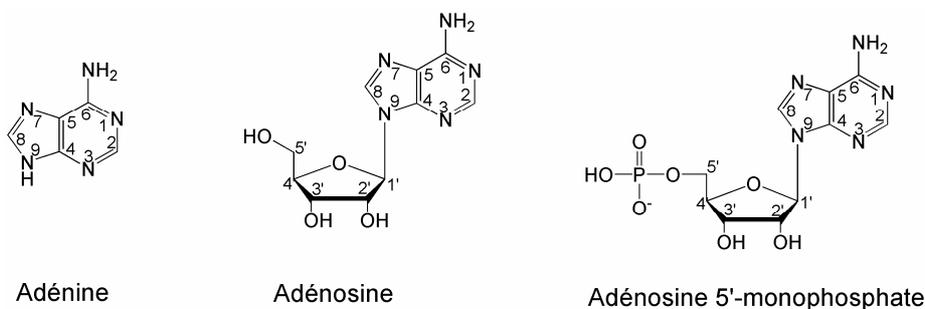


Figure IV-5 : Structure moléculaire d'une base (exemple de l'adénine), d'un nucléoside (exemple de l'adénosine) et d'un nucléotide (exemple de l'adénosine 5'-monophosphate).

Base	Nucléoside	Nucléotide
Adénine	Adénosine	Adénosine 5'-monophosphate (AMP)
Cytosine	Cytidine	Cytidine 5'-monophosphate (CMP)
Guanine	Guanosine	Guanosine 5'-monophosphate (GMP)
Thymine	Thymidine	Thymidine 5'-monophosphate (TMP)
Uracile	Uridine	Uridine 5'-monophosphate (UMP)

Tableau IV-1 : Nomenclature des bases, nucléosides et nucléotides des acides nucléiques naturels.

Au sein des acides nucléiques naturels, ces bases sont capables d'appariement spécifique *via* des liaisons hydrogène de type Watson Crick (WC), du nom des découvreurs de la structure en double hélice de l'ADN en 1953. Cet appariement se fait selon la règle suivante : C-G et A-T dans l'ADN qui devient A-U au sein de l'ARN.

## 2.2 Propriétés physiques des nucléotides

### 2.2.1 Moments dipolaires.

Les interactions moléculaires des bases nucléiques sont déterminées par leur structure électronique. La polarité de ces molécules indiquées dans le tableau IV-2 résulte de la présence et de la distribution des sites accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène<sup>5</sup>.

Bases	$\mu$ (Debye)
Adénine	2,56
Cytosine	6,39
Guanine	6,55
Thymine	4,31
Uracile	4,37

Tableau IV-2 : Moments dipolaires des bases nucléiques. Ces valeurs sont issues de Sponer, 2002 [5].

Guanine et cytosine sont les bases les plus polaires, susceptibles d'interagir fortement par liaisons hydrogène. En revanche, l'adénine est une base très apolaire impliquée dans des liaisons H plus faibles.

### 2.2.2 pKa.

Les pKa des nucléosides et nucléotides varient de 3,5 à 10,5, avec une augmentation de 0,5 unité environ du nucléoside au nucléotide (Tableau IV-3). En ce qui concerne les nucléotides, le groupe phosphate monoester possède 2 valeurs de pKa : le premier aux alentours de pH 1-2, le deuxième, aux alentours de 7 (Tableau IV-4)<sup>6</sup>. Ainsi, en fonction du pH, les nucléosides et nucléotides en solution se trouvent sous de multiples formes de protonation de la base, du groupement phosphate ainsi que du sucre, comme illustré Figure IV-6 avec l'exemple de l'AMP.

Composé	Nucléoside	5'-Phosphate
Adénosine	3,52	3,88
Cytidine	4,17	4,54
Guanosine	9,42	10,00
Uridine	9,38	10,06
Desoxythymidine	9,93	10,47

Tableau IV-3 : pKa des nucléosides et nucléotides. Ces valeurs sont issues de Saenger, 1984 [6].

Composé	Phosphate
Adénosine	6,67
Cytidine	6,62
Guanosine	6,66
Uridine	6,63

Tableau IV-4 : pKa du groupement phosphate des nucléotides. La première ionisation a lieu à pH 1-2 [6].

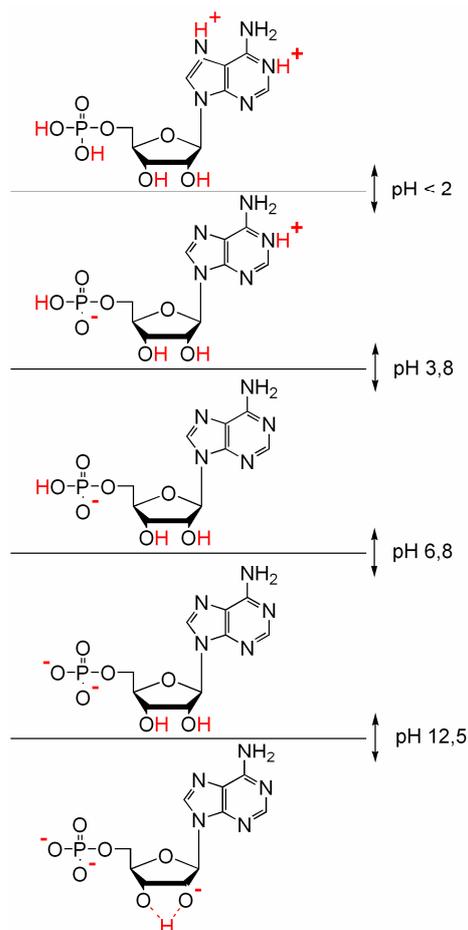


Figure IV-6 : Sites de protonation de l'AMP. La première ionisation du groupement phosphate est complète aux alentours de pH 2. Au delà de pH 3,8, l'adénine devient neutre. A pH 6,8, la seconde ionisation du groupement phosphate se fait, ainsi que celle du sucre à pH 12,5.

Il est possible d'évaluer la force d'une liaison hydrogène en utilisant les valeurs de pKa. En effet, si les deux atomes (A et B) impliqués dans la liaison ont des pKa très différents, l'équilibre  $A-H \cdots B \leftrightarrow A \cdots H-B$  est défavorisé en faveur de la liaison A-H ou H-B suivant les pKa. En revanche, pour des atomes ayant des pKa proches, le proton est plus équitablement partagé entre A et B, ce qui stabilise la liaison hydrogène<sup>7</sup>.

Si l'on calcule les différences de pKa,  $\Delta pKa$ , des liaisons hydrogène de type WC entre les nucléosides G-C et A-T ou A-U et nucléotides correspondants, on trouve des valeurs plus faibles dans le cas de G-C (5,25 et 5,46) que pour A-T (6,41 et 6,59) et A-U (5,86 et 6,18). Ainsi, en ne considérant que les pKa, la liaison hydrogène G-C est plus forte que les liaisons A-T et A-U.

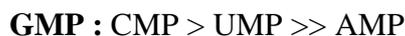
### 2.2.3 Interactions entre bases nucléiques

La stabilité thermodynamique de la structure en double hélice de l'ADN est assurée par des liaisons hydrogène spécifiques entre les bases, des interactions d'empilement entre cycles aromatiques ainsi que par des effets stériques favorables<sup>8</sup>. En effet, la complémentarité de taille des bases au sein d'une paire (association d'une base purique et d'une base pyrimidique pour chaque paire) permet de renforcer l'interaction spécifique entre les bases<sup>9</sup>. La formation de multiples liaisons hydrogène permet l'appariement de bases nucléiques et la formation de l'assemblage tridimensionnel, stabilisé principalement par les interactions d'empilement. Ces interactions sont principalement orientées dans le plan des nucléobases (liaisons hydrogène) mais également perpendiculaire à ce plan (interactions d'empilement). Les liaisons H sont particulièrement prononcées dans les solvants apolaires, lorsque les interactions d'empilement sont négligeables. Ces interactions dominent en milieu aqueux, alors que les liaisons H entre bases sont fortement diminuées du fait d'une forte compétition des sites de liaisons avec les molécules d'eau.

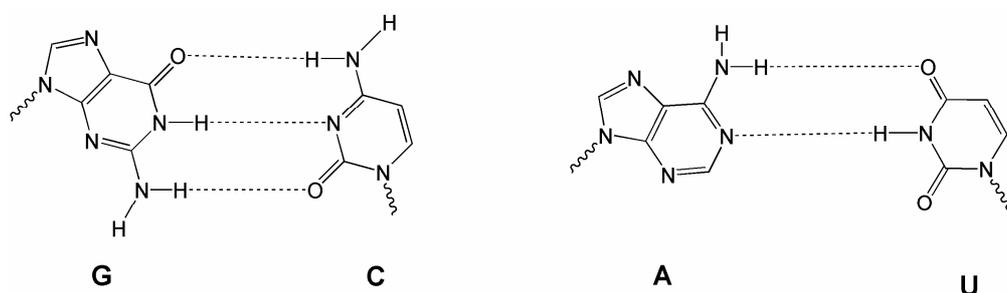
#### *Liaisons hydrogène*

Les liaisons hydrogène ont un caractère essentiellement électrostatique (80 % de l'énergie totale) auquel s'ajoutent les contributions de dispersion de London (interactions dipôle induit - dipôle induit dues aux fluctuations d'électrons) et la polarisabilité des bases. En milieu aqueux, les interactions hydrogène sont faibles du fait de la compétition avec les molécules d'eau. La force d'interaction H entre les nucléotides résulte d'un équilibre entre

leurs différentes propriétés physio-chimiques. La tendance d'association des nucléotides (formation de paires) suit l'ordre décroissant suivant [6] :



En considérant l'appariement WC, la paire G-C (avec une énergie d'interaction de -26,3 kcal/mol) est presque deux fois plus stable que la paire A-T (-14,3 kcal/mol) [5]. Ceci s'explique par le nombre de liaisons H entre les nucléotides mis en jeu (3 pour G-C contre 2 pour A-T) (Figure IV-7) et la polarité importante de G et C par rapport à A et T (Tableau IV-2).



**Figure IV-7 : Formation de liaisons hydrogène entre bases nucléiques complémentaires (G-C et A-U) selon les règles d'appariement de type Watson Crick.**

Etant donné la multiplicité des sites accepteurs et donneurs, les interactions hydrogène entre nucléobases ne se limitent pas aux interactions de type WC responsables de la reconnaissance moléculaire. 28 configurations de liaisons H sont observées, purine - purine, pyrimidine - pyrimidine et purine - pyrimidine (WC, WC inverse, Hoogsteen et Hoogsteen inverse notamment)

#### *Interactions d'empilement entre les cycles aromatiques*

Les interactions d'empilement au sein des polynucléotides permettent la formation et la stabilisation d'hélices simple brin en l'absence d'appariement de bases. Ces interactions sont possibles grâce à une géométrie des cycles aromatiques « face-à-face ». L'interaction d'empilement entre bases est déterminée principalement par trois contributions : les dispersions de London, la répulsion à courte distance et les interactions électrostatiques. Les purines bi cycliques interagissent plus fortement que les pyrimidines (purine - purine > pyrimidine - purine > pyrimidine - pyrimidine), suivant la tendance: A > G > T ~ C<sup>10</sup>.

## 2.2.4 Cas particulier de la guanosine

La guanosine et ses dérivés sont réputés dans les laboratoires pour leur manipulation difficile du fait d'une très faible solubilité en milieu aqueux. Malgré sa capacité à intervenir dans les liaisons H et son fort moment dipolaire, la guanosine s'auto-assemble dans l'eau de façon incomparable à tout autre nucléoside<sup>11</sup>. Ceci s'explique par la géométrie de répartition des sites donneurs et accepteurs de liaisons H ainsi que par la polarisabilité de ses surfaces aromatiques, qui, couplée à un fort moment dipolaire, est idéale pour les interactions d'empilement<sup>12</sup>. Cette propriété est largement exploitée dans le domaine des architectures supramoléculaires<sup>13</sup>, parmi lesquelles on peut citer la formation de nanotubes de guanosine 5'-monophosphate à partir de quadruplets (Figure IV-8).

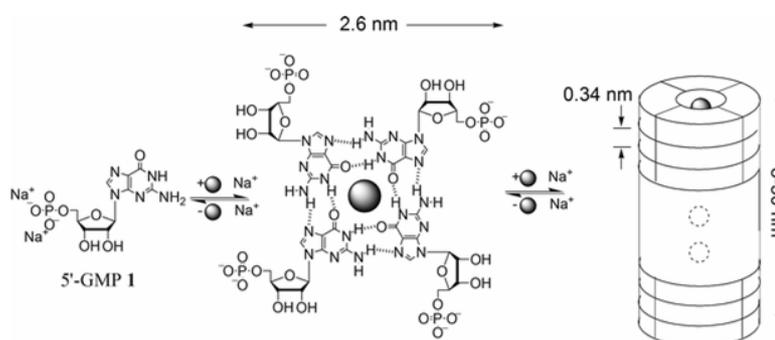
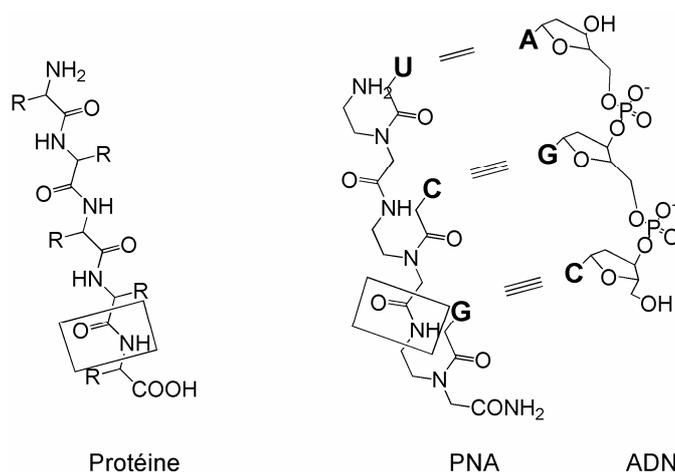


Figure IV-8 : Formation de nanotubes de guanosine 5'-monophosphate à partir de quadruplets. Ce schéma est issu de Davis, 2007 [13].

## 2.2.5 Synthèse d'analogues

Les caractéristiques des acides nucléiques, notamment de reconnaissance moléculaire, sont à l'origine de nombreux travaux qui visent à mimer et optimiser leurs propriétés. De multiples composés ont ainsi été synthétisés, portant des modifications sur le groupement phosphate, le sucre ou la base. Parmi les dérivés synthétisés jusqu'ici, les PNA (Protein Nucleic Acid) se sont révélés être les plus intéressants. Décrits en 1991 par Nielsen<sup>14</sup>, ces dérivés sont constitués d'un squelette peptidique qui remplace la structure sucre-phosphate au sein des acides nucléiques (Figure IV-9). A l'exception des bases nucléiques, les PNA n'ont aucun groupe fonctionnel commun aux acides nucléiques.



**Figure IV-9 : Structures moléculaires d'une protéine, d'un PNA (Protein Nucleic Acid) et de l'ADN, présentant le squelette peptidique commun aux protéines et PNA, et les bases nucléiques communes aux PNA et à l'ADN (sur ce schéma, A, U, C et G). Ce schéma est adapté de Nielsen, 1991 [14].**

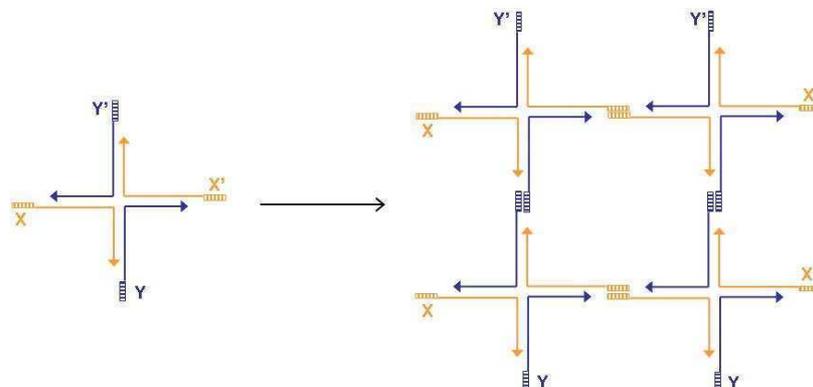
Ces molécules présentent une stabilité chimique excellente notamment en milieu acide (seul le groupement amine terminal présente une instabilité). Ce sont des composés achiraux, neutres qui s'agrègent facilement et sont peu solubles dans l'eau. Leur principale caractéristique est leur très grande affinité pour les brins complémentaires d'ADN et particulièrement d'ARN<sup>15,16</sup>. En effet, les hétéro complexes formés (PNA-ADN et PNA-ARN) sont plus stables que les homo complexes correspondants (ADN-ADN et ARN-ARN). De ce fait, ils ouvrent la voie à de nombreuses applications, notamment dans le domaine thérapeutique (inhibition et régulation des phénomènes de réplication et de transcription de l'ADN), et dans les biotechnologies (inhibition d'enzyme de restriction coupant l'ADN à des sites spécifiques notamment).

### 3 Conception d'auto-assemblages

#### 3.1 A partir de nucléotides

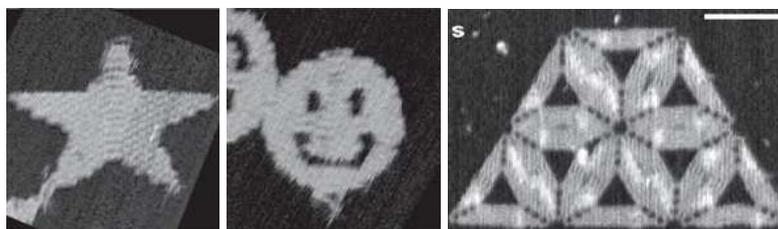
L'organisation des acides nucléiques naturels *via* de multiples interactions faibles spécifiques ou non spécifiques fait de ces biomolécules d'excellents candidats dans le contexte des auto-assemblages supramoléculaires. Au début des années 1980, Nadrian Seeman a initié une stratégie pour l'élaboration de structures auto assemblées à partir d'acides nucléiques reposant sur des bases biochimiques : auto-organisation, complémentarité WC,

propriétés de recombinaisons et transitions topologiques de l'ADN<sup>17</sup>. La figure IV-10 illustre le principe de conception de réseaux à partir de simples brins d'ADN complémentaires permettant un contrôle précis de leur alignement. Ces brins portent des extrémités cohésives permettant de programmer la séquence d'assemblage des différents brins<sup>18</sup>.



**Figure IV-10 : Stratégie de programmation d'architectures supramoléculaires à partir de simples brins d'ADN complémentaires possédant des extrémités cohésives (parties hachurées) : X est complémentaire à X' et Y à Y'. Cette figure est inspirée de Seeman, 2005 [18].**

De nombreux groupes se sont depuis intéressés à ce domaine, permettant l'élaboration de structures diverses<sup>19,20,21,22</sup>. Des structures de plus en plus sophistiquées ont ainsi été obtenues, définies par une résolution spatiale allant jusqu'à 6 nm (Figure IV-11)<sup>23</sup>.



**Figure IV-11 : Architectures tridimensionnelles obtenues à partir de brins complémentaires d'acides nucléiques, et stabilisées par des « agrafes » moléculaires (crossing-over). Ces photographies sont issues de Rothmund, 2006 [23].**

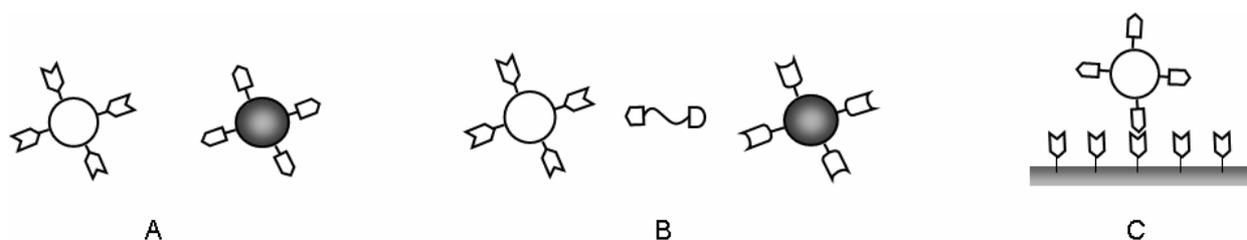
La conception de structures à deux et trois dimensions repose sur l'utilisation de briques élémentaires par appariement WC, stabilisées par des motifs plus rigides, tels que les quadruplexes de guanine, pour forcer un repliement adéquat. Ces systèmes ont été développés jusqu'à l'exploitation comme nano moteurs moléculaires. Plusieurs types de dispositifs ont été développés à ce jour reposant sur la réversibilité de l'appariement entre bases nucléiques. En 2000, Yurke a notamment élaboré une pince constituées de brins d'ADN, dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées par l'addition de brins complémentaires<sup>24</sup>. L'addition d'un brin possédant une séquence complémentaire aux extrémités de la pince permet sa fermeture. Si un brin d'affinité plus importante est ajouté, la pince est à nouveau ouverte.

Plus récemment, Seeman a élaboré un dispositif permettant le mouvement d'un brin d'ADN synthétique relativement à un support extérieur<sup>25</sup>. Ce support est constitué de séquences d'ADN complémentaires au brin d'intérêt. L'hybridation de ces deux séquences permet la fixation du brin d'intérêt au support. Son retrait est permis par ajout d'une séquence de plus forte affinité. La conception de séquences d'affinités différentielles permet ainsi le déplacement du brin d'intérêt.

Ces travaux illustrent les possibilités d'exploitation des propriétés de reconnaissance moléculaire des acides nucléiques. Ces propriétés sont utilisées à travers l'addition successive de brins d'affinité croissante qui permet des changements de conformation convertis en travail moléculaire et mouvements.

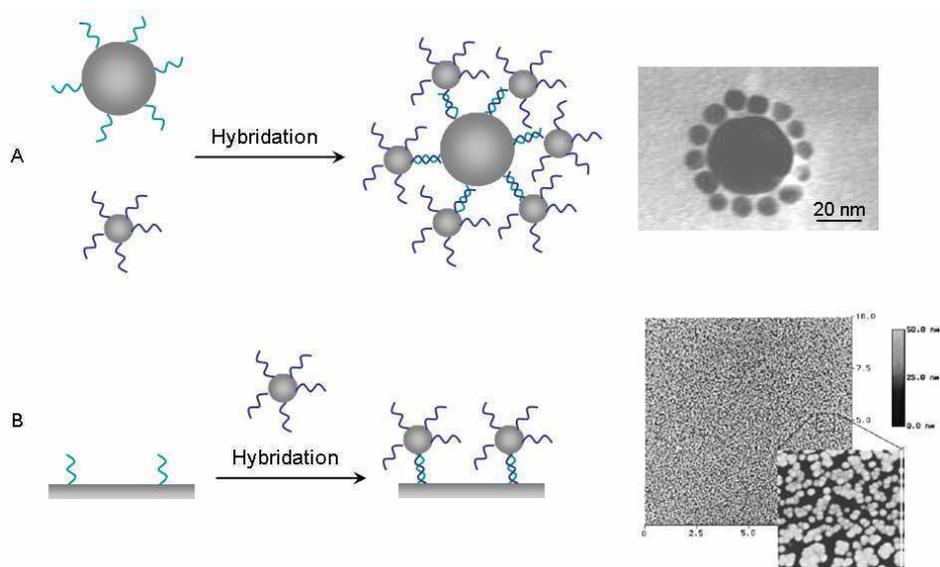
### 3.2 Fonctionnalisation

Ces molécules biologiques capables d'auto-organisation et de reconnaissance spécifique sont des objets particulièrement attractifs pour la fonctionnalisation de matériel inorganique ou organique<sup>26</sup>. Ainsi, elles sont notamment exploitées dans le but d'initier une interaction spécifique entre deux objets, soit directement (Figure IV-12A) soit indirectement (Figure IV-12B), ou entre un objet et une surface (Figure IV-12C).



**Figure IV-12 : Stratégie de fonctionnalisation induisant des interactions spécifiques entre deux objets de façon directe (A) ou indirecte (B) et entre un objet et une surface (C). Ces objets et surface sont coiffés de modules capables de reconnaissance spécifique.**

Dans le domaine des matériaux inorganiques, les acides nucléiques ont été développés pour la fonctionnalisation de nanoparticules telles que les nanoparticules d'or. L'insertion d'une base modifiée au cours de la synthèse d'un acide nucléique (par exemple la thymine T- $(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$ <sup>27</sup>) assure l'introduction de sites de liaison de nanoparticules d'or. La synthèse de brins possédant des séquences complémentaires permet la programmation d'auto-assemblages inorganiques spécifiques, en suspension<sup>28,29</sup> ou sur une surface<sup>30</sup> (Figure IV-13).



**Figure IV-13 : Fonctionnalisation de nanoparticules d'or utilisant des acides nucléiques possédant des séquences complémentaires (brins bleu et vert). Formation d'architectures supramoléculaires en suspension (A) et immobilisation de nanoparticules d'or sur une surface (B). Ces photographies sont issues de Storhoff, 1999 [28] et Peschel, 2002 [30].**

### 3.3 A partir de nucléo-amphiphiles

La membrane est un objet modèle illustrant la coopérativité des phénomènes d'auto-organisation et de reconnaissance moléculaire. De nombreux groupes de recherche, parmi lesquels ceux de Ringsdorf<sup>31</sup> et Kunitake<sup>32</sup> ont développé des systèmes amphiphiles membranaires dans le but de mimer cette structure et exploiter ces caractéristiques.

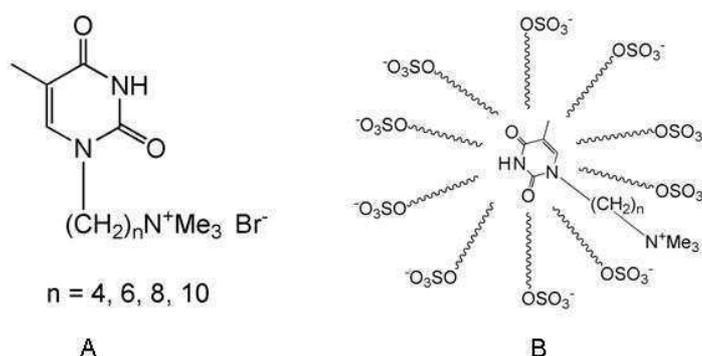
L'association de nucléotides et de molécules amphiphiles dérivées de lipides membranaires est particulièrement stimulante dans le but de concevoir des auto-assemblages originaux définis. Au sein de ces systèmes hybrides, chacune des parties est capable d'auto-organisation contrôlée par différents paramètres moléculaires. L'addition d'une partie nucléotidique apporte une possibilité de programmation ciblée par reconnaissance spécifique. Les nucléo-amphiphiles offrent la possibilité de mimer ces systèmes biologiques à la fois d'un point de vue des propriétés de reconnaissance et d'un point de vue morphologique<sup>33,34</sup>.

#### 3.3.1 Reconnaissance moléculaire

Dans la nature, l'eau apporte une contribution importante à la structuration des acides nucléiques. Sa forte constante diélectrique diminue la répulsion électrostatique entre

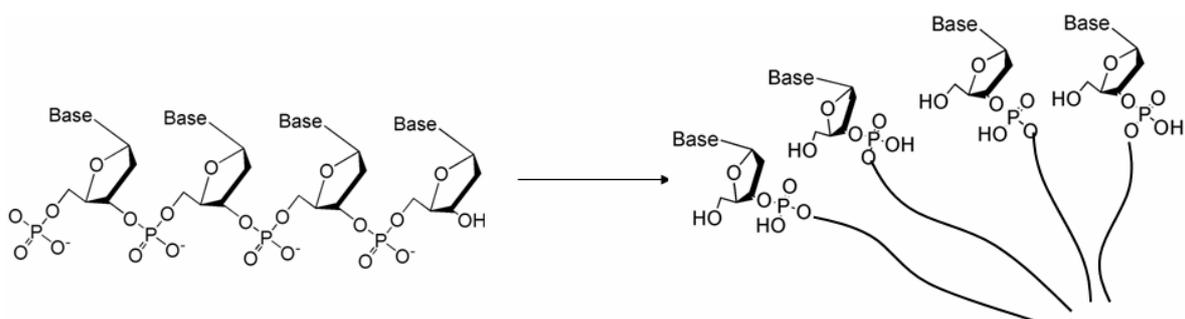
groupements phosphate et les interactions hydrophobes et d'empilement permettent la stabilisation des structures tridimensionnelles. En milieu aqueux, les acides nucléiques sont ainsi capables d'appariement spécifique entre bases par liaisons hydrogène. Cependant, les molécules d'eau entrent en compétition avec les sites donneurs et accepteurs de liaison hydrogène, et l'appariement spécifique n'est plus observé lorsqu'il s'agit non plus de polynucléotides mais de mononucléotides. Pour pallier à ce problème, deux approches peuvent être envisagées.

La première consiste à créer un environnement hydrophobe confiné. C'est la stratégie utilisée par Nowick au début des années 1990. Nowick a présenté les premiers exemples d'appariement de bases (A et T) par liaisons hydrogène en environnement micellaire<sup>35,36,37</sup>. L'incorporation de nucleoamphiphiles au sein de micelles de dodécyle sulfate de sodium permet d'assurer un environnement propice aux liaisons H (le coeur apolaire de la micelle) par l'affranchissement de la compétition avec les molécules d'eau (Figure IV-14).



**Figure IV-14 : (A) Exemple de structures moléculaires des nucléo-amphiphiles développées par Nowick. (B) Schéma d'une micelle de dodécyle sulfate de sodium offrant un environnement hydrophobe propice à la formation de liaisons hydrogène spécifiques. Ce schéma est inspiré de Nowick, 1994 [37].**

La deuxième approche consiste à utiliser la coopérativité d'auto-assemblage de molécules amphiphiles (effet hydrophobe) pour permettre le confinement des nucléotides à la surface de l'eau (monocouches, micelles, vésicules) et ainsi renforcer les interactions intermoléculaires. Cette stratégie a pour objectif de mimer de façon coopérative l'environnement des nucléotides au sein du polymère par des interactions non covalentes (Figure IV-15).

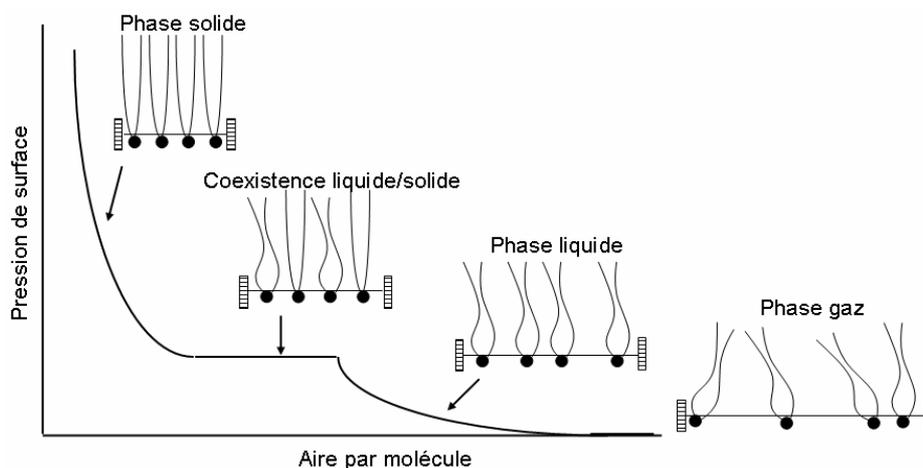


**Figure IV-15 : Schéma illustrant la stratégie de confinement de nucléotides à la surface d'auto-assemblages de molécules amphiphiles dans le but de restaurer la coopérativité des interactions inter nucléotides des acides nucléiques naturels.**

De nombreux groupes ont développé cette stratégie pour induire des interactions spécifiques, à la fois à l'interface air-eau et en solution.

#### *A l'interface air-eau*

C'est dans le but de favoriser ces interactions spécifiques, que Ringsdorf a introduit et développé l'étude de nucléo-amphiphiles à l'interface air-eau<sup>38,39</sup>. Dans ce contexte, les nucléolipides s'organisent spontanément en monocouche. La technique du film de Langmuir permet l'étude des interactions intermoléculaires entre ces molécules au cours de la diminution progressive de l'aire par molécule (Figure IV-16).

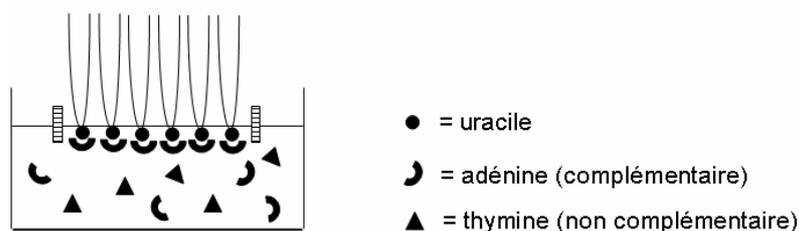


**Figure IV-16 : Technique du film de Langmuir. Les interactions entre nucléolipides au sein de la monocouche sont mesurées au cours de la compression du film (diminution de l'aire par molécule). La mesure des isothermes pression de surface ( $\pi$ )–aire par molécule ( $A$ ) est indispensable pour confirmer la formation d'une monocouche à l'interface air-eau.**

Cette technique est particulièrement adaptée à cette étude puisqu'elle permet de contrôler la densité de molécules déposées et de fixer leur orientation, tout en laissant les nucléolipides diffuser librement au sein de la monocouche. Ceci permet d'optimiser la

configuration des nucléotides, tant d'un point de vue de leur rotation que d'un point de vue de leur translation en vue de favoriser les interactions avec les molécules lipidiques voisines, ainsi qu'avec les molécules présentes en sous-phase. Après obtention d'une monocouche nucléolipidique, les interactions entre têtes polaires nucléotidiques et bases nucléiques libres ajoutées en sous-phase sont observées sous forme de variations des isothermes mesurés.

Les nucléo-amphiphiles utilisés par Ringsdorf possèdent une ou deux chaînes aliphatiques. Leur tête polaire est constituée de nucléobase ou nucléoside lié de façon covalente. La spécificité d'interaction est testée en présence de bases complémentaires et non complémentaires, mono- ou polymériques en sous-phase (Figure IV-17).

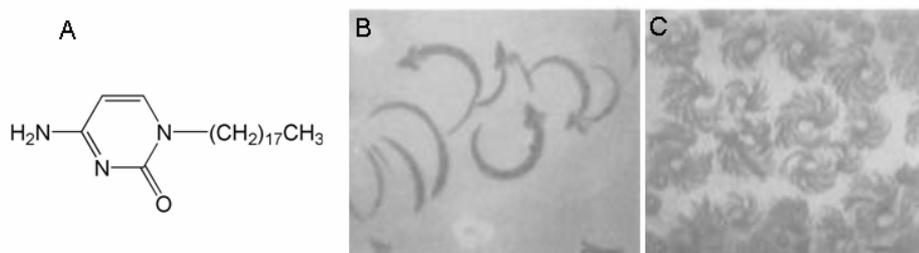


**Figure IV-17 : La monocouche de nucléolipides est formée à l'interface air-eau, la sous-phase contenant des nucléosides complémentaires et non complémentaires.**

Après formation d'une monocouche de nucléolipides portant une base uracile, l'addition de nucléosides en sous-phase provoque une augmentation de l'aire par molécule. Ce phénomène se révèle être plus marqué dans le cas d'un nucléoside complémentaire (A) que non complémentaire (T). Cette observation est accentuée en présence de polynucléotides non complémentaires (poly-U) et complémentaires (poly-A). Dans ce dernier cas, une large expansion de l'isotherme pression de surface ( $\pi$ )–aire par molécule (A) est observée. Selon l'interprétation de Ringsdorf, cette expansion résulte de la diminution des interactions d'empilement entre les bases des nucléolipides, du fait de leur implication dans des liaisons hydrogène avec les bases libres de la sous-phase.

Suite aux travaux de Ahlers et Ringsdorf, les études à l'interface air-eau se sont multipliées, notamment au sein de groupes de Shimomura, Kunitake<sup>40</sup>, Paleos<sup>41</sup> et Baglioni<sup>42</sup>.

En 1997, Shimomura reporta pour la première fois la visualisation directe de transition de phase d'une monocouche de nucléolipides induite par l'appariement de bases nucléiques (G-C)<sup>43</sup>. Cette transition est observée par microscopie de fluorescence, dans le cas d'une monocouche de nucléolipides portant une cytidine, en présence de bases nucléiques complémentaires (G) en sous-phase (Figure IV-18).



**Figure IV-18 : (A) Structure moléculaire du nucléolipide utilisé par Shimomura. (B, C) Observation d'une transition de phase induite par l'addition de bases complémentaires en sous-phase d'une monocouche de nucléolipides. Ces clichés de microscopie de fluorescence sont issus de Shimomura, 1997 [43].**

Dans cet exemple, la spécificité d'interaction est soulignée par la faible transition observée en présence de bases non complémentaires. Cette transition n'a en effet été observée qu'en présence de guanosine et désoxyguanosine.

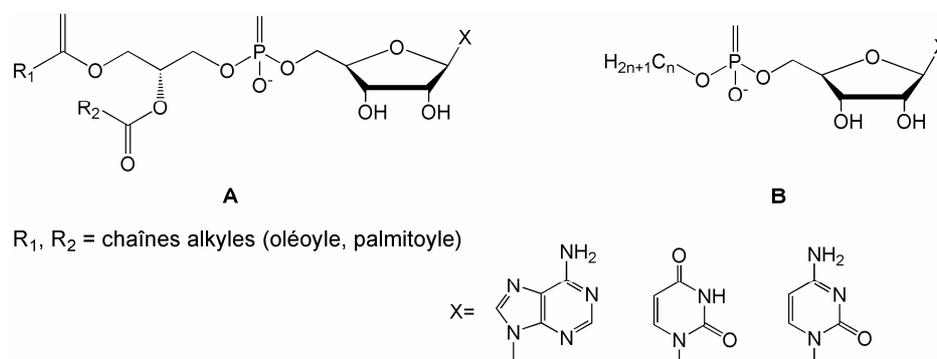
Une approche différente consiste à induire la formation de monocouches mixtes, composées de nucléolipides possédant des têtes nucléiques différentes. Dans le système précédent, C est remplacé par A ou par T. Dans ce contexte, il apparaît également que des interactions spécifiques entre les lipides A et T sont à l'origine d'une condensation importante de la monocouche, qui n'est observée ni en présence des lipides C et A, ni des lipides C et T<sup>44,45</sup>. Une étude supplémentaire en spectroscopie infra rouge indique la nature de liaisons H de ces interactions.

#### *En solution*

Kunitake a étudié les phénomènes de reconnaissance moléculaire en milieu aqueux, à la surface de micelles et vésicules<sup>46</sup>. La comparaison avec ses travaux à l'interface air-eau<sup>47</sup> montre l'importance des propriétés dynamiques et d'interface des vésicules ou micelles dans les contributions d'interactions électrostatiques et de liaisons H notamment. Les surfaces de ces agrégats offrent un environnement propice à ces interactions et à la reconnaissance. Cependant, il résulte de ses travaux que la monocouche fournit l'environnement le plus favorable à ce type de reconnaissance moléculaire.

Les groupes de Baglioni et Luisi ont apporté une large contribution à ce domaine. Ils ont étudiés des nucléolipides de structures moléculaires proches, à l'interface air-eau et en milieu aqueux. Dans ces systèmes, le nucléotide est lié de façon covalente à un phospholipide dont la charge négative (portée par le groupe phosphate) reproduit la charge de l'unité répétée au sein des acides nucléiques naturels. La nature de la base nucléique est variée (adénine,

uracile, cytosine) ainsi que les nombre, longueur et insaturation des chaînes hydrophobes. Ces travaux se concentrent sur la comparaison des systèmes portant les nucléosides A-U et A-C (Figure IV-19).



**Figure IV-19 : Structures moléculaires des nucléo-amphiphiles utilisés par les groupes de Baglioni (A) et Luisi (B). Dans chaque cas, X représente la base nucléique (A, U, C).**

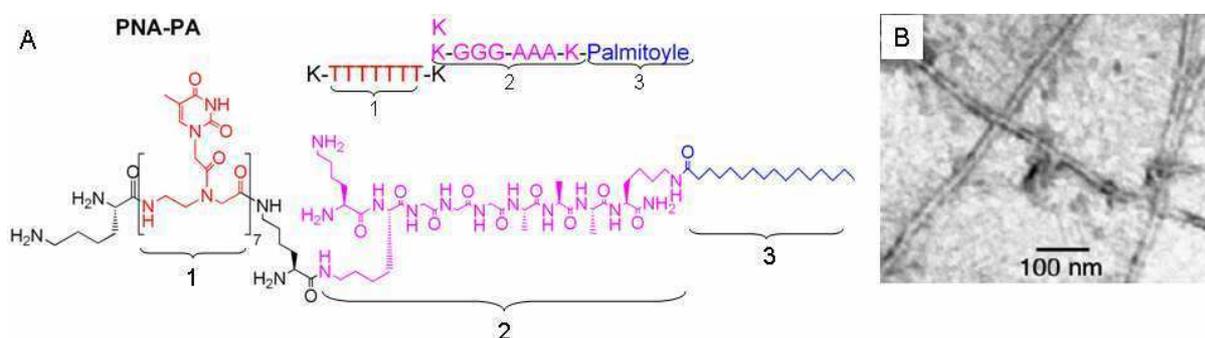
A l'interface air-eau, ces deux groupes ont mis en évidence la présence d'interactions attractives au sein d'une monocouche composée d'amphiphiles-adenosine (Amph-A) et Amph-U, non observées dans le cas Amph-A en présence de Amph-C<sup>48,49</sup>. Ces études permettent de distinguer les contributions d'interactions d'empilement et de liaisons H (sans restriction aux liaisons de type WC) en présence de nucléotides complémentaires ou non complémentaires à l'interface air-eau.

En milieu aqueux, ces travaux montrent que les vésicules présentent une surface propice aux interactions mises en jeu dans l'appariement de bases. Des études de spectroscopies UV ont montré un effet hypochrome (diminution de l'intensité d'absorbance à une longueur d'onde caractéristique donnée) attribué à la présence de liaisons H entre nucléosides complémentaires<sup>50</sup>. En effet, ce phénomène est observé dans le cas de vésicules Amph-A/Amph-U contrairement aux vésicules Amph-A/Amph-C, écartant l'hypothèse d'interactions d'empilement comme seule contribution. Enfin, l'étude de nucléosides phosphatidyles a été menée dans le contexte de micelles<sup>51,52</sup>. A nouveau, avec des données supplémentaires de RMN et de diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)<sup>53</sup>, Baglioni a montré la présence d'interactions d'empilement ainsi que de liaisons H de type WC entre les nucléosides complémentaires A et U. Ces interactions entre bases complémentaires induisent une diminution de l'aire par tête polaire, mais sans changer la structure micellaire.

Dans le but d'initier des interactions avec une spécificité plus grande, des amphiphiles portant des PNAs liés de façon covalente ont été synthétisés. L'ajout d'une chaîne alkyle à un PNA, pour la synthèse d'une PNA amphiphile (PNAA) promeut l'auto-assemblage de ces

molécules sans modifier la spécificité d'interaction avec un acide nucléique complémentaire, ni la stabilité du complexe résultant<sup>54</sup>. Dans la majorité des cas, ces caractéristiques sont utilisées pour le développement de molécules d'intérêt biologique et biotechnologique : purification d'oligonucléotides de façon séquence-spécifique par chromatographie hydrophobe par exemple<sup>55</sup>.

Dans le domaine des auto-assemblages, Stupp s'est intéressé à l'architecture et aux propriétés supramoléculaires d'agrégats obtenus à partir d'une molécule constituée d'une partie PNA (1, en rouge, Figure IV-20A), d'une partie peptidique (P) (2, en violet, Figure IV-20A) et d'une partie amphiphile (A) (3, en bleu, Figure IV-20A), que nous appellerons PNA-PA<sup>56</sup>. D'un point de vue morphologique, ces molécules s'auto-assemblent en formant un gel constitué d'un réseau de nano-fibres (Figure IV-20B).



**Figure IV-20 : (A) Structure moléculaire du PNA-PA développé dans le groupe de Stupp. (B) Réseau de nano-fibres obtenu par auto-assemblage de ces molécules. Cette photographie est issue de Stupp, 2005 [56].**

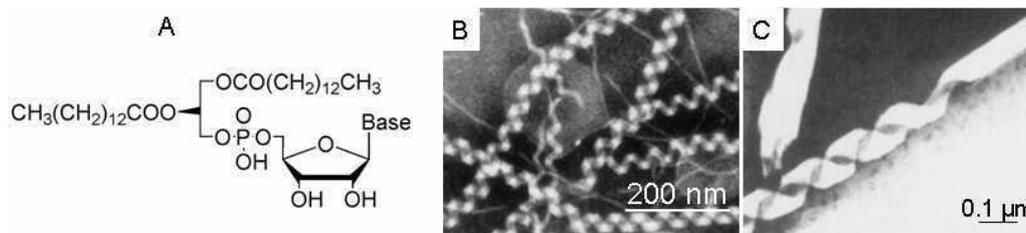
Ce type de structures a été également reporté par ce groupe avec des peptido-amphiphiles ayant une structure similaire à la partie PA (violet et bleu, Figure IV-20A)<sup>57</sup>. Le branchement du module PNA est particulièrement intéressant puisqu'il ne modifie pas fondamentalement la morphologie supramoléculaire. De plus, cette association est d'autant plus intéressante que le PNA conserve ses propriétés : le complexe PNA-PA/ADN se révèle extrêmement sélectif, et plus stable que le duplexe ADN/ADN correspondant.

### 3.3.2 Morphologies

D'un point de vue morphologique, les nucleoamphiphiles ont été également étudiés pour comprendre la relation entre structure moléculaire et architecture supramoléculaire. Ces systèmes ont été développés pour exploiter la coopérativité due aux propriétés intrinsèques d'auto-organisation de chacune des parties. Les nucléotides ont été notamment utilisés dans

l'objectif de reproduire les structures hélicoïdales caractéristiques des acides nucléiques naturels<sup>58</sup>.

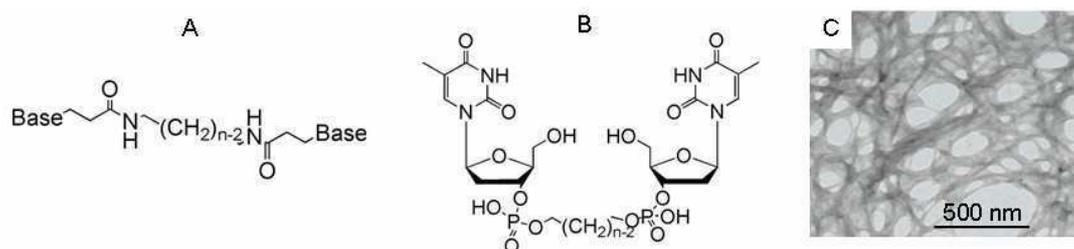
A la fin des années 1980, Yanagawa a ainsi décrit pour la première fois, la formation spontanée de structures hélicoïdales à partir de nucléosides conjugués à des phospholipides (dimyristoyle-5'-phosphatidylenucleosides) (Figure IV-21)<sup>59,60</sup>.



Ces travaux illustrent la coopérativité des structurations des parties amphiphile et nucléotidique et l'importance des interactions mises en jeu, spécifiques à chacune d'elles. Les interactions hydrophobes qui régissent l'auto-assemblage de la partie amphiphile ont un rôle clé dans la formation des hélices qui ne sont observées que pour des longueurs de chaînes hydrophobes de 14 et 16 carbones. L'importance de la partie nucléotidique est illustrée par l'absence de structures hélicoïdales dans le cas de phospholipides équivalents ne portant pas de base nucléique, ainsi que par la diversité de morphologies (simple ou double hélice, largeur et pas de l'hélice) observée en fonction du nucléoside (adénosine, cytidine ou uridine).

A la suite de ces travaux, de nombreux groupes ont décrit la formation d'agrégats supramoléculaires de morphologies originales. On citera en particulier les groupes de Shimizu, Kim, Shinkai et Barthélémy.

Shimizu a notamment exploité les propriétés d'agents gélifiants de l'eau de molécules bola-amphiphiles liées de façon covalente à des bases nucléiques (Figure IV-22A) ou à des nucléotides (Figure IV-22B). Dans ces systèmes, l'importance des parties amphiphile et nucléique est étudiée en faisant varier successivement la longueur  $n$  de l'espaceur et la nature de la base.



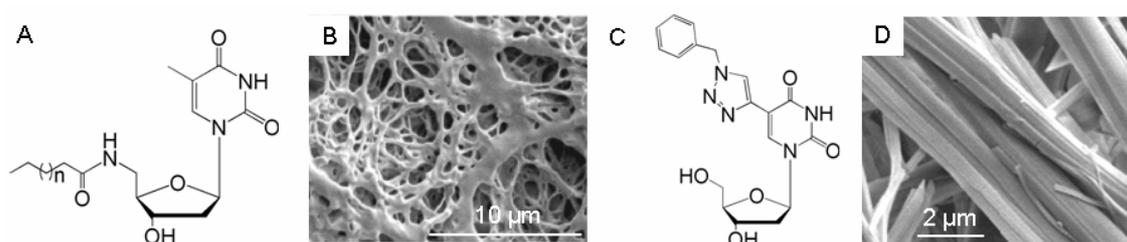
**Figure IV-22 : (A) et (B) Structures moléculaires des nucléo-amphiphiles (bola-amphiphiles) utilisés par Shimizu. (C) Formation d'un gel à partir de (B). Cette photographie est issue de Shimizu, 2002 [64].**

Les dérivés du bola-amphiphile A (Figure IV-19) portant les bases T-n-T, A-n-A et T-n-A ont été synthétisés et leurs auto-assemblages caractérisés. T-10-T s'auto-assemble en double hélice micrométrique alors que A-10-A précipite. Lorsque les deux bases complémentaires sont présentes, soit au sein de la même molécule T-10-A soit dans le mélange T-10-T/A-10-A, la formation de fibres nanométriques achirales est observée<sup>61</sup>. Ces études montrent que l'acquisition d'une morphologie résulte d'interactions dépendantes de la nature des bases. Dans ces systèmes, ces variations sont attribuées principalement aux différences d'interactions d'empilement entre purines et pyrimidines.

Dans le cas de nucléotides (TMP) liés covalamment par une chaîne alkyle de longueur  $n$  (Figure IV-22B)<sup>62</sup> un gel est formé dans certaines conditions de pH (7-8), température ( $>85^{\circ}\text{C}$ ) et longueur d'espaceur  $n$  ( $\geq 18$ ) (Figure IV-22C). L'addition de petits oligomères d'AMP ( $n$  AMP liés covalamment par des liaisons phosphodiester 3'-5',  $n$  étant compris entre 2 et 8) n'induit aucune modification de la structure du gel. Cependant, dès lors que le squelette adénylé est suffisamment important ( $n = 10, 20$  ou 40 unités), le gel est caractérisé par la formation de fibres hélicoïdales. Des études supplémentaires, en spectrométrie de masse, spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire, montrent la présence d'interactions s'établissant entre les bases nucléiques T et A<sup>63</sup>. Plus récemment, la spécificité d'interaction en fonction de la base a également été reportée. En effet, la formation de structures hélicoïdales à partir d'un bola-amphiphile TMP est permise en présence de poly AMP et non de poly TMP<sup>64</sup>.

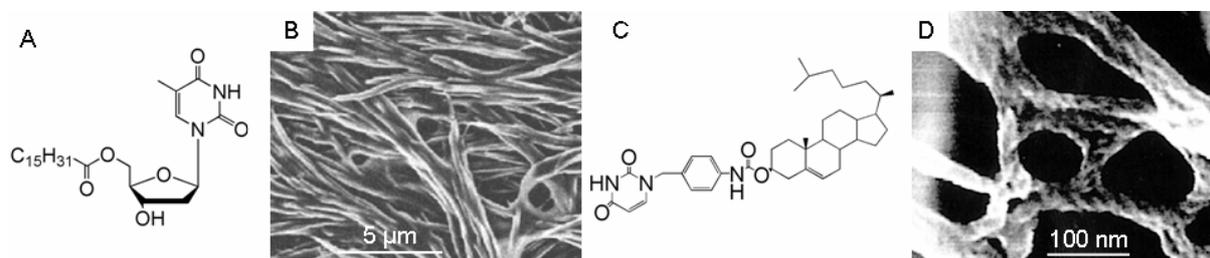
En 2003, le groupe de Kim a développé deux systèmes nucléolipidiques qui se sont également révélés être des agents gélifiant. Chaque système possède une partie amphiphile et une base propres. Le premier, composé de thymidine, est capable d'emprisonner des solvants organiques (Figure IV-23A et B)<sup>65</sup>. Le second est composé d'uridine et est un agent gélifiant

de l'eau (Figure IV-23C et D)<sup>66</sup>. Ces phénomènes d'agrégation aboutissent à la formation de fibres ou de lamelles.



**Figure IV-23 :** (A) Structure moléculaire du nucléo-amphiphile dérivé de thymidine et (B) formation d'un gel en solvant organique. (C) Structure moléculaire du nucléolipide dérivé d'uridine et (D) formation d'un gel en milieu aqueux. Ces photographies sont issues de Kim, 2003 [67] et 2003 [68].

Shinkai a développé un gélifiant de solvants organiques dérivé de thymidine, possédant une structure proche de celle décrite par Kim. (Figure IV-24A)<sup>67</sup>. Si la formation du gel est conservée suite à l'addition de poly (C) ou poly (A), des différences morphologiques sont observées en microscopie électronique (Figure IV-24B). De plus, l'addition de poly (A) provoque des variations spectroscopiques, non observées suite à l'ajout de poly (C). Ceci indique que les liaisons hydrogène impliquées sont spécifiques de la base nucléique.

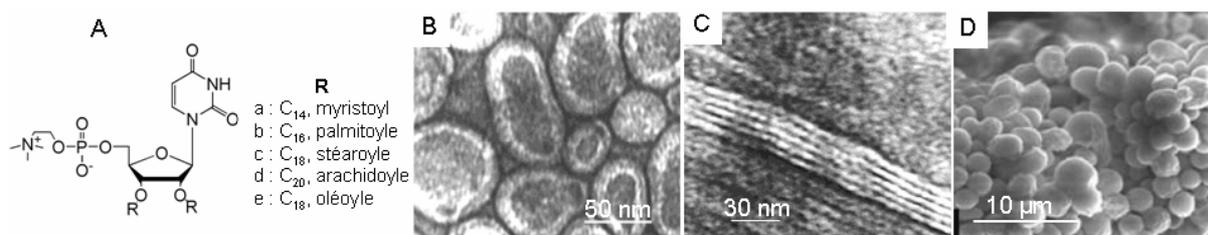


**Figure IV-24 :** (A) Structure moléculaire du nucléo-amphiphile dérivé de thymidine et (B) formation d'un gel en solvant organique. (C) Structure moléculaire du nucléo-amphiphile dérivé du cholestérol portant un uracile et (D) formation d'un gel. Ces photographies sont issues de Shinkai, 2004 [69] et 2001 [70].

Un autre nucléolipide a été synthétisé et étudié par ce groupe (Figure IV-24C). Ce système repose sur le fait que le cholestérol et ses dérivés ont prouvé leur efficacité à former des gels. Dans ce cas, le dérivé du cholestérol porte un uracile à une extrémité. En solvants organiques, cette molécule s'auto-assemble en réseau de fibres hélicoïdales formant un gel (Figure IV-24D)<sup>68</sup>. Les propriétés de ce gel ont été étudiées en fonction de la présence d'additifs composés de bases nucléiques. Alors qu'en présence de nucléosides monomériques, le gel est déstabilisé, il est renforcé en présence de poly(A) et poly(C)<sup>69</sup>. Aucune reconnaissance spécifique n'est observée dans ce cas. Cependant, il apparaît clairement que la restriction

conformationnelle apportée par le squelette sucre-phosphate au sein du polymère est essentielle pour permettre l'effet coopératif *via* des interactions faibles responsables de la stabilisation de la structure hélicoïdale du gel. La coopérativité d'origine hydrophobe est également importante. Ce gel est stabilisé par l'addition du dérivé du cholestérol de départ, mais cette fois-ci de façon dépendante de la nature des bases liées. La stabilisation du gel est observée en présence d'adénine mais pas en présence de cytosine<sup>70</sup>.

Récemment, une contribution importante a été apportée par le groupe de Barthélémy qui utilise un système dans lequel un nucléoside (uridine) est lié de façon covalente à une phosphocholine (Figure IV-25A). Ce nucléolipide s'auto-assemble en une diversité de morphologies importante (Figure IV-25B, C et D), et se révèle notamment être un agent gélifiant de l'eau et des solvants organiques dans certaines conditions (température, concentration, structure moléculaire, additifs).



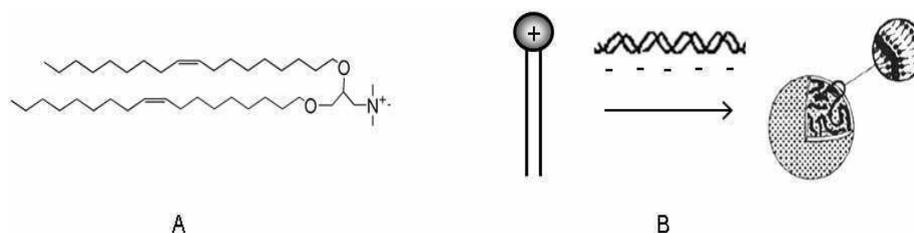
**Figure IV-25 : (A) Structures moléculaires des nucléo-amphiphiles utilisés par Barthélémy. (B) Formation de vésicules à partir du nucléolipide Ae, (C) d'un gel à partir du nucléolipide Ab, (D) de microsphères à partir du nucléolipide Ac, en présence d'actinides. Ces photographies sont issues de Barthélémy, 2004 [73], et 2006 [74].**

Dans ce cas, des transitions de morphologies sont observées en fonction de la structure moléculaire des chaînes hydrophobes (nature, longueur et insaturation) et de la présence d'additifs. Par exemple, la molécule Ae (Figure IV-25A) conduit à la formation de vésicules (Figure IV-25B) alors que le nucléolipide Ab se révèle être un agent gélifiant de l'eau et des solvants organiques, présentant un réseau de fibres en microscopie électronique (Figure IV-25C) et Ac forme un gel uniquement en milieu aqueux<sup>71</sup>. L'addition d'ions actinides ou lanthanides induit une transition vers la formation de microsphères (Figure IV-25D)<sup>72</sup>, et le remplacement des chaînes hydrocarbonnées par des chaînes fluorocarbonnées induit la formation de phases lamellaires<sup>73</sup>.

Tous les systèmes décrits précédemment mettent en jeu des molécules amphiphiles liées de façon covalente à la partie nucléique. Peu de systèmes nucléo-amphiphiles non covalents ont été à ce jour développés dans le domaine des auto-assemblages. Ces systèmes présentent pourtant de nombreux avantages, en terme de synthèse, mais également en termes de morphologies et de contrôle moléculaire. Nous avons par exemple vu dans les chapitres précédents, l'acquisition de morphologies variées et originales induite par le contre ion complexé au tensioactif chargé. De plus, s'il est possible de varier la nature du contre ion facilement, le contrôle des morphologies est accessible par de multiples voies, telles que le pH et la présence de sels.

#### *Systèmes nucléolipidiques non covalents*

Des complexes faisant intervenir des interactions électrostatiques entre une partie amphiphile cationique et des acides nucléiques chargés négativement ont été largement étudiés dans le domaine médical, pour la conception de vecteurs, notamment pour le transfert de gènes (Figure IV-26)<sup>74</sup>. Les liposomes cationiques se présentent comme des alternatives intéressantes aux vecteurs viraux<sup>75,76</sup>.



**Figure IV-26 : (A) Structure moléculaire du tensioactif cationique développé par Felgner, 1987 [76]. (B) Schéma de l'encapsulation d'ADN polyanionique dans un liposome cationique, adapté de Behr, 1994 [77].**

Certains groupes de recherche se sont intéressés à la structure supramoléculaire de tels complexes et aux mécanismes de leurs auto-assemblages. Cependant, ces études sont principalement orientées vers la compréhension des mécanismes d'encapsulation, ainsi que de l'organisation des systèmes biologiques, tels que la compaction de l'ADN génomique dans le noyau d'une cellule, dans une bactérie ou une capsid virale. Ces travaux impliquent l'étude de la condensation de l'ADN sur une surface, ou entre des mono et bicouches lipidiques ainsi que la caractérisation des interactions ADN-ADN et ADN-lipides<sup>77,78,79,80</sup>.

Cependant, si ces systèmes sont basés sur l'association non covalente d'acides nucléiques à des molécules amphiphiles chargées, ils restent éloignés des nucléolipides présentés dans ce chapitre. L'utilisation de brins d'ADN et d'ARN ne permet notamment pas un contrôle strict de la stoechiométrie des deux partenaires.

## **4 Conclusion**

Ce travail bibliographique illustre les enjeux de l'élaboration de nucléo-amphiphiles pour la conception d'auto-assemblages supramoléculaires dans différents contextes : aux surfaces et aux interfaces d'objets amphiphiles, aussi bien en milieu aqueux qu'organique. La fonctionnalisation des tensioactifs par l'insertion d'un nucléotide, nucléoside ou simplement d'une base nucléique génère un intérêt important dans le but de tirer profit de leurs propriétés au sein des acides nucléiques, en termes d'auto-organisation et de reconnaissance moléculaire. L'exploitation de ces molécules est particulièrement stimulante pour créer de nouvelles architectures dotées d'un contrôle à l'échelle moléculaire.

Les exemples présentés dans ce chapitre montrent qu'il est possible de contrôler et de moduler les propriétés des agrégats nucléo-amphiphiles en fonction de la nature de la base nucléique associée au tensioactif. La morphologie des auto-assemblages peut en effet être variée par l'addition d'un autre nucléo-amphiphile, ou d'une base nucléique, complémentaire ou non complémentaire. Ces architectures sont également sensibles à la structure du tensioactif (longueur et nature des chaînes hydrophobes par exemple), ainsi qu'à de multiples paramètres extérieurs tels que la nature du solvant et la présence d'ions.

De nombreux travaux ont reporté l'accès à un contrôle des propriétés d'auto-assemblage reposant sur la spécificité d'interaction entre bases nucléiques complémentaires et non complémentaires. Ces travaux concernent à la fois l'étude des interactions aux interfaces (air-eau par exemple) et en solution et utilisent de nombreuses techniques telles que la mesure des isothermes de Langmuir et des méthodes spectroscopiques (infrarouge et RMN notamment). Cependant, dans la majorité des cas, les quatre nucléosides ne sont pas exploités. Pour obtenir un contrôle strictement spécifique, la caractérisation des agrégats nucléo-amphiphiles nécessite une étude systématique du comportement d'agrégation en présence de chacune des bases. Est-il possible d'associer chacune des bases à un tensioactif donné pour induire la formation de structures de morphologie originale ? Comment ces morphologies sont-elles modulées par l'addition de chacune des quatre bases nucléiques ? De quelle nature sont les interactions s'établissant entre les différents partenaires ? Des réponses à ces questions seront proposées dans le chapitre suivant.

## Références

- 
- <sup>1</sup> Rojo, J., Morales, J.C., Penadés, S. *Top. Curr. Chem.* **2002**, 218, 45
- <sup>2</sup> Ahlers, M., Müller, W., Reichert, A., Ringsdorf, H., Venzmer, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 1269
- <sup>3</sup> Lowe, C.L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 428
- <sup>4</sup> Hamley, I.W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1692
- <sup>5</sup> Sponer, J., Leszczynski, J., Hobza, P. *Biopolymers*, **2002**, 61, 3
- <sup>6</sup> Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New-York, **1984**
- <sup>7</sup> Acharya, P., Cheruku, P., Chatterjee, S., Acharya, S., Chattopadhyaya, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2862
- <sup>8</sup> Kool, E.T. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, 30, 1
- <sup>9</sup> Pincet, F., Perez, E., Bryant, G., Lebeau, L., Mioskowski, C. *Mod. Phys. Lett. B* **1996**, 10, 81
- <sup>10</sup> Guckian, K.M., Schweitzer, B.A., Ren, R.X.F., Sheils, C.J., Tahmassebi, D.C., Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2213
- <sup>11</sup> Gellert, M., Lipsett, M.N., Davies, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 2013
- <sup>12</sup> Davis, J.T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 668
- <sup>13</sup> Davis, J.T., Spada, G.P. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 296
- <sup>14</sup> Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O. *Science*, **1991**, 254, 1497
- <sup>15</sup> Uhlmann, E., Peyman, A., Breipohl, G., Will, D.W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796
- <sup>16</sup> Nielsen, P.E. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 624
- <sup>17</sup> Seeman, N.C. *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 237
- <sup>18</sup> Seeman, N.C., Lukeman, P.S. *Rep. Prog. Phys.* **2005**, 68, 237
- <sup>19</sup> Rothmund, P.W.K., Ekani-Nkodo, A., Papadakis, N., Kumar, A., Fygenson, D.K., Winfree, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16344
- <sup>20</sup> Shih, W.M., Quispe, J.D., Joyce, G.F. *Nature* **2004**, 427, 618
- <sup>21</sup> Kim, K., Masumoto, K., Matsuura, K., Kimizuka, N. *Chem. Lett.* **2006**, 35, 486
- <sup>22</sup> Feldkamp, U., Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1856
- <sup>23</sup> Rothmund, P.W.K. *Nature* **2006**, 440, 297
- <sup>24</sup> Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, A.P.Jr., Simmel, F.C., Neumann, J.L. *Nature* **2000**, 406, 605
- <sup>25</sup> Sherman, W.B., Seeman, N.C. *Nano Lett.* **2004**, 4, 1203
- <sup>26</sup> Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4128
- <sup>27</sup> Stevenson, K.A., Muralidharan, G., Maya, L., Wells, J.C., Barhen, J., Thundat, T. *J. Nanosci. Nanotech.* **2002**, 2, 397
- <sup>28</sup> Storhoff, J.J., Mirkin, C.A. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849
- <sup>29</sup> Yao, H., Yi, C., Tzang, C.H., Zhu, J., Yang, M. *Nanotechnology*, **2007**, 18, 1

- <sup>30</sup> Peschel, S., Ceyhan, B., Niemeyer, C.M., Gao, S., Chi, L., Simon, U. *Materials Science and Engineering C* **2002**, *19*, 47
- <sup>31</sup> Ringsdorf, H. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, ed. Baszkin, A., Norde, W., Marcel Dekker, Inc. N.Y., 243, 2000
- <sup>32</sup> Kunitake, T. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, ed. Baszkin, A., Norde, W., Marcel Dekker, Inc. N.Y., 243, 2000
- <sup>33</sup> Araki, K., Yoshikawa, I. *Top. Curr. Chem.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2005**, *256*, 133
- <sup>34</sup> Rosemeyer, H. *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*, 977
- <sup>35</sup> Nowick, J.S., Chen, J.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1107
- <sup>36</sup> Nowick, J.S., Chen, J.S., Noronha, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7636
- <sup>37</sup> Nowick, J.S., Cao, T., Noronha, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3285
- <sup>38</sup> Kitano, H., Ringsdorf, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 2826
- <sup>39</sup> Ahlers, M., Ringsdorf, H., Rosemeyer, H., Seela, F. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, *268*, 132
- <sup>40</sup> Ariga, K., Kunitake, T. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 371
- <sup>41</sup> Paleos, C.M., Tsiourvas, D. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 695
- <sup>42</sup> Berti, D., Luisi, P.L., Baglioni, P. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* **2000**, *167*, 95
- <sup>43</sup> Shimomura, M., Nakamura, F., Ijio, K., Taketsuna, H., Tanaka, M., Nakamura, H., Hasebe, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2341
- <sup>44</sup> Nakamura, F., Ijio, K., Shimomura, M. *Thin Solid Film* **1998**, *327*, 603
- <sup>45</sup> Shimomura, M., Matsumoto, J., Nakamura, F., Ikeda, T., Fukasawa, T., Hasebe, K., Sawadaishi, T., Karthaus, O., Ijio, K. *Polymer Journal* **1999**, *11*, 1115
- <sup>46</sup> Onda, M., Yoshihara, K., Koyano, H., Ariga, K., Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8524
- <sup>47</sup> Sasaki, D.Y., Kurihara, K., Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10994
- <sup>48</sup> Berti, D., Franchi, L., Baglioni, P. *Langmuir* **1997**, *13*, 3438
- <sup>49</sup> Rädler, U., Heiz, C., Luisi, P.L., Tampé, R. *Langmuir* **1998**, *14*, 6620
- <sup>50</sup> Berti, D., Baglioni, P., Bonaccio, S., Barsacchi-Bo, G., Luisi, P.L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 303
- <sup>51</sup> Berti, D., Barbaro, P., Bucci, I., Baglioni, P. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4916
- <sup>52</sup> Heiz, C., Rädler, U., Luisi, P.L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8686
- <sup>53</sup> Berti, D., Pini, F., Baglioni, P., Teixeira, J. *Physica B* **2000**, *276*, 334
- <sup>54</sup> Vernille, J.P., Kovell, L.C., Schneider, J.W. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1314
- <sup>55</sup> Vernille, J.P., Schneider, J.W. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1776
- <sup>56</sup> Guler, M.O.; Pokorski, J.K., Appella, D.H., Stupp, S.I. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 501
- <sup>57</sup> Guler, M.O., Soukasene, S., Hulvat, J.F., Stupp, S.I. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 249
- <sup>58</sup> Bombelli, F.B., Berti, D., Almgren, M., Karlsson, G., Baglioni, P. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17627
- <sup>59</sup> Yanagawa, H., Ogawa, Y., Furuta, H., Tsuno, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4567
- <sup>60</sup> Itojima, Y., Ogawa, Y., Tsuno, K., Handa, N., Yanagawa, H. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4757
- <sup>61</sup> Shimizu, T., Iwaura, R., Masuda, M., Hanada, T., Yase, K., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5947
- <sup>62</sup> Iwaura, R., Yoshida, K., Masuda, M., Yase, K., Shimizu, T. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3047
- <sup>63</sup> Iwaura, R., Yoshida, K., Masuda, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Shimizu, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1009

- <sup>64</sup> Iwaura, R., Hoeben, F.J.M., Masuda, M., Schenning, A.P.H.J., Meijer, E.W., Shimizu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13298
- <sup>65</sup> Yun, Y.J., Park, S.M., Kim, B.H. *Chem. Comm.* **2003**, 254
- <sup>66</sup> Park, S.M., Lee, Y.S., Kim, B.H. *Chem. Comm.* **2003**, 2912
- <sup>67</sup> Sugiyasu, K., Numata, M., Fujita, N., Park, S.M., Yun, Y.J., Kim, B.H., Shinkai, S. *Chem. Comm.* **2004**, 1996
- <sup>68</sup> Snip, E., Shinkai, S., Reinhoudt, D.N. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 2153
- <sup>69</sup> Numata, M., Shinkai, S. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 308
- <sup>70</sup> Snip, E., Koumoto, K., Shinkai, S. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8863
- <sup>71</sup> Moreau, L., Barthélémy, P., El Maataoui, M., Grinstaff, M.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7533
- <sup>72</sup> Moreau, L., Campins, N., Grinstaff, M.W., Barthélémy, P. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 7117
- <sup>73</sup> Moreau, L., Ziarelli, F., Grinstaff, M.W., Barthélémy, P. *Chem. Comm.* **2006**, 1661
- <sup>74</sup> 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. USA* **1987**, *84*, 7413
- <sup>75</sup> Behr, J.P. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 382
- <sup>76</sup> Dauty, E., Remy, J.S., Blessing, T., Behr, J.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9227
- <sup>77</sup> Fang, Y., Yang, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 441
- <sup>78</sup> Spector, M.S., Schnur, J.M. *Science* **1997**, *275*, 791
- <sup>79</sup> Salditt, T., Koltover, I., Rädler, J.O., Safinya, C.R. *Phys. Rev. E* **1998**, *58*, 889
- <sup>80</sup> Safinya, C.R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 440

## Chapitre 5 :

### Etude de nucléo-amphiphiles en solution

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de la rédaction de trois publications.

Wang, Y., Desbat, B., Manet, S., Aimé, C., Labrot, T., Oda, R. (2005) *Aggregation behaviors of gemini-nucleotide at air-water interface and in solution induced by adenine – uracil interaction*. J. Colloid Interface Sci., 283, 555

Aimé, C., Manet, S., Satoh, T., Park, K.Y., Ihara, H., Godde, F., Oda, R. *Self-assembly of nucléoamphiphiles: investigating nucleosides effect and the mechanism of micrometric helix formation*. Langmuir, accepté.

Aimé, C., Satoh, T., Grelard, A., Dufourc, E., Buffeteau, T., Ihara, H., Oda, R. *Nucleotide-Promoted Morphogenesis in amphiphile assemblies - Kinetic control of micrometric helix formation*. Soumis à publication.



## 1 Introduction

Dans le domaine des auto-assemblages, les nucléo-amphiphiles sont des molécules particulièrement intéressantes puisqu'elles sont composées de deux entités capables de s'auto-organiser de façon autonome. Les acides nucléiques interagissent *via* de multiples interactions faibles d'empilement aromatique et de liaisons hydrogène notamment. Les molécules amphiphiles s'auto-assemblent dans l'eau du fait de nombreuses forces contrôlées par différents paramètres moléculaires dont la principale est l'effet hydrophobe. L'association de ces deux entités permet de concevoir de nouvelles architectures supramoléculaires induites par des effets coopératifs d'auto-organisation. L'auto-assemblage de la partie amphiphile assure le confinement des nucléotides à la surface des agrégats formés et favorise les interactions inter nucléotides telles qu'observées au sein des acides nucléiques (Figure V-1). Les contraintes conformationnelles imposées par ces interactions forcent ainsi la réorganisation des parties amphiphiles.

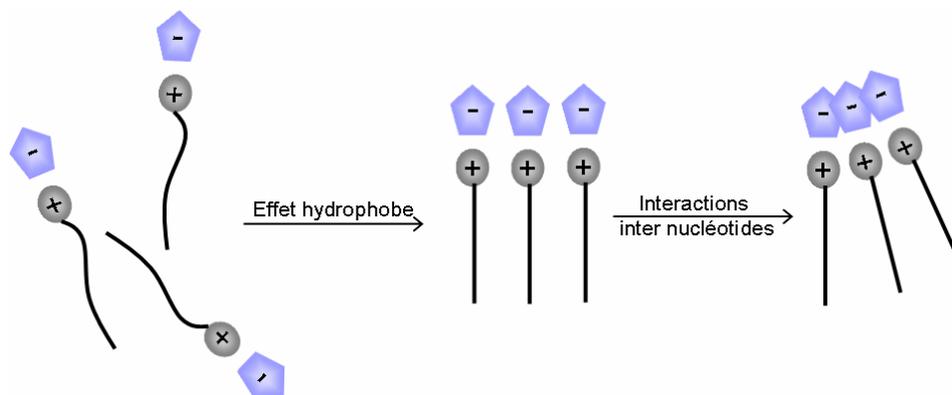


Figure V-1 : Représentation schématique des effets coopératifs responsables de l'auto-assemblage de nucléo-amphiphiles en solution.

L'objectif de notre projet consiste à varier les différents paramètres moléculaires de ces systèmes pour comprendre les contributions de chaque entité dans l'acquisition des propriétés des auto-assemblages et contrôler les morphologies obtenues. Ainsi, nous souhaitons développer une stratégie rationnelle pour la conception de nouvelles architectures supramoléculaires à partir de biomolécules.

Les systèmes que nous développons au sein de notre laboratoire consistent en complexes électrostatiques, la partie nucléique n'étant pas liée de façon covalente à l'amphiphile. Cette stratégie permet de varier relativement facilement chaque entité et d'obtenir une bibliothèque de nucléolipides vaste et peu contraignante d'un point de vue de sa synthèse.

En ce qui concerne la partie amphiphile, deux systèmes ont été développés : des amphiphiles géminés dicationiques (gemini) (Figure V-2A et B) ainsi que des molécules amphiphiles composées de deux chaînes hydrophobes et d'une seule tête cationique (Figure V-2 C). Pour chaque système, différents paramètres ont été modifiés au cours de l'étude. La partie nucléique consiste en mononucléotides monoanioniques (Figure V-2A et C) ou trinucleotides dianioniques (Figure V-2B). La nature de la base du nucléotide complexé a également été variée.

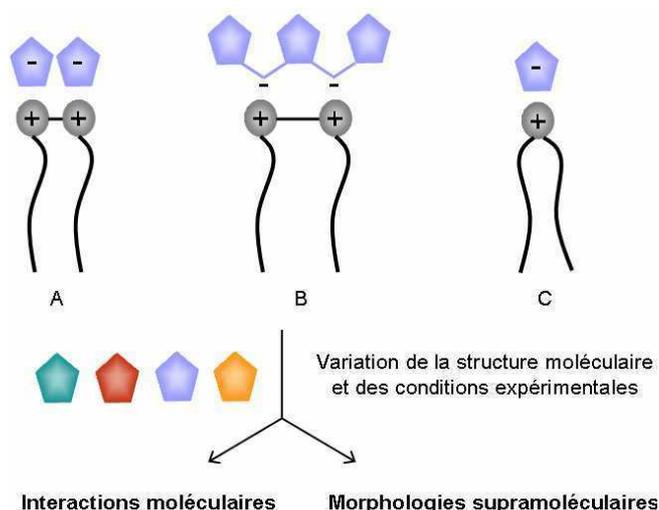


Figure V-2 : Représentation schématique des systèmes nucléo-amphiphiles étudiés.

Au-delà de la diversité structurale des nucléo-amphiphiles synthétisés, le comportement de ces molécules a été étudié en fonction de divers paramètres expérimentaux, tels que la concentration, la température, ainsi que la présence de nucléosides non chargés (constitués d'une base liée au ribose) (Figure V-2).

Dans un souci de clarté, ce chapitre présente l'étude de nucléo-amphiphiles monocationiques. Nous nous attacherons à présenter en parallèle l'étude des interactions inter moléculaires mises en jeu ainsi que la caractérisation des morphologies supramoléculaires observées. Les résultats obtenus à partir de gemini dicationiques complexés à des mononucléotides seront présentés en annexe (Annexe V-1).

## 2 Amphiphiles monocationiques : étude des nucléolipides

### $C_{12}$ GMP et $C_{14}$ AMP

Ces nucléolipides sont constitués d'une tête polaire cationique portant deux chaînes aliphatiques symétriques de longueur  $n$ . A cet amphiphile est complexé un mononucléotide NMP. Dans la suite de ce manuscrit, ces molécules seront notées  $C_n$ NMP (Figure V-3). Les comportements d'agrégation des molécules synthétisées à ce jour par Sabine Manet et moi-même sont présentés dans le Tableau V-1 :

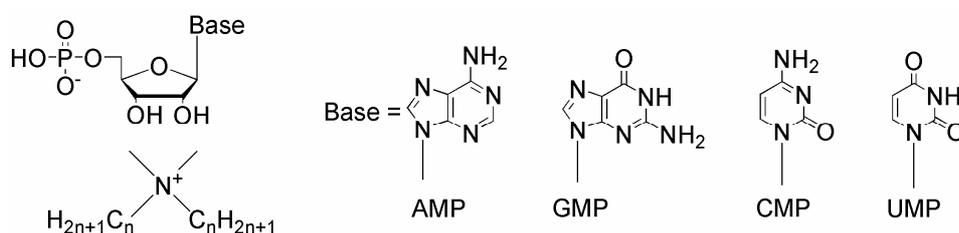


Figure V-3 : Structure moléculaire des nucléo-amphiphiles monocationiques  $C_n$ NMP.

Amphiphile	$T_k$ (°C)	Comportement d'agrégation
$C_{12}$ AMP		Précipité ; Arborescence de forme indéterminée
$C_{14}$ AMP	32	Précipité ; <b>Structures hélicoïdales chirales</b>
$C_{16}$ AMP	35	Précipité ; Longues fibres sans chiralité apparente
$C_{16}$ CMP	35	Précipité ; Amas sans chiralité
$C_{18}$ CMP	60	Précipité ; Amas sans chiralité
$C_{12}$ GMP	35	Gel ; <b>Structures hélicoïdales chirales</b>
$C_{14}$ GMP	67	Gel
$C_{16}$ GMP	~ 95	Gel
$C_{18}$ UMP	44	Gel opaque ; Fibres sans chiralité apparente

Tableau V-1 : Températures de Krafft ( $T_k$ ) et comportements macro et microscopiques de nucléo-amphiphiles monocationiques. Clichés de microscopie optique des échantillons  $C_{12}$ AMP,  $C_{14}$ AMP,  $C_{16}$ AMP,  $C_{16}$ CMP et  $C_{12}$ GMP. Le cliché de l'échantillon de  $C_{12}$ GMP a été réalisé par S. Manet.

Les résultats préliminaires obtenus par microscopie optique montrent la formation de structures supramoléculaires chirales à partir des nucléo-amphiphiles C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP. Partant d'un amphiphile non chiral, ceci représente un nouvel exemple de transfert de chiralité *via* le contre ion. La chiralité moléculaire du nucléotide s'exprime à l'échelle supramoléculaire.

De ce fait, les systèmes C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP ont fait l'objet d'études approfondies qui seront présentées dans un premier temps. A la suite de cet exposé, l'étude cinétique de ce transfert de chiralité sera développée. Enfin, nous aborderons un nouvel aspect de la caractérisation de tels objets.

Les nucléolipides C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP sont constitués de parties amphiphiles et nucléiques possédant des caractéristiques différentes en terme d'agrégation. Le tensioactif C<sub>12</sub>GMP possède des chaînes hydrophobes plus courtes que le tensioactif C<sub>14</sub>AMP, donc moins propices à l'agrégation. En revanche, son contre ion GMP est plus enclin à précipiter que l'AMP. En effet, malgré son fort moment dipolaire et une taille similaire à celle de l'AMP, GMP est particulièrement insoluble dans l'eau et s'agrège de multiples façons. Ces deux effets se compensent de telle manière que ces systèmes ont des T<sub>k</sub> et des concentrations d'agrégation critiques (cac) similaires ( $2,7 \cdot 10^{-4}$  M pour C<sub>12</sub>GMP et  $1,1 \cdot 10^{-4}$  M pour C<sub>14</sub>AMP). Cet aspect est particulièrement important puisqu'il nous permet de comparer ces systèmes de façon directe dans la suite de notre étude.

Ce travail a conduit à la rédaction d'une publication<sup>1</sup>.

## 2.1 Etude des interactions intermoléculaires en solution

Dans un premier temps, nous avons étudié l'agrégation des nucléolipides par conductimétrie et colorimétrie. Chacun des deux tensioactifs est étudié dans l'eau ultra pure puis dans une solution de nucléosides de concentration égale à 2 mM.

### 2.1.1 Etude par conductimétrie

C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP présentent des cac similaires, caractérisées par des ruptures de pente très faibles (Figure V-4). D'une manière générale, les valeurs de conductivité sont deux fois plus importantes pour C<sub>12</sub>GMP ( $0-80 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) que pour C<sub>14</sub>AMP ( $0-30 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ): les

agrégats de C<sub>14</sub>AMP sont moins ionisés que ceux formés à partir de C<sub>12</sub>GMP. Ce phénomène s'explique par une force d'interaction plus importante entre l'amphiphile et le contre anion AMP qu'en présence de GMP.

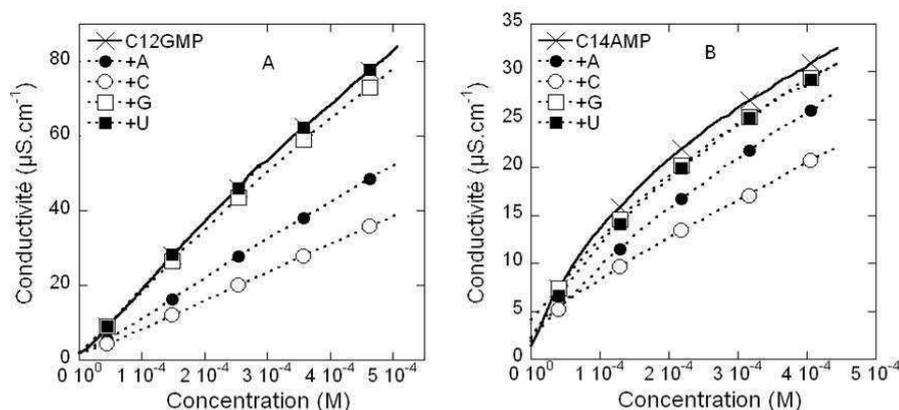


Figure V-4 : Etude de l'agrégation des tensioactifs C<sub>12</sub>GMP (A) et C<sub>14</sub>AMP (B) par conductimétrie, dans l'eau ultra pure et en présence d'une solution de nucléosides à 2 mM.

L'addition de nucléosides induit des variations de la conductivité autour de la cac. Une diminution de la conductivité est observée, de façon similaire au sein des systèmes C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP. Ces effets sont donc davantage dépendants du nucléoside présent en solution que du nucléotide complexé.

La conductivité mesurée reflète la mobilité du contre ion nucléotidique complexé. En effet, les pH des échantillons étudiés (cf Annexe 2, Tableau V-4) indiquent que les bases nucléiques sont présentes sous forme non protonée. Ainsi, la conductivité est une mesure directe des interactions entre bases nucléiques présentes (nucléotides complexés et nucléosides ajoutés).

Dans les deux systèmes, U et G ont des effets très faibles, contrairement à A et particulièrement à C qui présente la diminution de conductivité la plus importante. Les faibles effets observés en présence de U peuvent s'expliquer par la grande solubilité de ce nucléoside dans l'eau. Ainsi solvaté, U n'interagit pas avec le nucléo-amphiphile et ne perturbe pas la conductivité résultante de la solution. Dans le cas de G, ces faibles effets peuvent s'expliquer par le phénomène inverse. G est particulièrement peu soluble et s'auto-assemble dans l'eau ou interagit avec le noyau hydrophobe des agrégats, n'étant ainsi plus disponible pour interagir avec le nucléo-amphiphile.

En présence d'adénosine, une diminution importante de la conductivité est observée. Ceci s'explique par une diminution de la mobilité des contre ions nucléotidiques complexés et

indique la présence d'interactions GMP – A et AMP – A. Si ces liaisons hydrogène inter bases ne sont énergétiquement pas particulièrement stables, ces trois protagonistes ont des bases bi cycliques puriques. Ainsi, les interactions observées par conductimétrie peuvent être interprétées par la mise en place d'interactions d'empilement. Le cas de la cytidine présente l'exemple inverse. Si des interactions d'empilement peuvent intervenir pour stabiliser la formation des complexes, leur contribution est moindre dans les systèmes purine – pyrimidine. Cependant, les liaisons hydrogène AMP – C et particulièrement GMP – C présentent une stabilité importante (Chapitre IV-2.2.3).

### 2.1.2 Etude par colorimétrie

En ce qui concerne la structure des agrégats d'un tensioactif, l'étude par colorimétrie permet d'obtenir des informations différentes de la conductimétrie. Cette technique permet l'étude des interactions inter bases (interactions d'empilement et liaisons hydrogène) et de l'hydratation des agrégats, et non plus de leur état d'ionisation. L'agrégation, caractérisée par l'apparition d'une bande de longueur d'onde maximale comprise entre 410 et 430 nm<sup>-1</sup>, implique la formation d'agrégats d'autant plus hydratés que la longueur d'onde maximale est importante.

Les agrégats formés dans le cas du tensioactif C<sub>14</sub>AMP apparaissent moins hydratés (410-415 nm<sup>-1</sup>) que dans le cas de C<sub>12</sub>GMP (415-425 nm<sup>-1</sup>) (Figure V-5). Ceci confirme les résultats obtenus par conductimétrie : la plus faible force d'interaction entre le tensioactif et le nucléotide GMP induit une hydratation plus importante du contre ion que dans le cas d'une interaction forte entre l'amphiphile et l'AMP.

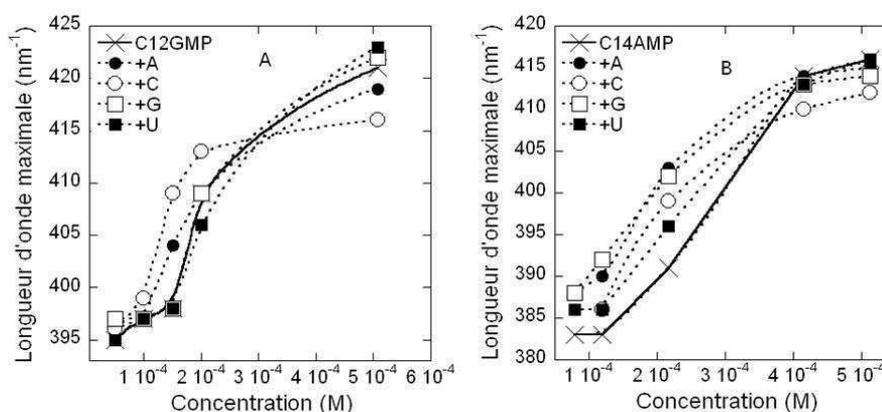


Figure V-5 : Etude de l'agrégation des tensioactifs C<sub>12</sub>GMP (A) et C<sub>14</sub>AMP (B) par colorimétrie, dans l'eau ultra pure et en présence d'une solution de nucléosides à 2 mM. La valeur de la longueur d'onde maximale d'absorbance du colorant au-delà de la cmc traduit l'état d'hydratation de l'agrégat.

L'addition de nucléosides induit des variations de longueurs d'ondes maximales mesurées. Les effets observés en présence de U et G sont très faibles, comme c'était le cas par conductimétrie, et également faibles en présence de A. L'effet le plus important est à nouveau observé en présence de C. Dans ce cas, les agrégats apparaissent moins hydratés. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment et s'explique par la formation de liaisons hydrogène GMP – C et AMP – C perturbant les liaisons hydrogène préalablement formées entre les nucléotides GMP ou AMP et les molécules d'eau.

## 2.2 Etude des interactions intermoléculaires à l'interface air-eau

### 2.2.1 Principe de l'expérience

Ces interactions ont été étudiées par la technique du film de Langmuir. Cette technique permet d'obtenir une monocouche de tensioactifs dès lors que celui-ci satisfait deux critères :

- ✓ Le tensioactif doit être **insoluble dans l'eau** pour ne pas être dissout en sous phase
- ✓ Le tensioactif doit être **soluble dans des solvants organiques** qui ont la capacité de s'évaporer facilement à température ambiante pour ne pas modifier l'aire par molécule de tensioactif déposée. On utilisera typiquement le chloroforme, auquel peut être ajoutée une faible quantité de méthanol dans le but d'améliorer la solubilité de nos échantillons.

Dans ces conditions, le dépôt d'une solution de tensioactifs de concentration connue permet la formation d'une couche d'épaisseur monomoléculaire dont la densité est contrôlée. Ces molécules sont déposées sur une surface d'eau contenue dans une cuve (appelée cuve de Langmuir), équipée de barrières amovibles contrôlées par ordinateur. Le comportement des molécules amphiphiles de la monocouche est étudié au cours de la diminution progressive de l'aire par molécule, par compression des barrières (Figure V-6).

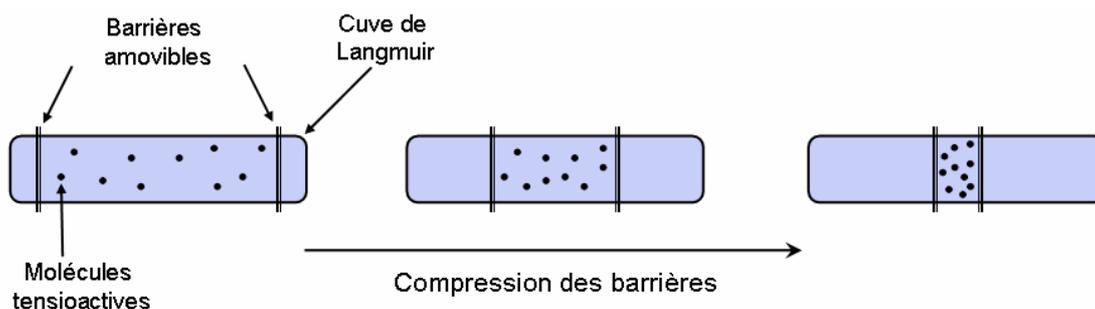


Figure V-6 : Représentation schématique de la compression d'une monocouche d'amphiphiles.

Au cours de la compression, les isothermes de pression de surface en fonction de l'aire par molécule sont mesurés à l'aide d'un tensiomètre, par la méthode Wilhelmy. Un isotherme de Langmuir présente typiquement trois phases principales (Figure V-7) :

- **la phase gaz** : dans ces conditions les molécules déposées ne sont pas en contact. Elles diffusent et s'orientent de façon indépendante les unes des autres.
- **la phase liquide** : l'aire par molécule diminue à la suite de la compression des barrières. Les molécules entrent en contact et interagissent les unes avec les autres. Leur comportement n'est plus indépendant des autres molécules du film. Cependant, la monocouche reste fluide et faiblement organisée.
- **la phase solide** : l'aire par molécule est réduite de façon à induire une forte organisation de la monocouche. Les interactions entre les molécules constitutives du film sont maximales. A ce stade, une compression supplémentaire de la monocouche provoque sa rupture.

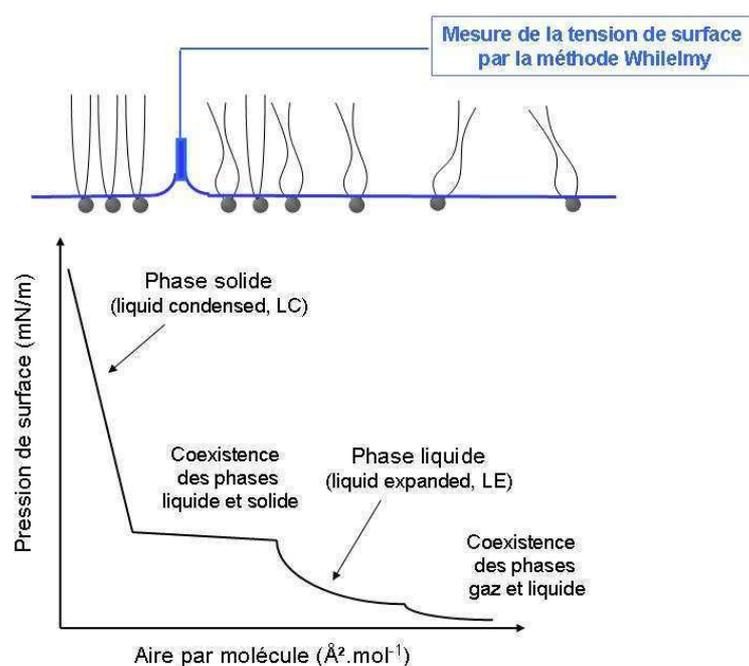


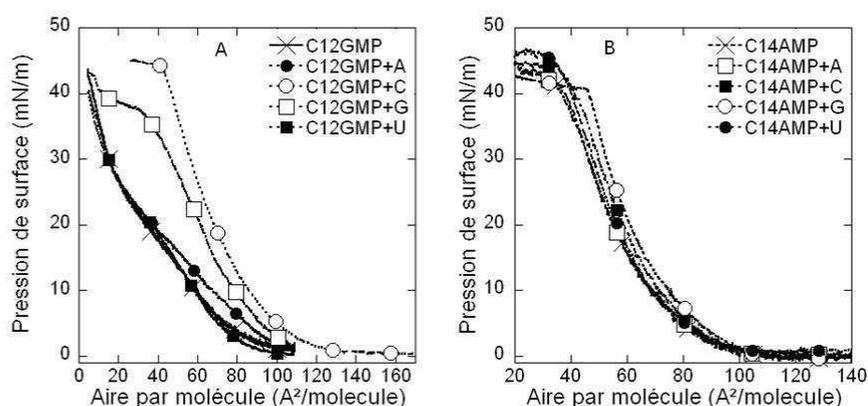
Figure V-7 : Schéma d'un isotherme de Langmuir pression de surface–aire par molécule obtenu au cours de la compression d'une monocouche de tensioactifs (diminution de l'aire par molécule).

Cette technique est particulièrement adaptée à l'étude des interactions inter moléculaires de nucléo-amphiphiles. Elle permet d'assurer un confinement des nucléotides à la surface de la monocouche dans le but de promouvoir des interactions entre nucléotides complexés et éventuellement entre nucléotides et nucléosides ajoutés dans la sous phase aqueuse. Cette configuration permet de fixer l'orientation des nucléo-amphiphiles tout en les laissant libres de diffuser au sein de la monocouche.

## 2.2.2 Résultats

A l'interface air-eau, les interactions intermoléculaires entre les molécules  $C_{12}GMP$  et  $C_{14}AMP$  et les différents nucléosides ont été étudiées par la technique du film de Langmuir. Dans ce contexte, les deux tensioactifs montrent des comportements très différents (Figure V-8).  $C_{14}AMP$  présente un isotherme de Langmuir classique alors que  $C_{12}GMP$  apparaît trop soluble dans l'eau pour former une monocouche stable. Cependant, la présence des nucléosides C et G en sous phase permet de stabiliser la monocouche de  $C_{12}GMP$ . Dans ces deux cas, on obtient un isotherme de Langmuir typique. Aucune stabilisation n'est observée en présence des nucléosides A et U.

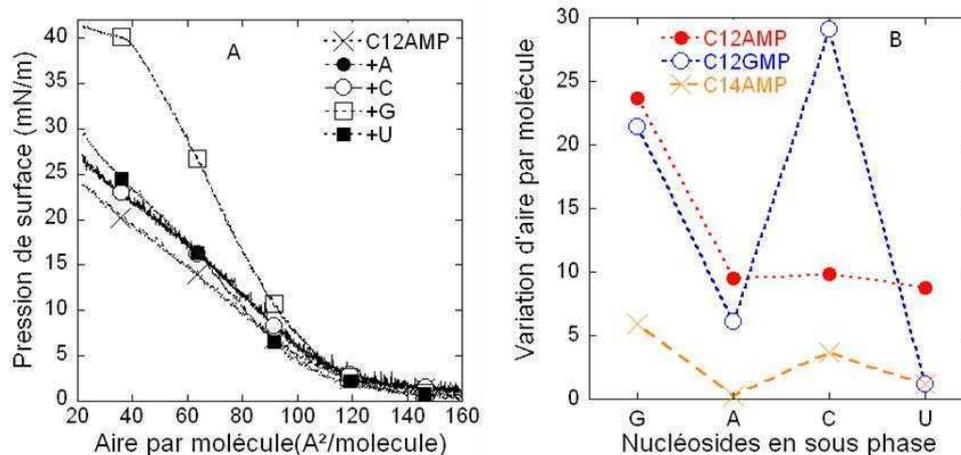
Dans le cas du tensioactif  $C_{14}AMP$ , très peu de variations sont observées en présence de nucléosides, mise à part une faible expansion en présence de G.



**Figure V-8 : Isothermes de Langmuir pression de surface – aire par molécule obtenus avec les tensioactifs  $C_{12}GMP$  (A) et  $C_{14}AMP$  (B) (concentration 0,5 mM) sur l'eau ultra pure et sur une sous phase contenant des nucléosides (1 mM). Alors que d'importantes variations sont observées en présence de  $C_{12}GMP$  et des nucléosides C et G, les isothermes obtenus avec  $C_{14}AMP$  varient peu.**

Afin de déterminer si les effets observés avec  $C_{12}GMP$  sur des sous phases contenant les nucléosides G ou C sont spécifiques du contre ion complexé ou simplement dus à la longueur des chaînes du tensioactif, le comportement du nucléo-amphiphile  $C_{12}AMP$  à l'interface air-eau a également été étudié (Figure V-9A).

$C_{12}AMP$  apparaît également trop soluble pour former une monocouche stable à l'interface air-eau, ainsi qu'en présence de A ou U en sous phase. En revanche, la présence de G permet de stabiliser le film. Cependant, dans ce cas, aucune stabilisation n'est observée en présence de C dans la sous phase. La stabilisation observée avec  $C_{12}GMP$  est donc spécifique du contre ion GMP.



**Figure V-9 : A : Isothermes pression de surface – aire par molécule obtenus avec le tensioactif  $C_{12}AMP$  (0,5 mM) sur l'eau ultra pure et sur une sous phase contenant des nucléosides (1 mM). La stabilisation de la monocouche n'est observée qu'en présence de G dans la sous phase. B : Variations d'aire par molécule mesurées à partir d'isothermes pression de surface–aire par molécule pour les nucléolipides  $C_{12}GMP$ ,  $C_{14}AMP$  et  $C_{12}AMP$  (0,5 mM) sur des sous phases d'eau et de nucléosides (1 mM).**

D'importantes variations sont observées en présence de G en sous-phase : stabilisation de la monocouche de  $C_{12}GMP$  et  $C_{12}AMP$ , et expansion dans le cas du système  $C_{14}AMP$ . Ces résultats ne peuvent pas être interprétés par l'intervention de G, en tant que base purique bicyclique, dans des interactions d'empilement. En effet, la compaction attendue de la monocouche n'est pas observée. Cependant, ce nucléoside est très hydrophobe, s'agrège facilement dans l'eau et a tendance à adopter un positionnement préférentiel à l'interface air-eau. Ce phénomène provoque ainsi une augmentation de l'aire par molécule ou la stabilisation de la monocouche, dans le cas d'un tensioactif trop soluble<sup>2</sup>.

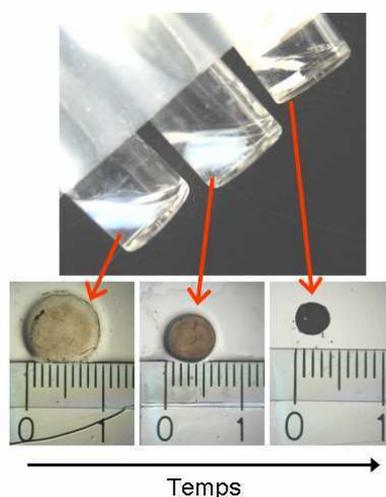
A l'inverse, C ne possède pas ce caractère hydrophobe. Il semble ainsi que la monocouche de  $C_{12}GMP$  soit stabilisée par la formation de liaisons hydrogène  $GMP - C$ . En effet, de telles interactions ne sont pas observées en présence de  $C_{12}AMP$  et  $C_{14}AMP$ . Enfin, aucune variation n'est observée en présence d'adénosine et d'uridine en sous phase. Ces nucléosides ne semblent pas interagir avec les nucléotides de la monocouche.

## 2.3 Etude morphologique

Suite à l'étude des interactions intermoléculaires, nous avons étudié le comportement et la morphologie d'agrégation de ces molécules à différentes échelles. Au cours de la précipitation de ces deux nucléo-amphiphiles, des aspects macroscopiques très différents sont observés. En parallèle, nous avons étudié la morphologie des agrégats formés par microscopie optique et électronique. Pour des raisons cinétiques qui seront expliquées par la suite, ces deux systèmes ont été étudiés à des concentrations différentes : 20 mM dans le cas de  $C_{12}GMP$  et 10 mM pour  $C_{14}AMP$ . Les nucléosides sont ajoutés à une concentration de 2 mM.

### 2.3.1 Précipitation des nucléo-amphiphiles dans l'eau

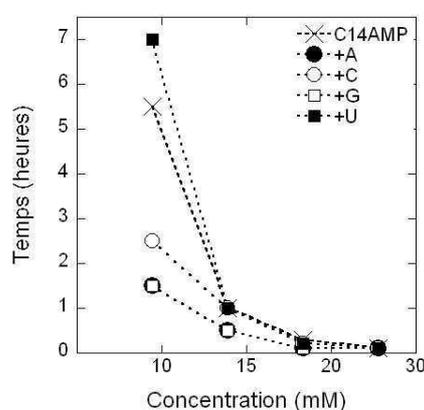
A des concentrations de 20 mM ( $C_{12}GMP$ ) et 10 mM ( $C_{14}AMP$ ), ces deux tensioactifs précipitent dans l'eau, suivant deux voies et deux cinétiques très différentes. Après solubilisation,  $C_{12}GMP$  forme un gel dont le diamètre, égal à celui du pilulier contenant l'échantillon, diminue avec le temps. Un disque de plus en plus petit est formé. L'eau est expulsée du gel, c'est le phénomène de synérèse (Figure V-10). La cinétique d'agrégation est suivie par la mesure du diamètre du gel.



**Figure V-10 : Photographies d'échantillons de  $C_{12}GMP$  (20 mM) dans l'eau présentant différentes étapes de synérèse du gel en fonction du temps (entre 7 et 10 jours après solubilisation).**

Ce comportement est également observé à une concentration de  $C_{12}GMP$  de 10 mM. Cependant, dans ce cas, la cinétique de formation du gel est de l'ordre de quelques semaines, alors qu'elle est de l'ordre de quelques jours à une concentration de 20 mM. Ceci explique le choix de la concentration utilisée pour l'étude de ce système.

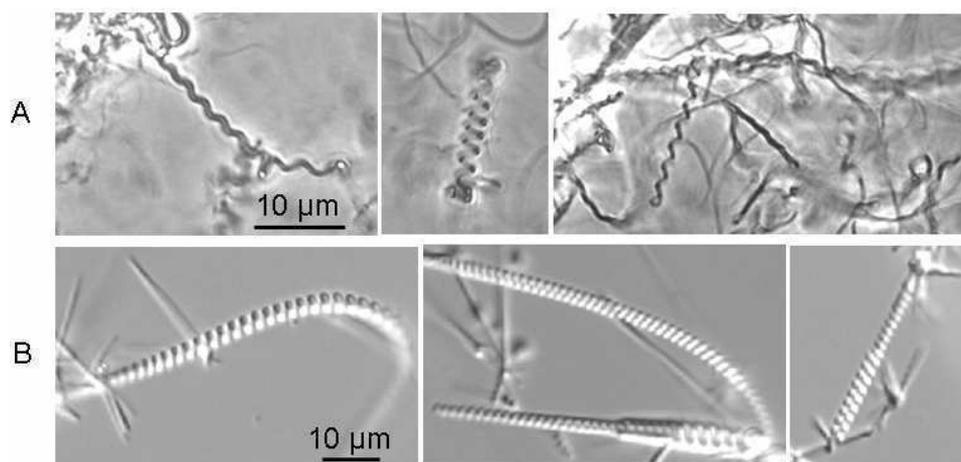
$C_{14}$ AMP précipite également dans l'eau : d'une solution limpide, il devient opaque puis forme un précipité dense. La cinétique de formation du précipité est de l'ordre de quelques heures à une concentration de 10 mM et est accélérée suite à une augmentation de la concentration : de l'ordre de l'heure à 15 mM et de quelques minutes au delà. Suite à l'addition de nucléosides, la cinétique de précipitation est modifiée. Ces variations sont d'autant plus remarquables que la concentration est faible. La Figure V-11 illustre le fait que la distinction entre les différents échantillons (eau et ajout de nucléosides) est frappante à une concentration de tensioactif de 10 mM, et atténuée au-delà (les nucléosides sont ajoutés à une concentration de 2 mM).



**Figure V-11 : Cinétique de précipitation de  $C_{14}$ AMP seul et en présence de nucléosides (2 mM) en fonction de la concentration en tensioactif. Les différences de comportement induites par l'addition de nucléosides deviennent difficiles à identifier au-delà d'une concentration en tensioactif de 10 mM.**

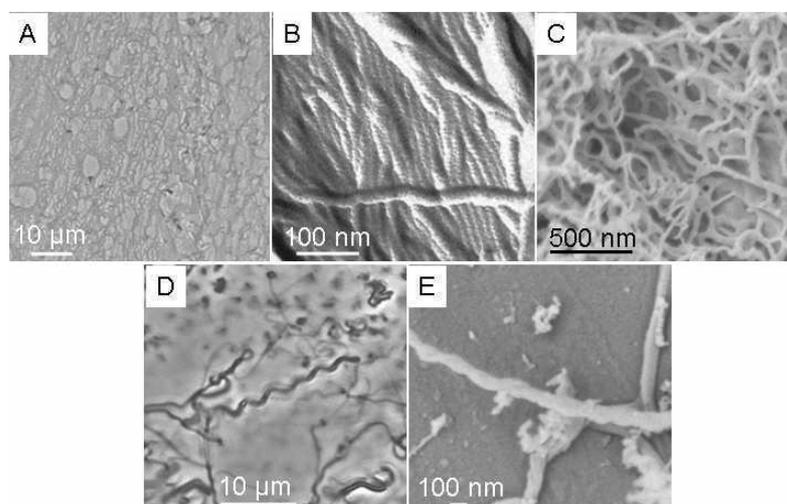
Pour cette raison, les systèmes  $C_{12}$ GMP et  $C_{14}$ AMP seront étudiés à des concentrations de 20 et 10 mM respectivement, dans l'eau ultra pure et en présence de 2 mM de nucléosides. Dans ces conditions, nos systèmes évoluent suivant une cinétique optimale pour le déroulement de nos expériences et présentent des comportements suffisamment distincts en présence de nucléosides pour être étudiés précisément.

L'étude par microscopie optique des précipités de  $C_{12}$ GMP et  $C_{14}$ AMP révèle la formation de structures hélicoïdales micrométriques (Figure V-12). Ceci représente un nouvel exemple de transfert de chiralité à partir d'une molécule amphiphile achirale. La chiralité du ribose porté par le nucléotide est exprimée à l'échelle supramoléculaire.



**Figure V-12 : Clichés de MO présentant la formation d'hélices à partir des tensioactifs C<sub>12</sub>GMP (20 mM) (A) et C<sub>14</sub>AMP (10 mM) (B). Pour chaque série de photographies, l'échelle indiquée est commune.**

D'un point de vue cinétique, ces deux amphiphiles suivent des voies d'agrégation différentes. La formation du gel de C<sub>12</sub>GMP débute avec l'organisation d'un réseau de fibres de 10 nm de diamètre observable par microscopie électronique en transmission (MET) (Figure V-13B) et à balayage (MEB) (Figure V-13C). Ces fibres semblent s'enrouler les unes avec les autres au cours du temps pour former des fibres chirales d'un diamètre d'une centaine de nanomètres, observables pas microscopie optique (MO) (Figure V-13D,E).



**Figure V-13 : Clichés de MO (A et D), MET (B) et MEB (C et E) présentant la formation de fibres chirales au cours de la formation d'un gel de C<sub>12</sub>GMP (20 mM) dans l'eau.**

L'agrégation du nucléo-amphiphile C<sub>14</sub>AMP débute quant à elle par la formation de fines aiguilles qui présentent une structure nanométrique chirale de type « cigare enroulé » (Figure V-14B,C). Ces aiguilles se transforment au cours du temps : la formation d'hélices micrométriques et de longues fibres est alors observée (Figure V-14D). Ces dernières ne

présentent pas de chiralité à l'échelle du micromètre. Cependant, les observations par MEB montre une chiralité à l'échelle nanométrique (Figure V-14E).

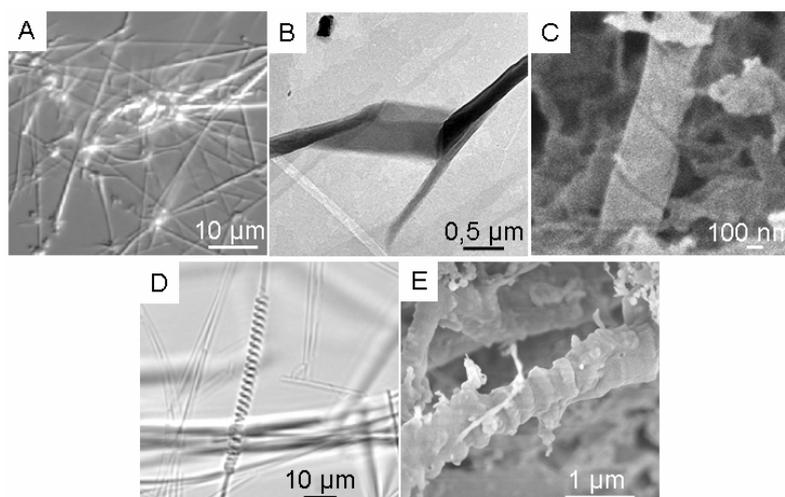


Figure V-14 : Clichés de MO (A et D), MET (B) et MEB (C et E) présentant la formation de fibres chirales au cours de la précipitation de C<sub>14</sub>AMP (10 mM) dans l'eau.

### 2.3.2 Précipitation des nucléo-amphiphiles en présence de nucléosides

Les deux systèmes présentent des variations de cinétique de précipitation en présence de nucléosides. Dans le cas de C<sub>12</sub>GMP, la transition de solution à gel n'est pas affectée. Les variations de cinétique concernent l'entrée en synérèse (Figure V-15A). Comme observé au cours de l'étude des interactions intermoléculaires, C induit l'effet le plus important. Dans ce cas, la synérèse débute 4 heures après solubilisation de l'échantillon, alors qu'elle démarre après 5 et 6 heures en présence des nucléosides A et G respectivement, et après un peu plus de 6 heures en absence de nucléosides. La présence d'uridine ralentit l'entrée en synérèse.

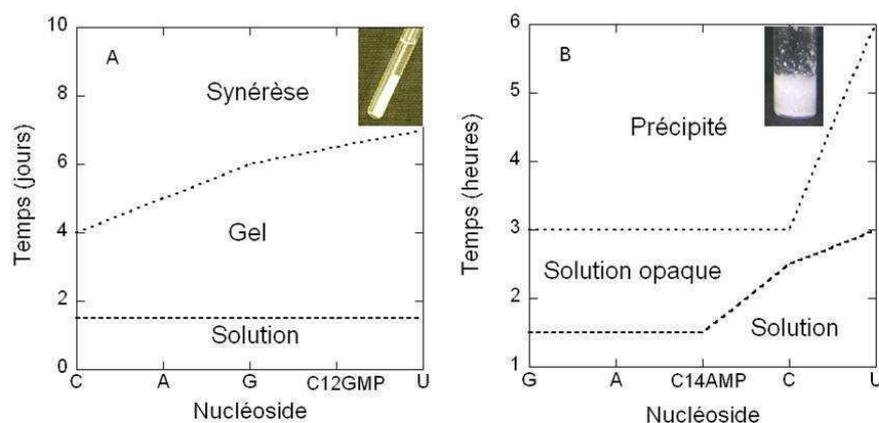
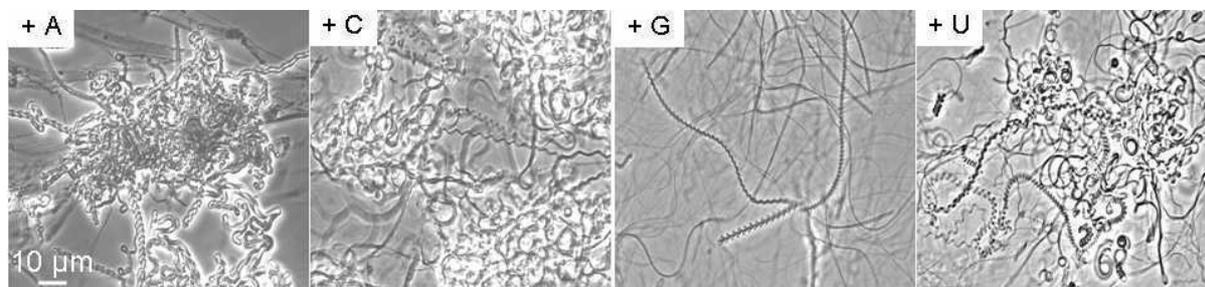


Figure V-15 : Cinétique de précipitation des nucléo-amphiphiles C<sub>12</sub>GMP (20 mM) (A) et C<sub>14</sub>AMP (10 mM) (B) dans l'eau et en présence de nucléosides (2 mM).

Les effets observés avec le système  $C_{14}AMP$  sont différents. Dans ce cas, la présence de G et A n'affecte en rien la cinétique de précipitation. En revanche, les nucléosides C et U provoquent un ralentissement de la formation du précipité.

Si la présence de nucléosides affecte les cinétiques de précipitation des deux systèmes de façon comparable, la cytidine se distingue à nouveau. Ce nucléoside présente un comportement spécifique du nucléotide complexé. En présence du nucléotide complémentaire GMP, C accélère la formation du gel alors qu'il ralentit la précipitation de  $C_{14}AMP$ .

Nous avons ensuite étudié l'aspect microscopique des précipités de nucléo-amphiphiles en présence de nucléosides. Les résultats obtenus par microscopie optique indiquent que la variation de cinétique s'accompagne de variations morphologiques plus ou moins marquées. En ce qui concerne le système  $C_{12}GMP$ , deux cas sont distingués. En présence des nucléosides A et C, un phénomène de nucléation est observé (Figure V-16). De gros amas, d'aspect très brillant en microscopie se forment, à partir desquels semblent pousser les fibres hélicoïdales. Au contraire, en présence de G et U, l'échantillon est beaucoup moins dense, et de tels noyaux ne sont pas observés.



**Figure V-16 : Clichés de MO présentant les auto-assemblages obtenus à partir de  $C_{12}GMP$  (20 mM) en présence de nucléosides (2 mM). Ces photos montrent la formation d'amas en présence d'adénosine (+ A) et de cytidine (+C). L'échelle est commune aux quatre photos.**

En ce qui concerne le système  $C_{14}AMP$ , l'addition de cytidine présente une morphologie particulière. Dans ce cas, les hélices ne se forment pas, seules de longues fibres sont observées (Figure V-17). Ceci représente le seul cas parmi ceux étudiés avec ces deux systèmes dans lequel la formation d'hélices n'a pas lieu. Les différences morphologiques entre les échantillons  $C_{14}AMP$  en présence de A, G et U sont plus subtiles. On notera cependant la formation d'hélices plus larges en présence d'uridine.

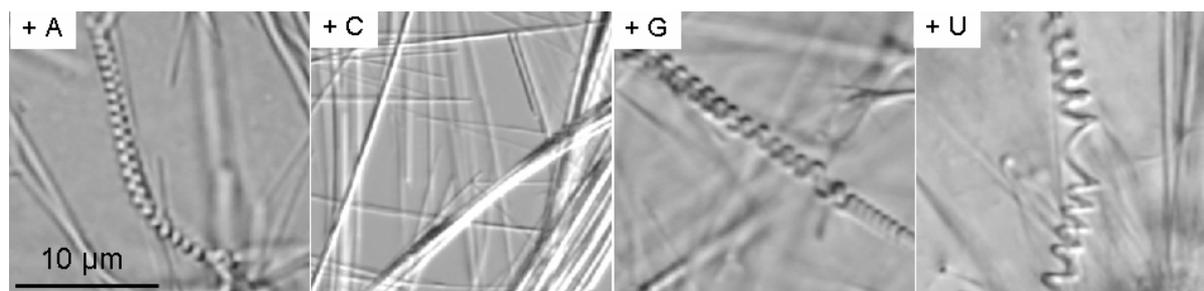


Figure V-17 : Clichés de microscopie optique présentant les auto assemblages obtenus à partir de  $C_{14}AMP$  (10 mM) en présence de nucléosides (2 mM). Seule l'addition de cytidine (+ C) ne permet pas la formation d'hélices micrométriques. L'échelle est commune aux quatre photos.

La Figure V-18 présente les profils de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) pour chaque système. En absence de nucléosides, des pics de Bragg sont observés dans les deux cas autour d'une valeur  $q = 0,15 \text{ \AA}^{-1}$ . Cette valeur correspond à une périodicité égale à  $2\pi/q = 42 \text{ \AA}$  et est attribuée à un empilement organisé de bicouches contenant peu de molécule d'eau.

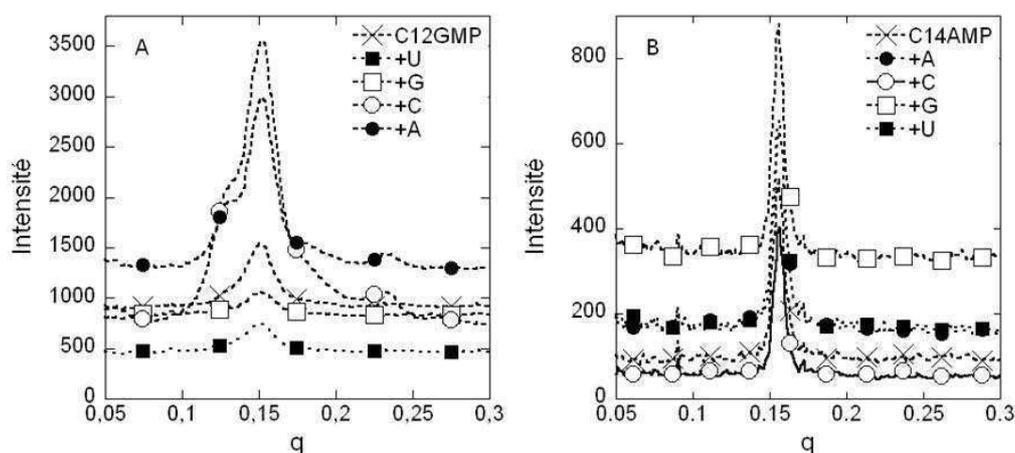


Figure V-18 : Profils de diffusion des rayons X obtenus par SAXS. (A) Au sein du système  $C_{12}GMP$  (20 mM) des variations de profil sont observées en présence de nucléosides (2 mM). Au contraire, aucune variation n'est observée dans le cas du tensioactif  $C_{14}AMP$  (10 mM) (B).

Dans le cas de  $C_{12}GMP$  dans l'eau, on observe un léger épaulement vers les petites valeurs de  $q$  (aux alentours de 0,125). Cet épaulement est amplifié en présence des nucléosides A et C, alors qu'aucun effet n'est observé en présence de G et U.

En ce qui concerne le système  $C_{14}AMP$ , aucune variation de profil n'est observée en présence de nucléosides. Les variations de morphologies observées précédemment ne sont pas illustrées par les profils de SAXS. Ceci est particulièrement surprenant dans le cas de l'échantillon  $C_{14}AMP + C$ . En effet, les clichés de MO présentés précédemment montrent dans ce cas l'absence d'hélices micrométriques.

## 2.4 Etude des interactions intermoléculaires par RMN

Afin d'établir un lien entre les études des interactions intermoléculaires (en solution et à l'interface air-eau) et les études morphologiques, nous avons étudié ces interactions en solution par RMN. Les conditions de concentration utilisées sont identiques à celles des études morphologiques ( $C_{12}GMP$  20 mM,  $C_{14}AMP$  10 mM, dans l'eau ultra pure ou dans une solution de nucléosides à 2 mM).

En ce qui concerne le comportement d'agrégation de  $C_{12}GMP$ , seul et en présence de nucléoside, une première observation est frappante à la vue des spectres présentés sur la Figure V-19. Les protons de la partie amphiphile (en rouge, aux alentours de 1-2 ppm) apparaissent avec une résolution extrêmement faible. Ceci est caractéristique d'un état fortement agrégé des amphiphiles. En revanche, les protons du contre ion, les protons de la base (en vert, aux alentours de 8 ppm) et du ribose (en bleu, particulièrement aux alentours de 6 ppm), apparaissent avec une bien meilleure résolution dans certains cas. C'est le cas par exemple des échantillons  $C_{12}GMP$  en présence d'adénosine et de cytidine. Leur mobilité est plus grande. La partie nucléique semble ainsi moins enfouie dans l'agrégat.

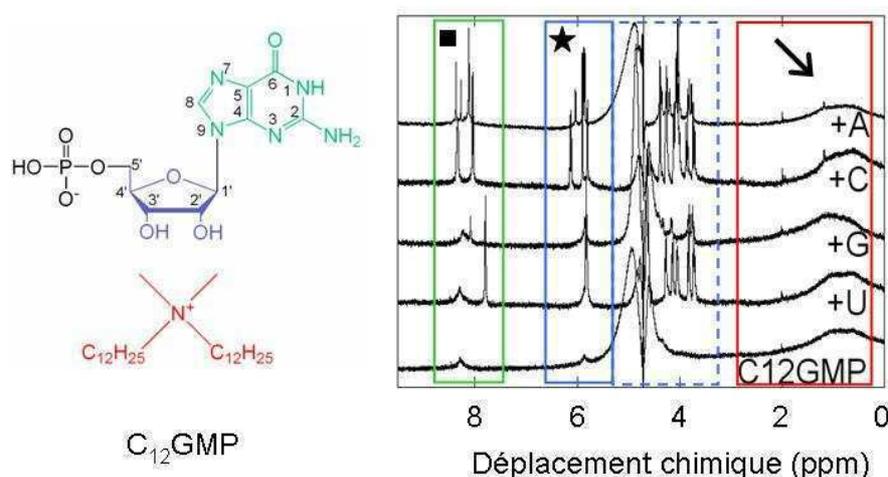
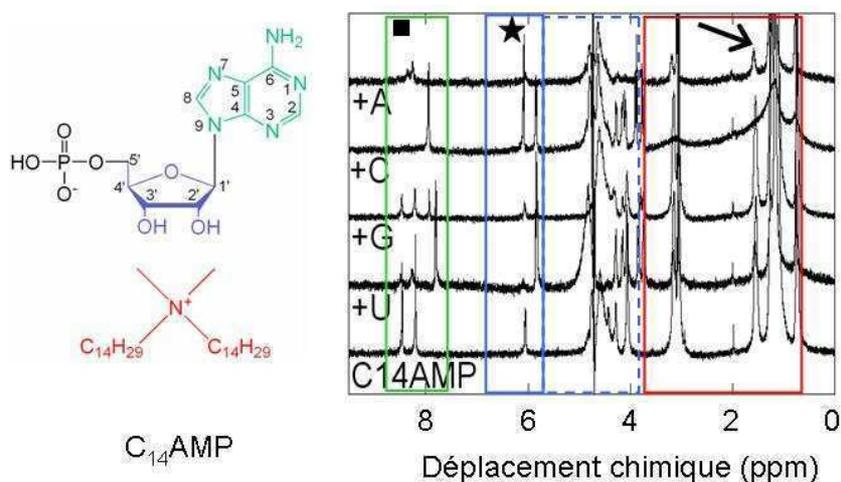


Figure V-19 : Spectres RMN  $^1H$  400 MHz obtenus avec l'amphiphile  $C_{12}GMP$  (20 mM) dans  $D_2O$ , seul et en présence de nucléosides (2 mM). Ces spectres indiquent clairement l'état agrégé des chaînes aliphatiques de la partie amphiphile (en rouge, aux alentours de 1-2 ppm).

$C_{14}$ AMP s'agrège suivant un mécanisme différent. En particulier, les protons de la partie amphiphile présentent une très bonne résolution (excepté dans le cas d'un ajout de C). Ceci traduit une plus grande mobilité des chaînes au sein de ce système (Figure V-20).



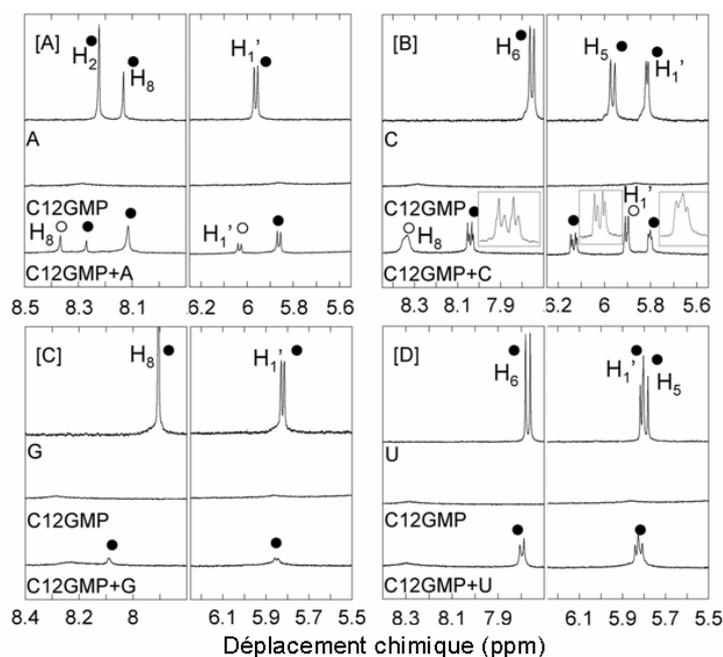
**Figure V-20 :** Spectres RMN  $^1\text{H}$  400 MHz obtenus avec l'amphiphile  $C_{14}$ AMP (10 mM) dans  $\text{D}_2\text{O}$ , seul et en présence de nucléosides (2 mM). Les chaînes aliphatiques présentent une mobilité importante.

Afin d'étudier ces interactions plus en détail, nous nous focaliserons sur certains des protons caractéristiques de la partie nucléique : les protons de la base (en vert, entre 7,7 et 8,5 ppm) et le proton en position 1' du ribose (trait plein bleu, entre 5,5 et 6,2 ppm). Dans chaque cas, nous comparerons les trois spectres :

- du nucléoside seul
- du tensioactif seul
- du tensioactif en présence du nucléoside.

En ce qui concerne le système  $C_{12}$ GMP, deux types de comportements sont observés (Figure V-21). En présence de G [C], et particulièrement de U [D], les pics caractéristiques du nucléoside sont observés (cercles noirs). Aucune variation de déplacement chimique n'est observée en présence de U alors que l'ajout de G déplace le proton H8 à champ faible de 0,3 ppm. La diminution d'intensité des pics résulte de l'environnement « solide » du gel, responsable de la diminution de la mobilité des nucléosides. L'importante insolubilité de la guanosine dans l'eau accentue cet effet<sup>a</sup>. Ces deux nucléosides ne semblent pas interagir avec le tensioactif.

<sup>a</sup> Les spectres des nucléosides ont été obtenus à  $t = 0$ , alors que les spectres des mélanges ont été fait à  $t = 5$  jours, ce qui explique la différence de solubilité et donc de résolution entre le spectre de la guanosine seule et en présence du nucléo-amphiphile.

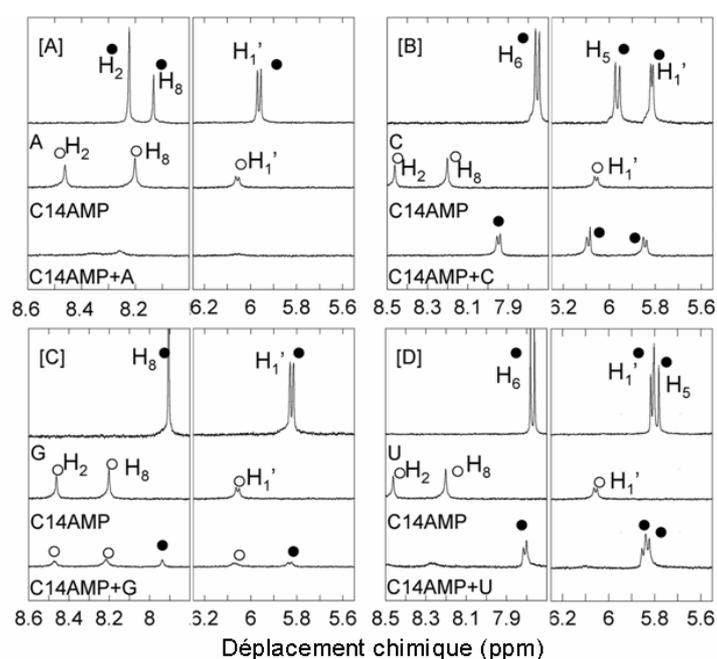


**Figure V-21** : Parties des spectres RMN  $^1\text{H}$  400 MHz correspondant aux régions des protons de la base nucléique (7,7-8,5 ppm) et du proton en position 1' du ribose (5,5-6,2 ppm). Dans chaque cas, trois spectres sont comparés : le nucléoside seul (2 mM), le tensioactif seul (C<sub>12</sub>GMP 20 mM), et en présence de nucléosides (2 mM) : [A] adénosine, [B] cytidine, [C] guanosine, et [D]uridine.

En présence des nucléosides A et C, le nombre de pics observés augmente. Si l'on retrouve les pics du nucléoside seul (cercles noirs), les pics observés à 8,35 et 6,05 ppm [A] et à 8,35 et 5,80 ppm [B] peuvent être attribués respectivement aux protons H<sub>8</sub> et H<sub>1'</sub> de l'amphiphile C<sub>12</sub>GMP (cercles blancs). Les nucléosides A et C interagissent avec GMP. L'interaction entre le contre ion et l'amphiphile devient plus faible, GMP apparaît moins enfoui dans l'agrégat.

Les déplacements chimiques observés en présence de A ne varient pas de façon significative en ce qui concerne les protons de la base alors que le pic du proton H<sub>1'</sub> du ribose est déplacé à champ fort de 0,1 ppm. Dans le cas de l'ajout de C, ce pic ne varie pas, contrairement aux pics caractéristiques des protons H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub>, déplacés à champ faible de 0,15 et 0,2 ppm respectivement. De plus, un dédoublement des signaux de la cytidine est observé suivant un rapport d'intégration 2 : 1. Ces deux jeux de pics peuvent être attribués à deux formes du nucléoside : une forme libre en solution et une forme en interaction avec C<sub>12</sub>GMP.

Les spectres RMN obtenus avec C<sub>14</sub>AMP sont très différents de ceux obtenus avec C<sub>12</sub>GMP. Les protons de la base du nucléotide complexé sont dans ce cas observables lorsque le tensioactif est seul (cercles blancs). Cependant, ces signaux sont considérablement élargis et de faibles intensités en présence de nucléosides. Ces effets sont plus ou moins marqués suivant l'ordre décroissant G > U ≥ A, jusqu'à disparition complète en présence de C. Les signaux des nucléosides sont également affectés (cercles noirs). Les pics caractéristiques de l'adénosine disparaissent [A], indiquant l'implication des nucléosides dans le processus d'agrégation, alors que la cytidine semble, au moins en partie, sous forme libre en solution [B]. Dans ce cas, le proton H<sub>6</sub> est déplacé à champ faible de 0,2 ppm.



**Figure V-22 : Parties des spectres RMN <sup>1</sup>H 400 MHz correspondant aux régions des protons de la base nucléique (7,7-8,5 ppm) et du proton en position 1' du ribose (5,5-6,2 ppm). Dans chaque cas, trois spectres sont comparés : le nucléoside seul (2 mM), le tensioactif seul (C<sub>14</sub>AMP 10 mM), et en présence de nucléosides (2 mM) : [A] adénosine, [B] cytidine, [C] guanosine, et [D] uridine.**

L'addition de guanosine [C] provoque une diminution des signaux des deux partenaires alors que les signaux caractéristiques de l'uridine [D] sont observés de façon distincte et ne présentent pas de variation de déplacements chimiques. L'uridine semble libre en solution.

Les résultats obtenus par RMN confirment les propriétés de l'uridine à interagir par de très faibles interactions avec les tensioactifs GMP et AMP. U semble principalement libre en solution. G présente une fraction soluble très faible qui n'interagit pas non plus de façon forte

avec les amphiphiles. A l'inverse, les nucléosides A et C semblent interagir avec chacun des contre ions complexés de façon spécifique. Les comportements observés varient avec la nature du nucléotide. Dans le cas de C<sub>14</sub>AMP, le signal du contre ion est distinctement observé dans l'eau, indiquant une certaine mobilité de l'AMP. Suite à l'ajout de nucléosides, ces signaux disparaissent : les nucléosides interagissent avec l'AMP et réduisent ainsi sa mobilité. A l'inverse, dans le cas de C<sub>12</sub>GMP, l'interaction observée en présence de nucléosides a pour effet de solubiliser le contre ion GMP. Dans les deux cas, l'adénosine semble complètement impliquée dans le processus d'agrégation alors que la cytidine est partiellement libre en solution.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différentes techniques pour étudier les interactions intermoléculaires mises en jeu au sein des systèmes C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP et caractériser les morphologies supramoléculaires de leurs auto-assemblages. Les résultats obtenus montrent que la présence de nucléosides perturbe ces comportements de façon complexe *via* des effets coopératifs impliquant les interactions d'empilement aromatique, l'hydrophobie des bases, et la formation de liaisons hydrogène (sans restriction aux interactions de type Watson-Crick). A la suite de ces expériences, nous distinguons deux types de comportements.

Les nucléosides G et U semblent induire les effets les plus faibles. Ceci semble résulter de deux caractéristiques opposées. La capacité d'agrégation de la guanosine induit la formation d'agrégats en solution ainsi qu'un positionnement préférentiel à l'interface air-eau responsables de sa non disponibilité à interagir avec le nucléotide complexé à l'amphiphile. L'uridine, particulièrement soluble à l'état monomérique, semble quant à elle engagée dans des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau et n'interagit pas non plus avec les nucléotides complexés. Le caractère plus ou moins hydrophobe du nucléoside ajouté semble donc être un paramètre clé de ces interactions.

Les cas d'addition d'adénosine et de cytidine sont plus complexes. Quelle que soit l'expérience considérée, ces deux nucléosides interagissent avec les tensioactifs présents. La cytidine présente les variations les plus importantes en ce qui concerne la cinétique et la morphologie d'auto-assemblage et est responsable de la stabilisation des monocouches de C<sub>12</sub>GMP à l'interface air-eau. De plus, autour des cmc des tensioactifs étudiés, C interagit avec les nucléotides GMP et AMP, provoquant la déshydratation des micelles. Etant donné que la cytidine possède une structure pyrimidique ne stabilisant pas particulièrement les

interactions d'empilement, il semble que ces interactions résultent principalement de la formation de liaisons hydrogène. Ceci est en accord avec le fait que les liaisons hydrogène A – C et G – C sont particulièrement stables. L'addition d'adénosine influence également le comportement des nucléolipides C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP. Autour de la cmc, les interactions observées semblent principalement contrôlées par les interactions d'empilement avec les nucléotides AMP et GMP ou par des effets hydrophobes avec l'amphiphile : aucune déshydratation des micelles n'est observée. Ceci est en accord avec les structures moléculaires bi cycliques de l'adénosine et des nucléotides GMP et AMP.

D'un point de vue supramoléculaire, la formation d'hélices est conservée suite à l'addition de nucléosides, excepté dans le cas du nucléolipide C<sub>14</sub>AMP en présence de cytidine : seules des aiguilles microscopiques sont observées.

Enfin, on observe que les différences de comportements d'auto-assemblage ne sont pas révélées au niveau des profils de SAXS.

### 3 Etude cinétique du transfert de chiralité

L'étude précédente montre la formation d'hélices micrométriques à partir de molécules amphiphiles non chirales complexées à des monomères de nucléotides. La chiralité supramoléculaire résulte de la présence de centres chiraux au sein de la structure moléculaire du ribose du nucléotide. Le précurseur de synthèse de ces nucléo-amphiphiles est composé du même tensioactif achiral complexé à un contre ion acétate également achiral. Il sera noté C<sub>n</sub>Ac. Dans l'eau, cet amphiphile s'auto-assemble sous forme de vésicules et ne présente pas de morphologies supramoléculaires chirales. Dans le but d'observer et de comprendre le transfert de chiralité de façon directe, nous avons suivi les variations moléculaires et supramoléculaires consécutives à l'acquisition de chiralité moléculaire (remplacement du contre ion acétate par un nucléotide chiral). Nous étudierons ainsi le système résultant de cet échange d'ion *in situ*  $C_{14}Ac + AMP \rightarrow C_{14}AMP$  (Figure V-23) que nous comparerons au système C<sub>14</sub>AMP obtenu comme décrit dans la partie expérimentale de ce chapitre.

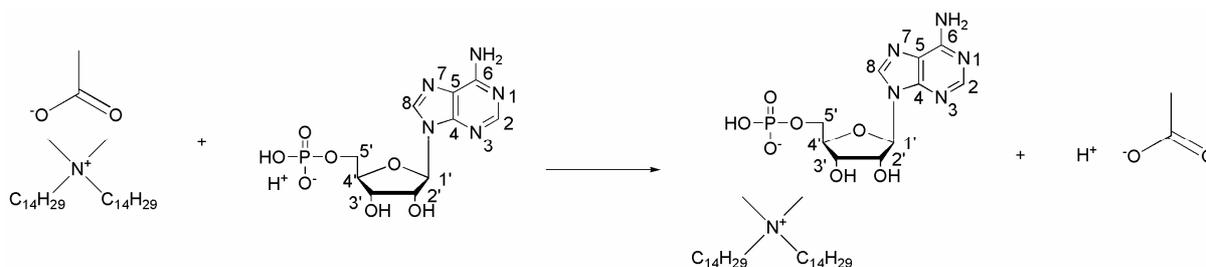


Figure V-23 : Structure moléculaire des systèmes étudiés : (A)  $C_{14}Ac$  + AMP, (B)  $C_{14}AMP$ .

La force motrice de cet échange d'ion réside dans la différence de pKa des deux contre ions. Le groupement phosphate de l'AMP possède un pKa inférieur à celui du groupement carboxylate de l'acétate (2, en ce qui concerne la première ionisation du groupement phosphate du nucléotide, contre 4,76). L'acétate est ainsi remplacé par l'AMP dans l'eau et est transformé en acide acétique. Ce travail a fait l'objet de la rédaction d'une publication<sup>3</sup>.

### 3.1 Etude morphologique

Dans l'eau, à une concentration de 15 mM,  $C_{14}Ac$  s'auto-assemble pour former des vésicules. L'addition d'AMP (à une concentration de 15 mM) induit la formation d'hélices micrométriques. La Figure V-24 présente les différentes étapes observées au cours de cette transition de structures.

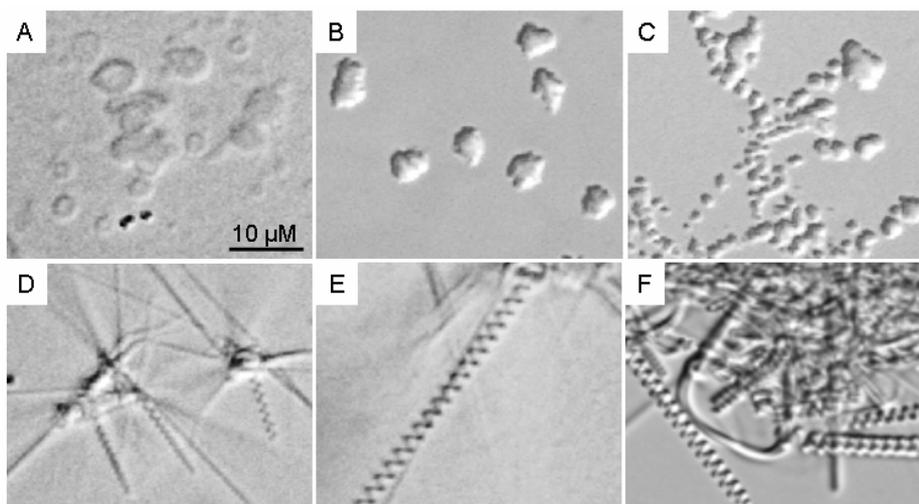
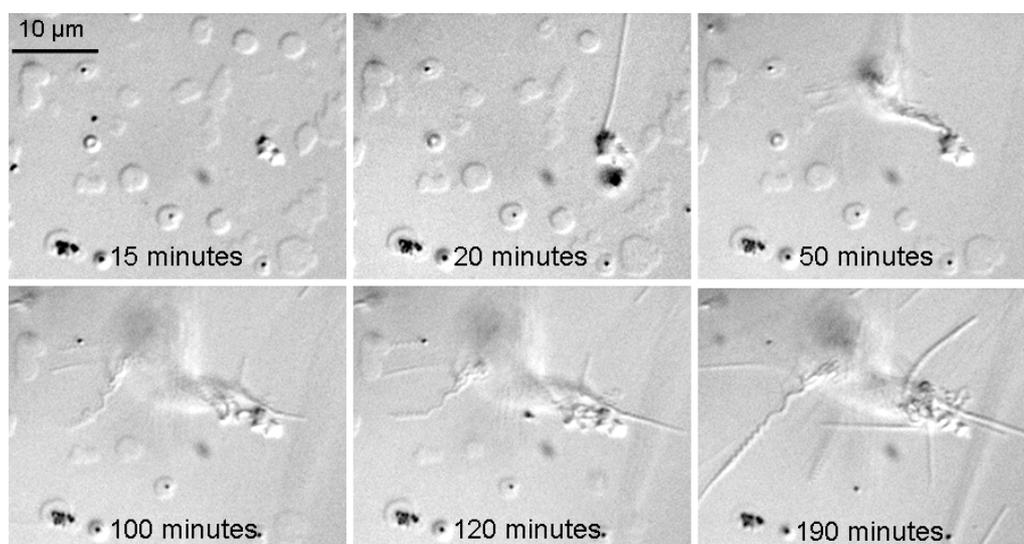


Figure V-24 : Clichés de MO présentant les différentes étapes observées au cours de la transformation de vésicules en hélices micrométriques suite à l'ajout d'AMP ( $C_{14}Ac$  15 mM + AMP 15 mM). L'échelle est commune aux six photographies.

Suite à l'addition d'AMP, les vésicules s'agrègent et coalescent en formant des amas qui semblent s'étaler en une arborescence complexe de forme indéterminée (Figure V-24A-C). De ces structures naissent des fibres qui acquièrent une chiralité au cours de leur extrusion des amas, quelques heures après mélange des précurseurs (Figure V-24D,E). La présence de fibres ne possédant pas de chiralité micrométrique apparente est également observée. La densité d'hélices augmente ensuite avec le temps, jusqu'à se stabiliser après une semaine. La Figure V-25 présente cette transition de morphologies en se focalisant sur un objet en particulier.



**Figure V-25 : Suivi cinétique de la transformation de vésicules en hélices par MO. L'échelle est commune aux six clichés.**

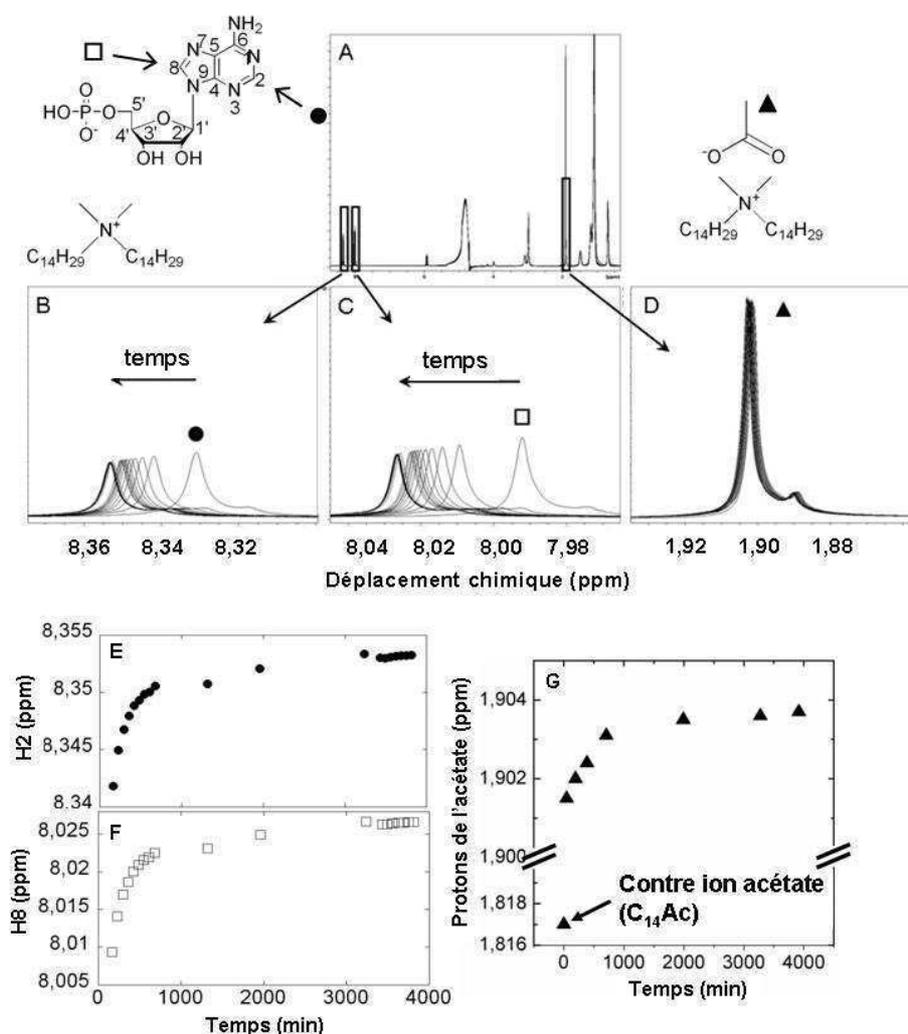
A la suite de cette caractérisation morphologique, nous nous sommes intéressés aux variations moléculaires ainsi qu'à leur cinétique au cours de cette transition.

### **3.2 Structure moléculaire et cinétique de formation des hélices**

D'un point de vue moléculaire, nous avons suivi les modifications qui apparaissent au cours de l'échange d'ion et de la formation des hélices, au sein d'un système  $C_{14}Ac$  : AMP (1:1), de concentration 15 mM. Dans ce but, nous avons utilisé deux techniques complémentaires : la RMN et la spectroscopie infrarouge (IR).

### 3.2.1 Etude par RMN

Les expériences de RMN  $^1\text{H}$  ont été réalisées grâce à l'aide d'Axelle Grélard, ingénieure à l'IECB, sur un spectromètre 500 MHz équipé d'une sonde adaptée à l'étude d'échantillons agrégés. Pour l'étude de la cinétique d'échange d'ion, nous nous focaliserons sur les pics des trois protons équivalents du groupement méthyle de l'acétate (et de l'acide acétique), aux alentours de 1,9 ppm (triangle noir, Figure V-26) et de la base nucléique, entre 7,98 et 8,03 ppm pour le proton H8 (carré blanc), et entre 8,32 et 8,36 ppm pour le proton H2 (cercle noir).



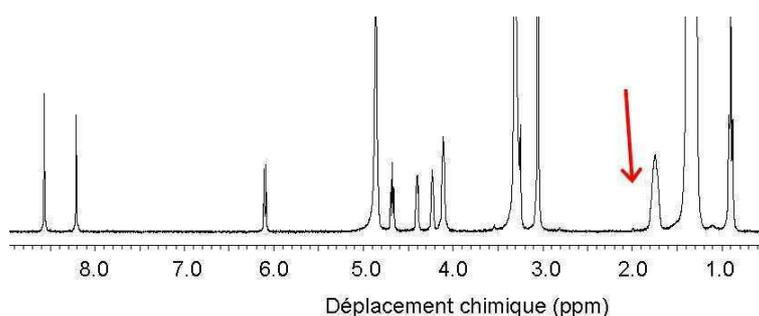
**Figure V-26 : Suivi cinétique de la variation des déplacements chimiques par RMN  $^1\text{H}$  500 MHz.**  
 (A) Spectre obtenu après mélange des espèces C<sub>14</sub>Ac (15 mM) et AMP (15 mM) dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (80/20, v:v).  
 Parties des spectres des protons H2 (B), H8 (C) et de l'acétate (D). (E, F, G) Graphiques présentant la cinétique de variation des déplacements chimiques des protons H2, H8 et de l'acétate respectivement.

Le premier spectre RMN obtenu après mélange des espèces  $C_{14}Ac$  et AMP montre l'absence des signaux caractéristiques de l'AMP sous forme acide et du contre ion acétate. Le signal observé à 1,9 ppm dans  $D_2O$  indique la présence d'acide acétique (le pic relatif à l'acétate montre un déplacement chimique de 1,8 ppm dans  $D_2O$ ). L'échange d'ion a déjà eu lieu au moment de la première acquisition. L'AMP remplace l'acétate de façon instantanée.

Les Figures V-26 D et G indiquent de très faibles variations de déplacement chimique du signal caractéristique de l'acide acétique. A l'inverse, les signaux de la base montrent des déplacements à champ faible de 0,02 ppm pour H2 et 0,035 ppm pour H8. Etant donné que l'échange d'ion a déjà eu lieu, ces variations sont associées à un changement d'environnement des protons des bases nucléiques confinées à la surface de la membrane cationique. Ces variations se stabilisent après environ 2 jours. Cette cinétique est en accord avec les observations faites précédemment par MO : à ce stade, les structures hélicoïdales dominent.

Il semble ainsi que les variations de déplacements chimiques des protons de l'AMP reflètent la transition morphologique de vésicules à hélices.

Suite à cette expérience, l'échantillon de  $C_{14}Ac + AMP$  a été lyophilisé. Sa caractérisation par RMN montre la disparition totale du pic associé au couple acétate/acide acétique (Figure V-27, flèche à 1,9 ppm). Ceci confirme le fait que la totalité de l'acétate s'est transformé en acide acétique volatil, éliminé lors de l'étape de lyophilisation.

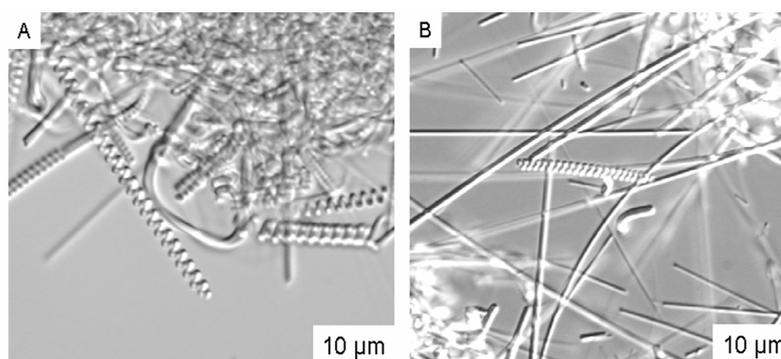


**Figure V-27 : Spectre RMN  $^1H$  300 MHz dans  $CD_3OD$  obtenu après lyophilisation d'un échantillon de  $C_{14}Ac + AMP$  (l'attribution des déplacements chimiques est reportée en partie expérimentale).**

Le spectre RMN  $^1H$  obtenu est identique à celui du  $C_{14}AMP$ . Nous avons par la suite comparé les deux systèmes  $C_{14}AMP$  suivants :

- le système synthétisé *in situ* (échange d'ion  $C_{14}Ac + AMP$  dans l'eau)
- le système préalablement synthétisé dans le méthanol (cf partie expérimentale), tel que présenté dans la première partie de ce chapitre.

Les observations de microscopie optique montrent une densité d'hélices et une homogénéité de morphologies plus importantes dans le cas du système  $C_{14}Ac+AMP$  (Figure V-28A) que dans le cas du système  $C_{14}AMP$  (Figure V-28B). La formation d'hélices est favorisée dans le premier cas. Cependant, nous avons montré que la composition moléculaire des deux systèmes est identique (Figure V-27). De cette façon, nous contrôlons la morphologie d'auto-assemblage *via* la cinétique d'échange d'ion.



**Figure V-28 : Clichés de microscopie optique présentant la densité d'hélices observée avec les échantillons  $C_{14}Ac+AMP$  15 mM (A) et  $C_{14}AMP$  15 mM (B) après 3 jours dans l'eau.**

Cette étude RMN a ensuite été complétée par une étude en spectroscopie vibrationnelle infrarouge (IR). Ce travail a été réalisé en collaboration avec Thierry Buffeteau, directeur de recherche à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux.

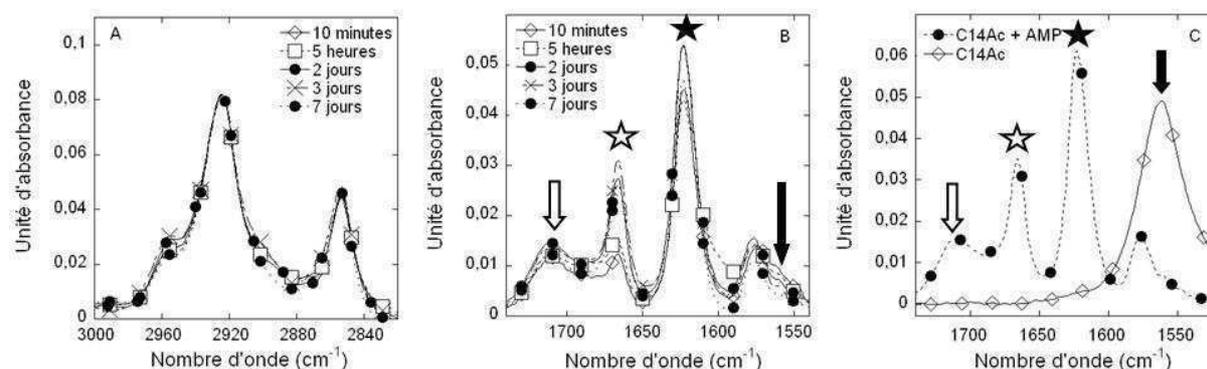
### 3.2.2 Etude par spectroscopie infrarouge

Nous nous intéresserons en particulier à deux zones de fréquences<sup>b</sup>. La première, entre 2820 et 3000  $cm^{-1}$ , est caractéristique de l'organisation des chaînes aliphatiques de l'amphiphile. La deuxième, entre 1540 et 1740  $cm^{-1}$ , présente deux jeux de bandes caractéristiques des contre ions complexés, l'acétate et l'AMP. La cinétique des variations spectroscopiques est suivie dans cette expérience pendant sept jours après solubilisation de l'échantillon.

<sup>b</sup> En infrarouge, nous parlerons indifféremment de *nombres d'ondes* ou de *fréquences*, ces deux grandeurs étant proportionnelles (le nombre d'onde correspond à la fréquence divisée par la vitesse de la lumière).

*Variations des propriétés spectrales d'absorption vibrationnelle des chaînes aliphatiques*

L'état plus ou moins organisé des chaînes hydrophobes peut être mis en évidence en observant les positions des vibrations antisymétriques ( $\nu_{as}$ ) et symétriques ( $\nu_s$ ) des méthylènes les constituant<sup>4</sup>, respectivement situées vers 2920 et 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Les valeurs observées ici, à 2924 et 2854  $\text{cm}^{-1}$  (Figure V-29A), montrent un niveau d'organisation faible des chaînes, caractéristique des phases fluides présentant un ordre globalement isotrope. D'un point de vue cinétique, aucune variation n'est observée : aucune réorganisation n'est mise en jeu au cours de la transition de morphologie de vésicules à hélices. Ce résultat est particulièrement intéressant étant donné que de telles transitions de structures sont généralement accompagnées d'une augmentation de conformations *trans* traduisant l'organisation des chaînes<sup>5,6</sup>. Ce changement de conformation se traduit par une diminution des nombres d'ondes associés aux vibrations  $\nu_{as}$  et  $\nu_s$   $\text{CH}_2$ .



**Figure V-29 : Suivi cinétique par spectroscopie IR des variations de fréquence et d'intensité des bandes d'absorption caractéristiques de l'organisation des chaînes aliphatiques (A) et des contre ions complexés (B). (C) : Comparaison des spectres IR obtenus avec les échantillons C<sub>14</sub>Ac (15 mM) et C<sub>14</sub>Ac + AMP (15 mM) dans la zone des contre ions.**

*Variations des propriétés spectrales d'absorption vibrationnelle du contre ion acétate*

Au cours de l'échange d'ion, l'acétate est transformé en acide acétique. Chaque espèce est caractérisée par une bande d'absorption propre, respectivement à 1570  $\text{cm}^{-1}$  (flèche noire Figure V-29B, C) et 1711  $\text{cm}^{-1}$  (flèche blanche). La Figure V-29C présente la comparaison de ce spectre à celui d'un échantillon de C<sub>14</sub>Ac obtenu à une concentration équivalente de 15 mM. La comparaison des Figures V-29B et C montre que suite à l'addition d'AMP la bande à 1570  $\text{cm}^{-1}$  (acétate) disparaît au profit de la bande d'absorption à 1711  $\text{cm}^{-1}$  (acide acétique). L'échange d'ion a déjà eu lieu 10 minutes après le mélange des espèces C<sub>14</sub>Ac et AMP (temps de préparation de l'échantillon et de la cellule d'analyse). Cette observation confirme la cinétique observée par RMN : l'AMP remplace l'acétate de façon instantanée.

Variations des propriétés spectrales d'absorption vibrationnelle du contre ion AMP

Les étoiles noires et blanches à 1623 et 1666  $\text{cm}^{-1}$  respectivement (Figure V-29B, C) représentent les bandes d'absorption attribuées à la base aromatique. Au cours du temps, on observe une diminution de l'intensité de la bande à 1623  $\text{cm}^{-1}$ , couplée à une augmentation de la bande à 1666  $\text{cm}^{-1}$  (Figure V-29B). Ces variations se stabilisent après 2 jours. L'origine de ces bandes d'absorption est associée à l'élongation des C=N des cycles de l'adénosine ( $\text{C}_{(2)}=\text{N}_{(3)}$ ,  $\text{C}_{(6)}=\text{N}_{(1)}$ ,  $\text{C}_{(8)}=\text{N}_{(7)}$ )<sup>7</sup>. Si ces bandes sont généralement attribuées aux formes non protonée (à 1623  $\text{cm}^{-1}$ ) et protonée (à 1666  $\text{cm}^{-1}$ ) de la base<sup>8</sup>, elles permettent également de suivre de façon directe la formation de structures supramoléculaires *via* la formation de liaisons hydrogène inter bases. Ce phénomène a récemment été reporté avec l'étude de systèmes constitués de polyAMP<sup>9</sup> : dans cet exemple, la bande d'absorption à 1666  $\text{cm}^{-1}$  se révèle être un marqueur de la formation de doubles hélices.

Les fractions soluble et précipitée obtenues 4 jours après le mélange des espèces  $\text{C}_{14}\text{Ac}$  et AMP ont été étudiées séparément. La Figure V-30A montre que la forte amplitude de la bande d'absorption à 1666  $\text{cm}^{-1}$  est associée à l'état agrégé de l'échantillon présentant les structures hélicoïdales. La fraction soluble présente une bande d'absorption à 1666  $\text{cm}^{-1}$  d'intensité faible. De plus, la mesure du pH de l'échantillon  $\text{C}_{14}\text{AMP} + \text{Ac}$  15 mM (d'une valeur de 4,7, cf Annexe 2, Tableau V-4) indique que les bases nucléiques sont dans une forme non protonée. L'augmentation d'amplitude de la bande d'absorption à 1666  $\text{cm}^{-1}$  semble ainsi associée à la formation d'hélices.

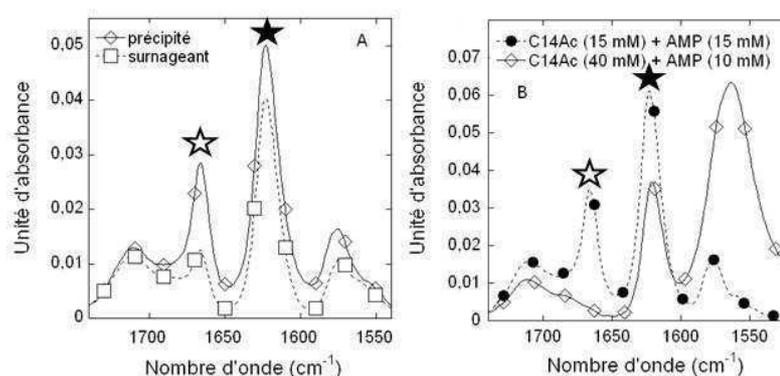
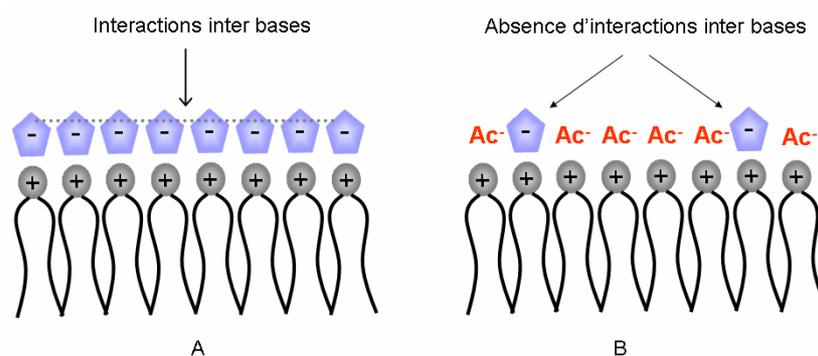


Figure V-30 : Comparaison des spectres IR obtenus avec les fractions précipitées et solubles de l'échantillon  $\text{C}_{14}\text{Ac} + \text{AMP}$  15 mM (A), et avec les échantillons  $\text{C}_{14}\text{Ac}$  (15 mM) + AMP (15 mM) et  $\text{C}_{14}\text{Ac}$  (40 mM) + AMP (10 mM) (B), dans la zone des contre ions.

Enfin, si le rapport  $C_{14}Ac$  : AMP est modifié (de 1 : 1 à 4 : 1), on observe la disparition complète de cette bande (étoile blanche, Figure V-30B). Ceci peut être interprété par le fait que les molécules d'AMP confinées à la surface des agrégats amphiphiles ne sont plus à proximité les uns des autres du fait de la présence du tensioactif  $C_{14}Ac$ . Ainsi, les interactions entre bases nucléiques sont empêchées. En parallèle, l'observation par microscopie optique de cet échantillon ne présente pas d'hélice.



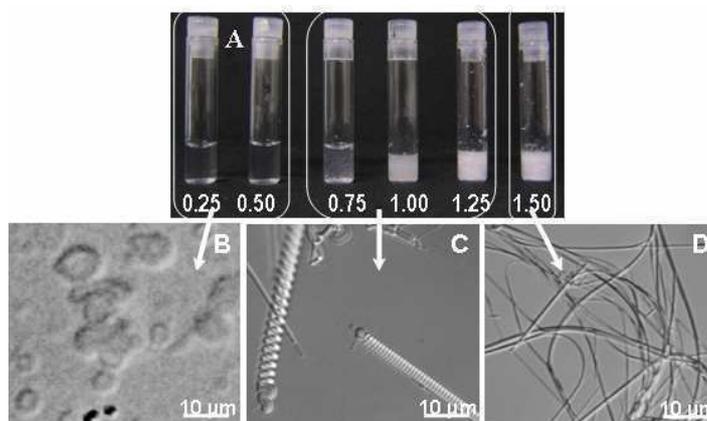
**Figure V-31 : Représentation schématique des interactions inter bases observées par spectroscopie IR lorsque les nucléotides sont à proximité les uns des autres ( $C_{14}Ac$  + AMP, 1 : 1) (A). Ces interactions ne sont plus observées en présence d'un excès d'amphiphile acétate ( $C_{14}Ac$  + AMP, 4 : 1) (B).**

Cette expérience montre l'importance des effets coopératifs d'auto-organisation des parties amphiphiles et nucléiques. Si l'acquisition des morphologies chirales observées n'impose pas de réorganisation moléculaire des chaînes aliphatiques, le confinement des bases qu'elles permettent est un élément clé pour l'induction d'interactions inter bases et la formation d'hélices. Enfin, les interactions d'empilement entre bases aromatiques sont traduites en IR par une diminution de l'intensité de la bande d'absorption à  $1623\text{ cm}^{-1}$ <sup>10</sup>. Si l'on observe une telle diminution dans notre cas, celle-ci semble compensée par l'augmentation d'intensité de la bande d'absorption à  $1666\text{ cm}^{-1}$ . Si les interactions d'empilement aromatique permettent une stabilisation de la structure, elles ne semblent pas être ici un facteur déterminant pour la formation des hélices.

L'apparition et l'augmentation d'intensité de la bande d'absorption observée à une fréquence de  $1666\text{ cm}^{-1}$  révèle la présence d'interactions entre les bases nucléiques et permet de suivre de façon directe la formation d'hélices micrométriques *via* la mise en place de liaisons hydrogène. L'accord des cinétiques obtenues par microscopie optique, RMN et IR montre une relation directe entre les modifications morphologiques (transition de vésicules à hélices) et les variations moléculaires identifiées au niveau des cycles aromatiques de l'AMP. Il apparaît ainsi que les modifications d'environnement des bases et la formation de liaisons hydrogène sont corrélées à l'apparition de structures hélicoïdales à l'échelle supramoléculaire.

### 3.3 Contrôle cinétique de la formation des hélices

La comparaison des morphologies obtenues avec les échantillons  $C_{14}AMP$  et  $C_{14}Ac+AMP$  montre qu'il est possible de contrôler le processus d'auto-assemblage et de favoriser la formation d'hélices par la cinétique d'échange d'ion. Une façon relativement simple de jouer sur la cinétique d'une réaction consiste à faire varier les proportions des produits de départ. En jouant sur le rapport des deux espèces AMP et  $C_{14}Ac$ , on observe une précipitation de l'échantillon d'autant plus rapide que le rapport AMP :  $C_{14}Ac$  est grand, c'est-à-dire que la formation de  $C_{14}AMP$  est favorisée. Dans la gamme de rapports AMP :  $C_{14}Ac$  étudiée, de 0,25 à 1,50, trois comportements se distinguent (Figure V-32A).



**Figure V-32 :** (A) Photographie des comportements d'agrégation observés, et clichés de MO obtenus pour des rapports AMP :  $C_{14}Ac$  inférieurs à 0,75 (B), compris entre 0,75 et 1,25 (C), et supérieurs à 1,25 (D).

- **AMP :  $C_{14}Ac$  est inférieur à 0,75 :** l'échantillon est soluble. L'observation par microscopie optique montre la présence de vésicules (Figure V-32B).
- **AMP :  $C_{14}Ac$  est compris entre 0,75 et 1,25 :** l'échantillon précipite, la formation d'hélices est observée en microscopie (Figure V-32C).
- **Au-delà de 1,25 :** l'échantillon présente un précipité très dense. Les hélices laissent la place à la formation de longues fibres sans chiralité microscopique apparente (Figure V-32D).

De cette façon, il est possible de contrôler la formation d'hélices micrométriques précisément.

Un des avantages de ce système réside dans la *facilité* de manipulation d'objets micrométriques. Différentes techniques permettant d'accrocher des objets de cette échelle de tailles ont été développées à ce jour, permettant leur manipulation sous un microscope optique. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer s'il était possible d'accrocher nos hélices

nucléo-amphiphiles, puis de les manipuler. Un des enjeux de cette étude réside dans le caractère dynamique de ces objets dont l'architecture n'est maintenue par aucune liaison covalente et résulte principalement de l'effet hydrophobe.

Les expériences présentées dans le dernier paragraphe de ce chapitre ont été possibles grâce à Damien Van Effenterre, chercheur au Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP) à Bordeaux, qui nous a assuré un accès aux dispositifs adaptés et nous a permis d'aborder dans les meilleures conditions la micromanipulation.

## **4 Micromanipulation d'hélices nucléo-amphiphiles**

### **4.1 Les mesures de forces en biologie.**

Depuis les vingt dernières années, les mesures de force à l'échelle du piconewton (de l'ordre des forces d'interaction entre deux molécules) ont été révolutionnées par l'apparition de nouveaux instruments issus pour la plupart de la physique. De nombreuses techniques ont été développées, parmi lesquelles nous pouvons citer les pinces optiques et magnétiques, la machine de force, la microscopie à force atomique, ainsi que la micromanipulation utilisant un système de micropipettes. Les mesures de forces utilisant des micropipettes reposent sur le même principe que la microscopie à force atomique : la déflexion d'un objet de constante de ressort connue est mesurée. Cette technique présente plusieurs avantages puisqu'elle permet d'ajuster les constantes de ressort des pipettes pour mesurer des gammes de forces variables, de fonctionnaliser les pipettes, ainsi que d'adapter facilement le montage aux besoins de l'expérience. Enfin, cette technique est relativement simple et peu onéreuse à mettre en place.

La micromanipulation utilisant un système de micropipettes s'est révélée particulièrement adaptée à l'étude de matériel biologique. Par exemple, la structure des chromosomes à différentes étapes de la mitose a été étudiée dans le but d'obtenir des informations quantitatives sur leur élasticité et leur déformabilité<sup>11, 12</sup>. Des études supplémentaires ont par la suite permis d'évaluer le nombre de protéines histones en interaction avec les chromosomes, ainsi que la force d'interaction entre ces partenaires<sup>13</sup>. Dans le domaine des colloïdes, la technique d'aspiration utilisant des micropipettes développée par Evans<sup>14</sup> a été exploitée pour l'étude des interactions faibles au sein des

membranes, dans le contexte de vésicules. Les propriétés mécaniques de ces membranes modèles, notamment leur élasticité et leur rigidité ont été testées en présence de différents partenaires, tels que l'ion calcium<sup>15</sup> ou la molécule amphiphile salicylate<sup>16</sup>.

Dans un contexte différent, Pincet a mesuré les énergies d'adhésion entre une vésicule lipidique et une bille de polymère fonctionnalisée. Chaque partenaire est coiffé de nucléosides (adénosine ou thymine). L'étude des différentes configurations bille - vésicule (A - A ; T - T ; A -T) a ainsi permis d'évaluer les contributions spécifiques et non spécifiques dans les phénomènes d'adhésion observés<sup>17</sup>. Enfin, la transition de morphologies induite mécaniquement a également été reportée au sein de systèmes composés de tensioactifs s'auto-assemblant en fibres hélicoïdales<sup>18</sup>.

## 4.2 Matériel et méthode

### 4.2.1 Montage expérimental

Sous un microscope optique inversé est disposée une chambre en verre contenant l'échantillon. Deux micromanipulateurs fixés sur la platine sont disposés de chaque côté du microscope. Chaque micromanipulateur tient une micropipette qui pénètre dans la chambre (Figure V-33). Les micropipettes permettent de saisir un objet par aspiration grâce à un dispositif de régulation de pression équipé de seringues, connecté avec l'intérieur de chaque micropipette.

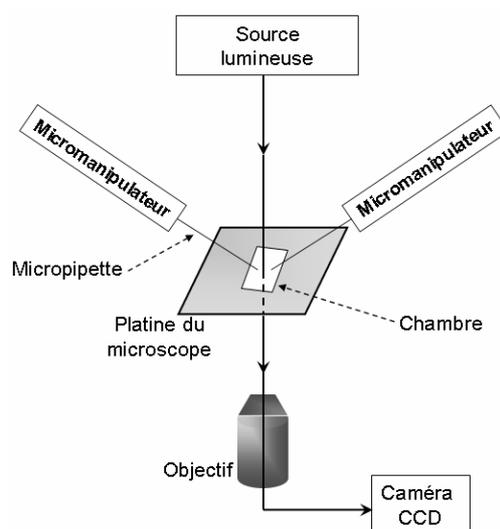


Figure V-33 : Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour les expériences de micromanipulation utilisant des micropipettes.

## 4.2.2 Fabrication des micropipettes

La fabrication des micropipettes nécessite l'utilisation d'une étireuse de pipette. Un capillaire en verre de diamètre 1 mm est fixé à deux rails indépendants. Chaque rail exerce une force dans le sens opposé à celui de l'autre rail dans le but d'étirer le capillaire. La présence d'un filament métallique, parcouru par un courant provoquant son échauffement, permet la fonte du capillaire. Les deux rails tirent sur le capillaire devenu malléable entraînant son allongement et son affinement jusqu'à rupture du capillaire en deux parties : les deux micropipettes.

La fabrication des micropipettes représente une étape primordiale pour ces expériences, tant d'un point de vue de la géométrie des micropipettes que de leur reproductibilité en terme de propriétés mécaniques. Classiquement, deux micropipettes différentes sont fabriquées et utilisées conjointement :

- une pipette dite « dure » : cette pipette va se déplacer au cours de l'expérience et ainsi contraindre l'objet isolé. De par sa constante de ressort élevée, elle ne défléchira quasiment pas au cours de l'étirement.
- une pipette dite « souple » : aucun mouvement ne lui est appliqué par l'opérateur au cours de l'étirement. Seule la force appliquée sur l'objet isolé impose sa déflexion (d'autant plus importante que la micropipette est souple).

## 4.3 Résultats

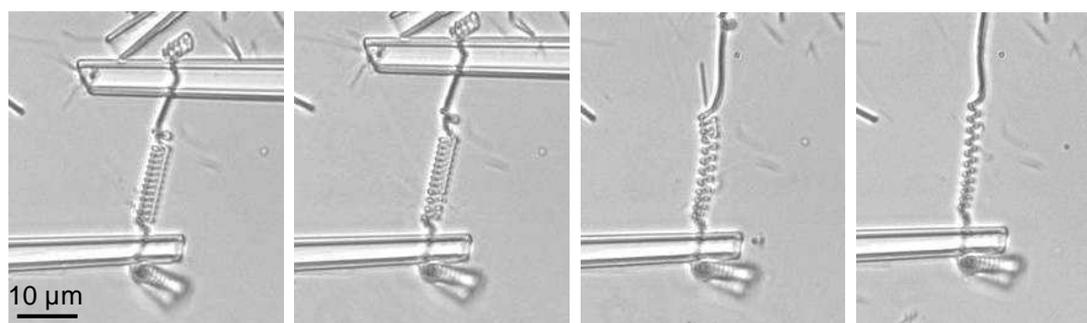
Suite à l'étude du contrôle cinétique de la formation d'hélices, nous nous sommes concentrés sur la micromanipulation des hélices obtenues avec le système C<sub>14</sub>Ac (15 mM) + AMP (15 mM). En effet, la densité d'hélices étant contrôlée et supérieure à celle obtenue à partir de l'amphiphile C<sub>14</sub>AMP, cet échantillon apparaît mieux adapté à cette étude.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir s'il était possible de manipuler nos objets. Etant donné la nature des liaisons faibles assurant l'auto-assemblage des hélices micrométriques, il est essentiel de tester leur cohésion sous une contrainte mécanique.

Dans ces expériences, les micropipettes ne sont pas utilisées comme sondes calibrées pour des mesures quantitatives, mais permettent simplement la manipulation des objets. Au cours des expériences réalisées, les hélices sont maintenues par une extrémité contre le

plancher de la chambre. De cette façon, il est possible d'insérer la seconde micropipette à différents endroits de l'hélice et d'étirer l'hélice ainsi fixée. Ce résultat montre la possibilité d'étirer des objets en plusieurs points, ces objets résultant de l'auto-assemblage de complexes électrostatiques maintenus principalement par l'effet hydrophobe. Aucune interaction covalente entre les nucléo-amphiphiles n'intervient dans la formation de telles structures. Ces expériences montrent différents comportements.

- S'il est possible d'étirer relativement facilement la majorité des hélices, certaines présentent une rigidité importante et ne peuvent être manipulées.
- Cependant, toutes permettent l'insertion de la micropipette quel que soit l'endroit choisi au sein de l'hélice : une distorsion s'opère et l'hélice s'enroule à nouveau autour de la pipette après insertion entre 2 tours d'hélice.
- Toutes les hélices étirables procèdent en un déroulement séquentiel, soit par déroulement successif de chacun des anneaux à partir d'une extrémité de l'hélice, soit en deux étapes : déchaussement anneau par anneau puis élongation (Figure V-34).



**Figure V-34 : Clichés de microscopie optique présentant une séquence d'étirement d'une hélice obtenue avec le système C<sub>14</sub>Ac (15 mM) + AMP (15 mM). L'échelle est commune aux quatre photos.**

- Cette élongation est réversible. Si l'on diminue la contrainte exercée, l'hélice se rembobine sur elle-même. Cependant, au-delà d'un certain seuil qu'il reste à déterminer, l'hélice rompt.
- Enfin, si l'on exerce une force de compression sur l'hélice, aucune déstructuration irréversible n'est observée : l'hélice est comprimée puis récupère sa forme initiale lorsque cesse la force exercée, tel un ressort.

En vue de pouvoir à moyen terme mesurer les propriétés mécaniques de nos systèmes, nous avons mené en parallèle, une étude d'optimisation de la fabrication des micropipettes. Cette étude, reportée en Annexe V-3, présente les programmes que nous avons mis en place pour l'obtention de micropipettes droites et reproductibles. Cependant, l'approfondissement de ce travail est nécessaire afin d'optimiser le diamètre des pipettes.

Ce travail, démarré récemment, ne permet pas à l'heure actuelle de donner d'informations quantitatives quant aux propriétés mécaniques des hélices nucléo-amphiphiles. Cependant, il ouvre de nombreuses perspectives dans ce domaine, peu développé au sein de notre laboratoire. Dans un premier temps, la multiplication d'expériences permettra d'obtenir des informations précises sur le comportement d'élongation de ces objets. Par la suite, après l'approfondissement du travail de fabrication des micropipettes, des mesures quantitatives pourront être réalisées à partir de la constante de ressort des micropipettes et de la mesure de leur déplacement.

Enfin, il semble également intéressant de modifier la stratégie de fixation des hélices en vue d'empêcher le glissement des objets et ainsi permettre une mesure de la raideur des hélices. L'utilisation de l'interaction forte et spécifique streptavidine – biotine peut être exploitée dans ce but.

## Conclusion et perspectives

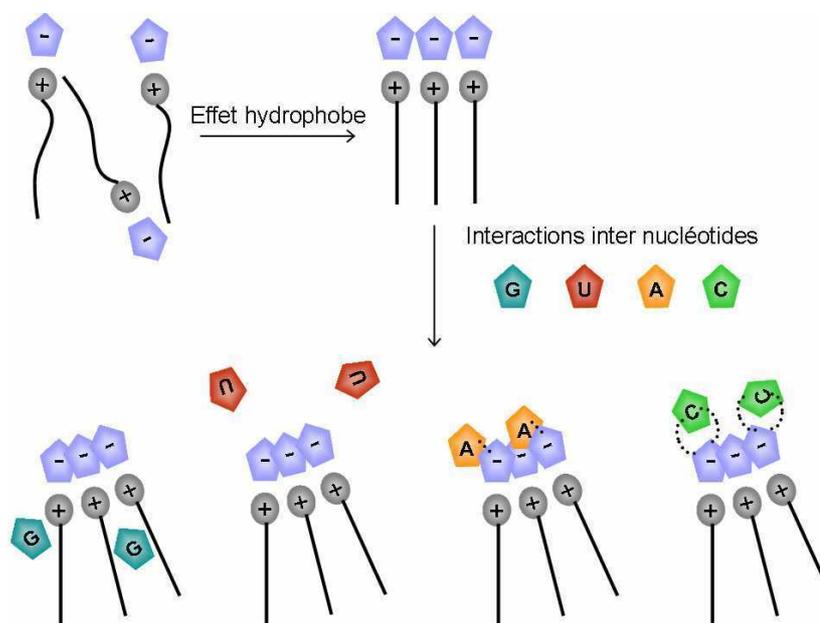
La diversité des systèmes nucléo-amphiphiles développés au sein de notre laboratoire permet d'explorer différents aspects des auto-assemblages obtenus à partir de nucléotides : d'une part les interactions moléculaires mises en jeu, résultant à la fois des propriétés moléculaires de l'amphiphile, des nucléotides complexés, ainsi que des nucléosides présents dans l'échantillon. D'autre part, les propriétés de chacune des entités de ces molécules hybrides ont pu être exploitées pour la conception de morphologies supramoléculaires originales. De plus, nous avons montré qu'il est possible de contrôler finement les morphologies d'auto-assemblage en jouant sur la cinétique de complexation du tensioactif cationique avec son contre anion nucléotidique.

En ce qui concerne les interactions moléculaires mises en jeu au sein de ces systèmes, il apparaît clairement qu'elles résultent de phénomènes coopératifs complexes mettant en jeu les propriétés moléculaires de l'amphiphile choisi (effet hydrophobe, répulsion électrostatique). Le phénomène d'auto-assemblage amphiphile, dont la principale force motrice est l'effet hydrophobe, permet de confiner les nucléotides à la surface des membranes cationiques pour induire des interactions entre bases nucléiques, telles qu'observées au sein des acides nucléiques. Ces interactions résultent de la capacité des nucléotides et nucléosides à interagir par des liaisons faibles (empilement aromatique, liaisons hydrogène), et des propriétés propres de chaque entité (hydrophobie par exemple).

De par son fort caractère hydrophobe, la guanosine n'interagit pas avec les nucléotides complexés et semble intervenir dans les phénomènes d'auto-assemblage par des interactions avec les chaînes hydrophobes de la partie amphiphile (Figure V-35). A l'inverse, la forte solubilité de l'uridine est responsable de l'absence d'interaction observée, quel que soit le nucléo-amphiphile.

En présence de nucléosides présentant des solubilités intermédiaires dans l'eau, tels que l'adénosine et la cytidine, il est possible d'évaluer les contributions d'empilement aromatique et de liaisons hydrogène. L'adénosine semble ainsi interagir majoritairement par empilement aromatique, et ce d'autant plus que le nucléotide complexé possède une base purique. En revanche, la cytidine semble interagir préférentiellement par liaisons hydrogène,

d'autant plus fortement que le nucléotide complexé possède une base présentant une forte affinité de liaisons hydrogène avec C.

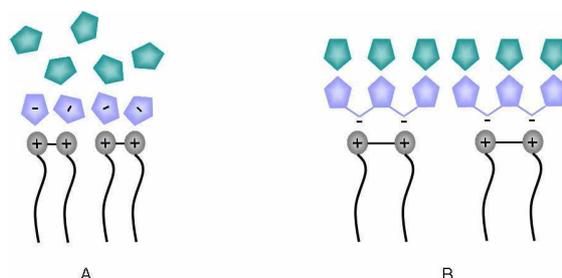


**Figure V-35 : Représentation schématique des phénomènes coopératifs responsables des interactions intermoléculaires observées précédemment et de l'auto-assemblage des nucléo-amphiphiles étudiés.**

D'un point de vue morphologique, nous avons observé la formation d'hélices nano et micrométriques à partir de tensioactifs complexés soit à GMP, soit à AMP. Partant d'un amphiphile achiral, ceci représente deux nouveaux exemples de transfert de chiralité *via* le contre ion, de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire. La chiralité du ribose porté par le nucléotide s'exprime aux échelles nano et micrométriques. De plus, l'obtention de telles structures d'une taille de l'ordre du micromètre ouvre la voie vers de nouvelles caractérisations et de nouvelles applications. Un travail important reste à mener en ce qui concerne la micromanipulation de ces objets, qui s'est révélée particulièrement stimulante et fructueuse lors des expériences préliminaires.

Cependant, d'un point de vue de la reconnaissance moléculaire, il semble ici que le confinement des nucléotides à la surface des agrégats ne représente pas une contrainte suffisamment forte pour mimer la structure polymérique des acides nucléiques naturels. En effet, les résultats présentés dans ce chapitre montrent une spécificité dépendante du nucléoside ajouté, et non du nucléo-amphiphile. Dans le but d'induire des interactions plus spécifiques (c'est-à-dire également dépendantes du nucléotide complexé), nous avons élaboré

un nouveau système nucléo-amphiphile. La stratégie d'optimisation que nous avons adoptée consiste en la complexation non plus de monomères mais de petits oligomères. De cette façon, nous visons à fixer de façon plus rigide l'orientation des nucléotides complexés (Figure V-36). Dans ce cadre, nous avons synthétisé des gemini (dicationiques) complexés à des trimères de nucléotides.



**Figure V-36 : Représentation schématique des systèmes gemini-monomère (A) et gemini-trimère (B) illustrant l'augmentation de contraintes conformationnelles par l'utilisation de trimères, permettant de fixer l'orientation des nucléotides à la surface des agrégats amphiphiles.**

Au sein de ce trimère, les monomères sont reliés par des liaisons phosphodiester identiques à celles des acides nucléiques naturels. Un trimère de nucléotide porte deux charges anioniques sur les phosphates des deux liaisons phosphodiester.

### Résultats préliminaires

La synthèse des trimères de nucléotides a été réalisée par la méthode à la phosphoramidite en phase liquide<sup>19</sup> dans notre laboratoire par Jin Nishida au cours de son stage postdoctoral. Les monomères utilisés pour la synthèse des trimères sont des désoxyribonucléotides. Ils permettent une synthèse de trimères plus aisée que dans le cas d'équivalents ribonucléiques, étant donné l'absence d'un groupement réactif (-OH) en position 2' du sucre (le protocole de synthèse présentant un groupement de moins à protéger). Les nucléotides utilisés pour la synthèse de trimères sont les quatre désoxyribonucléotides dAMP, dCMP, dGMP et dTMP (Figure V-41).

A l'issue de la synthèse, l'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure V-37) de chacun des trimères a montré la présence d'impuretés:

- signaux, notamment dans la région des protons de la base (flèches dans la zone comprise entre 7,5 et 8,5 ppm)
- pics à 2,8 et 3,2 ppm dont l'attribution n'a pu être faite.

Plusieurs lavages dans différents solvants n'ont pas permis d'éliminer ces impuretés présentes en quantités significatives.

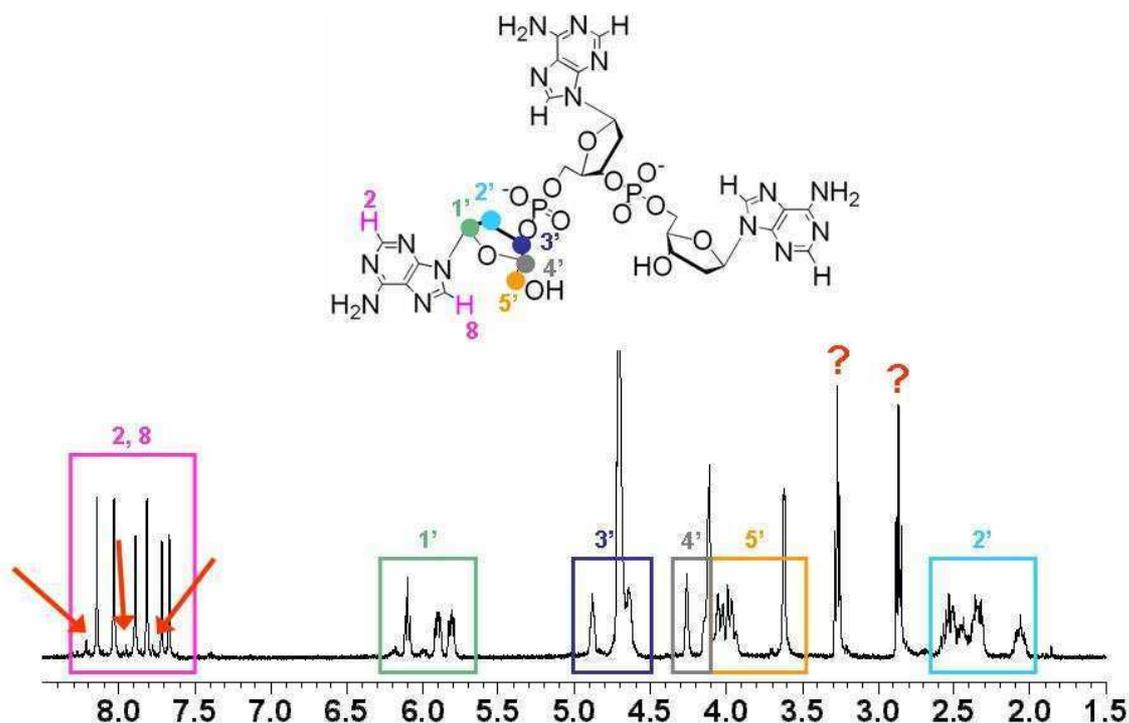


Figure V-37 : Spectre  $^1\text{H}$  400 MHz du trimère de désoxyadénosine (tridAMP) après synthèse.

Les pics présents à 2,8 et 3,2 ppm ont été observés avec tous les trimères synthétisés. Nous avons choisi de caractériser cette impureté dans le cas du trimère de désoxyadénosine, que l'on notera tridAMP. Deux hypothèses peuvent être envisagées concernant leur nature : il peut s'agir de contaminations extérieures, ou d'un sous-produit des étapes précédentes (suite à une déprotection partielle par exemple). Etant donné que les spectres de chaque trimère présentent ces pics, il est probable que ces molécules proviennent des étapes de synthèse précédentes. Différentes expériences de RMN ont été effectuées, dont la RMN du carbone ( $^{13}\text{C}$ ). La symétrie, la multiplicité et les déplacements chimiques des deux pics à 2,8 et 3,2 ppm en RMN  $^1\text{H}$  et des pics à 16,1, 35,7 et 118,0 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$  indiquent la présence d'une structure de type  $\text{CN}-(\text{CH}_2)_2\text{-R}$  (Figure V-38A). Cette hypothèse est confortée par la présence de tels groupements lors de l'étape de protection du trimère (Figure V-38B).

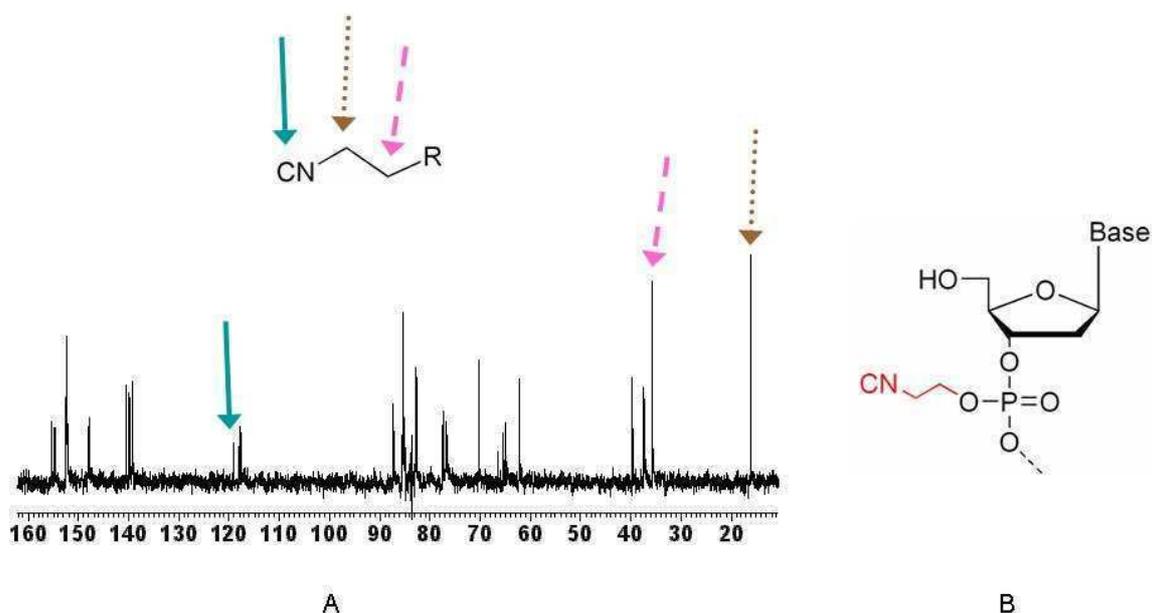


Figure V-38 : Spectre <sup>13</sup>C 400 MHz du trimère de désoxyadénosine (tridAMP) après synthèse (A) et structure moléculaire du groupement phosphate protégé au cours de la synthèse des trimères (B).

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer si cette molécule est liée de façon covalente au trimère (trimère protégé) ou si elle résulte de la présence du groupement protecteur suite à son clivage. Pour cela, nous avons effectué des mesures en spectrométrie de masse. Le spectre obtenu présente un pic correspondant à la masse moléculaire du tridAMP (877,22 g.mol<sup>-1</sup>) ; aucun pic correspondant à la masse moléculaire du trimère protégé (pics attendus à 929,29 et 982,36 g.mol<sup>-1</sup> suivant que le groupement protecteur est présent sur un ou deux phosphates respectivement) n'est observé. Le trimère apparaît donc intact et majoritaire sous forme déprotégée. La molécule associée aux pics supplémentaires à 2,8 et 3,2 ppm en RMN du proton n'est pas liée covalamment au trimère. Cette molécule a un poids moléculaire trop faible pour être identifiée par spectrométrie de masse. Il reste à déterminer sa nature et à l'isoler en vue de purifier le trimère.

#### *Etude de la nature des impuretés*

Suite à la déprotection du trimère portant le groupement NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, les structures moléculaires résultantes possibles sont notamment NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH et NC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, (Figure V-39) de poids moléculaires respectifs 71,08 et 70,09 g.mol<sup>-1</sup>.

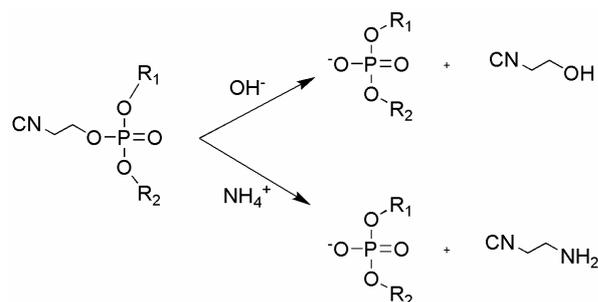


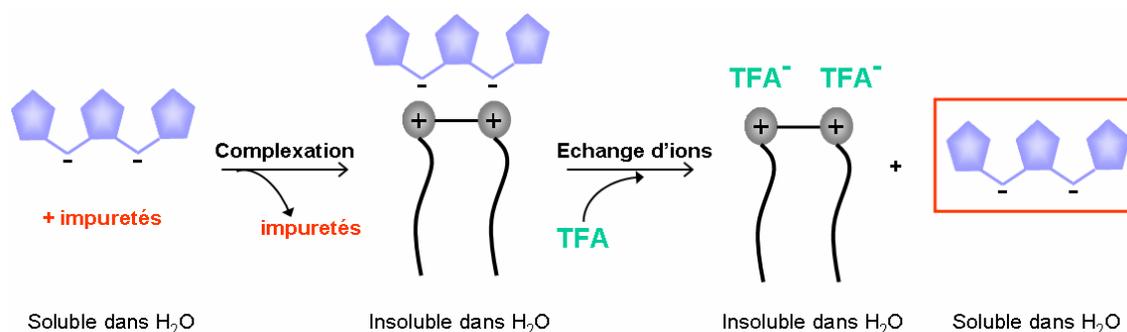
Figure V-39 : Structure moléculaire des fragments obtenus après déprotection du trimère.

L'étude de ces fragments par RMN montre que les pics associés à ces molécules ne correspondent pas aux pics supplémentaires observés lors de l'analyse du tridAMP. La nature de ces impuretés est à l'heure actuelle en cours d'étude. Cependant, en parallèle, nous avons mis en place un protocole de purification du trimère.

#### *Purification du trimère*

Plusieurs lavages du trimère ont été effectués utilisant des solvants de nature variée. La séparation infructueuse de ces impuretés montre que ces deux espèces ont des solubilités similaires. Nous avons donc inversé la solubilité du trimère, par complexation directe avec un gemini possédant une longueur de chaînes aliphatiques suffisamment importante pour conférer un caractère hydrophobe au gemini trimère résultant. Ainsi, il est possible de séparer les deux espèces par centrifugation dans l'eau. Cette méthode s'est révélée efficace puisqu'un gemini trimère est obtenu, dont les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ne présentent pas de pics additionnels.

Dans le but de complexer des trimères à des gemini de longueur de chaînes plus courte et de généraliser la purification du trimère, nous avons utilisé et étendu la stratégie précédente. Après complexation du trimère à un gemini possédant des chaînes aliphatiques de longueur importante, l'impureté peut être éliminée. Un ultime échange d'ion utilisant un contre ion plus affin pour le gemini que le trimère, permet alors de décomplexer le trimère et de l'isoler. Nous utilisons l'acide trifluoroacétique (TFA), qui possède un pKa (0,3) inférieur à celui des nucléotides. Lors de cet échange, la stoechiométrie doit être respectée de façon rigoureuse afin d'éviter le mélange du TFA et du trimère (Figure V-40).

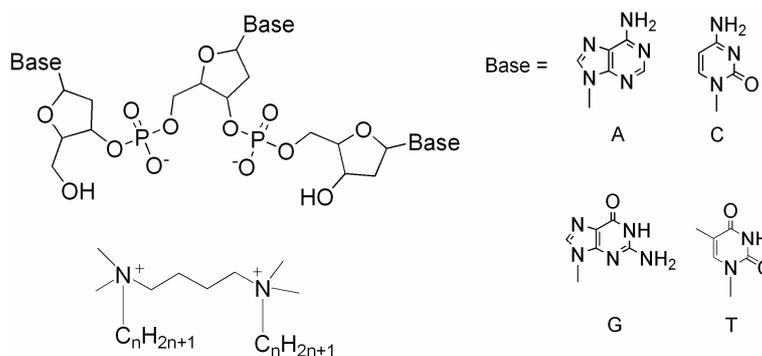


**Figure V-40 :** Représentation schématique de la stratégie de purification du trimère par complexation et échanges d'ions mettant en jeu l'acide trifluoroacétique.

L'utilisation de cette méthode de purification du trimère nous a ainsi permis de synthétiser différents gemini trimère, par échanges d'ions, pour l'étude de ces nouveaux nucléo-amphiphiles à l'interface air-eau et en solution.

### Structure des gemini trimères

Les gemini synthétisés pour la complexation des trimères possèdent une longueur d'espaceur du gemini plus importante que dans le cas des gemini monomères présentés en Annexe V-1, étant donné la distance plus importante entre les charges négatives portées par les groupements phosphate. La taille d'espaceur utilisée ici est de quatre carbones et ne sera pas variée au cours de l'étude (Figure V-41).

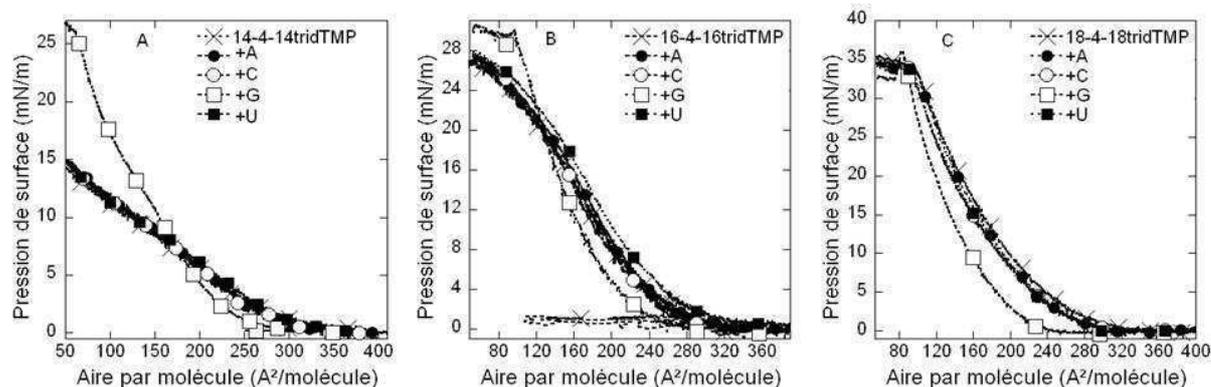


**Figure V-41 :** Structure moléculaire d'un gemini complexé à un trimère de nucléotides.

Dans un premier temps, nous avons étudié les interactions inter moléculaires mises en jeu à l'interface air-eau par la technique du film de Langmuir.

Cette étude a débuté par la mesure d'isothermes pression de surface–aire par molécule du gemini 14-4-14tridTMP (Figure V-42A). Ce gemini s'est révélé trop soluble dans l'eau pour former une monocouche stable sur une surface d'eau ultra pure. Néanmoins, en présence du nucléoside G, on observe la stabilisation de la monocouche de tensioactif : un isotherme

typique est obtenu dans ces conditions. Ceci s'explique à nouveau par la tendance de la guanosine à se placer à l'interface air-eau de par sa nature hydrophobe. Aucun autre nucléoside ne permet une telle stabilisation. Pour la suite de cette étude, nous avons augmenté la longueur des chaînes aliphatiques du gemini, afin d'augmenter son hydrophobie. Les gemini 16-4-16tridTMP (Figure V-42B) et 18-4-18tridTMP (Figure V-42C) ont ainsi été synthétisés.



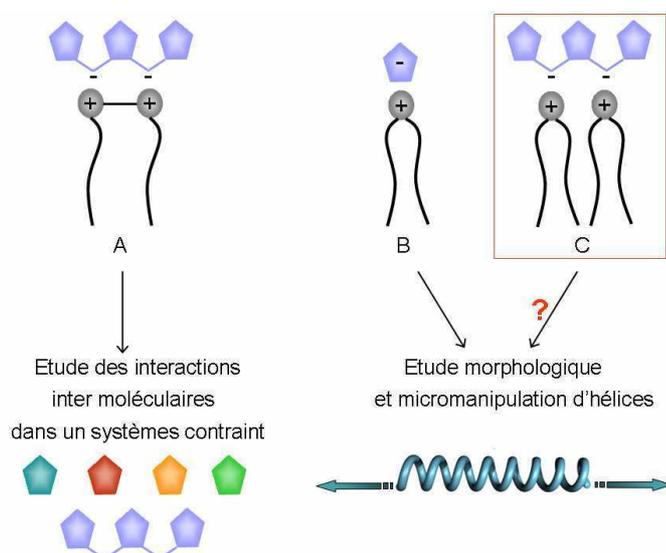
**Figure V-42 : Isothermes de Langmuir pression de surface–aire par molécule obtenus avec les gemini trimères 14-4-14tridTMP (A), 16-4-16tridTMP (B) et 18-4-18tridTMP (C) de concentrations 0,5 mM sur des sous phases d'eau et de nucléosides de concentrations 1 mM.**

Ces deux gemini forment une monocouche stable à l'interface air-eau. La présence de guanosine en sous phase provoque une diminution de l'aire par molécule au sein de la monocouche de **16-4-16tridTMP**. A l'inverse, la présence d'uridine induit une faible expansion. Les nucléosides A et C ne semblent pas interagir avec les gemini trimères du film. En ce qui concerne le gemini **18-4-18tridTMP**, la monocouche subit également une forte diminution d'aire par molécule en présence de G. Aucune variation significative n'est observée dans les trois autres cas.

Les résultats obtenus sur une sous phase de guanosine avec les gemini trimères sont à l'inverse de ceux obtenus précédemment. En présence de gemini tridTMP, G ne se positionne pas à l'interface. Ce nucléoside interagit avec les nucléotides de la monocouche, provoquant sa compaction. Etant donné sa capacité importante à interagir par des interactions d'empilement, il est probable que de telles interactions soient responsables de la compaction du film.

S'il semble que la complexation d'un trimère permette l'organisation de la guanosine au-delà de son fort caractère hydrophobe et favorise les interactions d'empilement (Figure V-42), aucun effet n'est observé avec les trois autres sous phases. La mesure d'isothermes de Langmuir ne semble pas être la méthode la plus adaptée à cette étude. Par conséquent, nous avons décidé, dans un avenir proche, de nous intéresser au comportement d'agrégation de ces nucléo-amphiphiles en solution.

Si de nombreux nucléo-amphiphiles restent à étudier à partir des monomères, tant d'un point de vue des interactions inter moléculaires que d'un point de vue morphologique, la complexation de trinucleotides reste un axe privilégié de notre stratégie. Ainsi, en augmentant la contrainte de confinement des nucléotides (non plus seulement par l'effet hydrophobe, mais par la combinaison de l'effet hydrophobe et de liaisons phosphodiester), nous visons à mimer de plus près la structure polymérique des acides nucléiques. L'élaboration d'un nouveau système mettant en jeu non plus un gemini dicationique, mais deux amphiphiles monocationiques pourrait également aboutir à la formation de nouvelles structures supramoléculaires chirales douées de reconnaissance (Figure V-43).



**Figure V-43 : Représentation schématique de quelques unes des perspectives concernant les systèmes nucléo-amphiphiles développés jusqu' alors (A et B) et à développer (C).**

## 5 Partie expérimentale

### 5.1 Synthèse

Les nucléo-amphiphiles sont obtenus *via* deux échanges d'ions dans le méthanol. Le premier mets en jeu le tensioactif complexé au contre ion bromure (1 eq. par charge positive) et permet la synthèse d'un tensioactif complexé au contre ion acétate (1 eq. par charge positive) (cf. partie expérimentale du chapitre II). Le deuxième échange d'ion permet le remplacement du contre ion acétate par le nucléotide désiré (1 eq. par charge positive).

Dans le cas des gemini, le tensioactif de départ complexé au contre ion bromure est synthétisé à partir de bromoalcane (cf. partie expérimentale du chapitre II). Tous les autres réactifs sont obtenus commercialement et utilisés sans purification supplémentaire. Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Metler-Toledo d'une précision de 0,01 mg. Ces pesées sont effectuées dans une pièce climatisée à 22°C. L'eau ultrapure (18,2 MΩ.cm) est issue d'un système Purelab ultra ELGA.

#### Synthèse des tensioactifs NMP par échange d'ion

Le contre ion acétate est remplacé par l'ajout d'un équivalent par charge positive de nucléotide monophosphate (NMP) dans le méthanol. L'acide acétique formé est ensuite éliminé par évaporation du milieu réactionnel. Le produit est recristallisé par solubilisation dans un minimum de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9/1, v:v) et précipitation dans l'acétone. Le solide blanc obtenu est filtré et séché sous vide.

***C*<sub>12</sub>**GMP** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, δ ppm): 8,08 (1H, s); 5,85 (1H, d, <sup>3</sup>J = 6,36 Hz); 4,76 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 5,14 Hz, <sup>3</sup>J = 6,36 Hz); 4,38 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2,45 Hz, <sup>3</sup>J = 5,14 Hz); 4,18 (1H, m); 4,14 (1H, m); 4,07 (1H, m); 3,28 (4H, m); 3,05 (6H, s); 1,74 (4H, m); 1,38 (4H, m); 1,29 (32H, m); 0,90 (6H, t, <sup>3</sup>J = 6,85 Hz), <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, δ ppm): 138,45; 89,25; 75,05; 72,36; 65,85; 65,22; 51,20; 49,64; 49,42; 49,21; 48,99; 48,79; 48,57; 48,36; 48,27; 48,11; 48,06; 47,98; 47,92; 47,88; 33,08; 30,75; 30,63; 30,52; 30,48; 30,20; 27,37; 23,74; 23,49; 14,43;**

***C*<sub>14</sub>**AMP** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, δ ppm): 8,56 (1H, s); 8,21 (1H, s); 6,09 (1H, d, <sup>3</sup>J = 6,11 Hz); 4,67 (1H, m); 4,41 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 3,11 Hz, <sup>3</sup>J = 4,76 Hz); 4,24 (1H, m); 4,12 (2H, m); 3,28 (4H, m); 3,05 (6H, s); 1,73 (4H, m); 1,38 (4H, m); 1,29 (40H, m); 0,89 (6H, t, <sup>3</sup>J = 13,36 Hz), <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, δ ppm): 152,76; 141,46; 141,43; 123,10; 123,08; 121,08; 107,86; 88,89; 86,14; 86,10; 86,06; 76,35; 72,44; 65,96; 65,91; 65,86; 65,20; 51,21; 49,64; 49,42; 49,32; 49,21; 48,99; 48,79; 48,57; 48,36; 48,15; 48,08; 48,00; 47,95; 47,90; 47,84; 47,80; 47,76; 47,70; 47,64; 47,59; 33,09; 30,77; 30,63; 30,49; 30,18; 27,35; 25,62; 23,74; 23,48; 14,44.**

Dans cette étude, les nucléo-amphiphiles présentent des valeurs de pH indiquant la charge mono anionique du nucléotide ainsi que l'absence de dépurination. Ceci est également confirmé par l'attribution des spectres RMN.

### 5.2 Conductimétrie

La conductivité de nos échantillons est mesurée à l'aide d'un conductimètre Consort (Belgique) équipé d'une électrode de platine SK10T entourée de verre. Au cours de ces expériences, la température est contrôlée grâce à un dispositif de circulation d'eau.

#### 5.2.1 Détermination de la cmc

Pour la mesure des cmc, une solution mère de tensioactifs de concentration environ dix fois supérieure à la cmc attendue est successivement ajoutée à 4 mL d'eau ultrapure ou d'une solution de nucléosides de concentration 2 mM. La mesure est relevée après stabilisation de la conductivité (environ 1 minute).

### 5.2.2 Détermination de la $T_k$

Les températures de Krafft ont également été déterminées par conductimétrie<sup>20,21</sup>, ainsi que par observation visuelle. Le tensioactif est tout d'abord solubilisé dans l'eau puis lyophilisé, de façon à s'assurer que le solide est sous forme hydratée. La poudre ainsi obtenue est dispersée dans l'eau à une concentration de 3 mM (bien supérieure à la cmc des tensioactifs étudiés). Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide pour obtenir un précipité hydraté qui sera maintenu à 2 °C pendant plusieurs heures avant la mesure. La conductivité est mesurée à des températures croissantes comprises entre 2 et 80 °C (1 °C toutes les 10 minutes).

## 5.3 Colorimétrie

L'étude par colorimétrie nécessite l'enregistrement de spectres d'absorption UV. Nous avons utilisé un spectrophotomètre Cary 300 UV-Vis. Une solution mère de tensioactifs de concentration environ dix fois supérieure la cmc attendue est successivement ajoutée à 2 mL d'eau ultrapure ou d'une solution de nucléosides de concentration 2 mM. Chaque solution contient du colorant d'orange de méthyle ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). La quantité de colorant doit être faible pour éviter de perturber la micellisation du tensioactif étudié. Cette molécule a une longueur d'onde maximale d'absorption sensible au milieu et comportement d'agrégation du tensioactif. Elle est ainsi utilisée comme molécule reporter<sup>22,23</sup>.

## 5.4 Mesures de pression de surface

Les mesures de pression de surface ont été effectuées à l'aide d'une cuve de Langmuir (Nima Technology, Coventry, Royaume-Uni) contrôlée par ordinateur, par la méthode Wilhelmy utilisant un papier filtre de dimensions  $10 \times 23,5$  mm. La cuve en téflon utilisée a une dimension de  $5 \times 70 = 350$  cm<sup>2</sup> et est équipée de deux barrières amovibles contrôlées par ordinateur. La vitesse des barrières est fixée de telle sorte que la compression se fait à une vitesse de  $5 \text{ cm}^2.\text{min}^{-1}$ . Les points expérimentaux sont enregistrés tous les  $0,05 \text{ \AA}^2$  environ. Le tensioactif doit être complètement soluble afin de contrôler la densité de molécules déposées à l'interface. Typiquement, les amphiphiles ont été solubilisés à une concentration de 0,5 mM dans un mélange chloroforme : méthanol (9 : 1). Un volume de l'ordre de 50  $\mu\text{L}$  est ensuite déposé délicatement à la surface d'eau ultrapure ou d'une solution de nucléosides de concentration 1 mM, à l'aide d'une seringue Hamilton. La compression de la monocouche débute 10 minutes après dépôt de la solution de tensioactifs afin de permettre l'évaporation du mélange de solvants. Chaque isotherme est répété au moins trois fois pour assurer une bonne reproductibilité. La déviation standard de l'aire par molécule est typiquement inférieure à  $5 \text{ \AA}^2$  par molécule et celle de la pression de surface au point de rupture à  $5 \text{ mN.m}^{-1}$ .

## 5.5 Microscopie optique par contraste différentiel d'interférence

L'observation en microscopie optique des nucléo-amphiphiles se fait après avoir isolé l'échantillon entre une lame et une lamelle de verre afin d'assurer une étanchéité maximale, à l'aide d'un microscope NIKON Eclipse PhysioStation E600FN équipé d'un condenseur et d'un prisme adéquates pour l'observation par contraste d'interférence différentielle (DIC).

## 5.6 Cryofracture, microscopie électronique, en transmission et à balayage

### 5.6.1 Cryofracture

Ces expériences ont été réalisées dans une chambre sous vide Balzers BAF 300 (Balzers, Liechtenstein). La préparation des échantillons consiste à déposer une goutte de suspension entre deux supports de cuivre préalablement nettoyés et scarifiés pour s'assurer de la fixation de l'échantillon. Le tout est ensuite congelé dans le propane liquide, lui-même refroidi à l'aide d'azote liquide. L'échantillon est ensuite transféré dans la chambre pour la fracture et la métallisation. Le vide au sein de la chambre doit atteindre une valeur inférieure à  $10^{-6}$  mbar, à une température de  $-145$  °C. Après fracture de l'échantillon, la réplique se fait par évaporation de platine (à un angle de  $45^\circ$ ) puis de carbone (à un angle de  $90^\circ$ ). Enfin, les échantillons sont extraits de la chambre et lavés,

une fois revenus à température ambiante, dans un mélange eau-éthanol. Les répliques sont disposées sur des grilles de cuivre (200-mesh) pour l'observation par microscopie électronique.

### 5.6.2 Microscopie électronique en transmission (MET)

Les observations de MET ont été faites à l'aide d'un microscope FEI EM120 (120 kV) et les images enregistrées grâce à une caméra  $2k \times 2k$  Gatan ssCCD. Les échantillons non cryofracturés sont préalablement déposés sur une grille carbone - cuivre (400-mesh) et fixés par évaporation de platine, utilisant la même chambre sous vide que pour la cryofracture (Balzers), à un angle de  $11^\circ$ .

### 5.6.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour l'observation en MEB, les échantillons hydratés sont préalablement congelés dans du propane liquide pour éviter la cristallisation de l'eau puis lyophilisés avant évaporation d'or et de platine sous vide. Ces échantillons ont été métallisés et observés au Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse (CREMEM) par Elisabeth Sellier sur un microscope JEOL GSM 840A (15 kV).

## 5.7 SAXS

Pour ces expériences, un générateur Rigaku Nanoviewer Microsource, MicroMax 007 a été utilisé, équipé d'une anode tournante 800 W couplée à un miroir Confocal Maxflux. Les échantillons, sous forme de gels ou de suspensions sont introduits dans un capillaire de verre de diamètre 1,5 mm.

## 5.8 RMN

Les différents spectres présentés dans ce chapitre ont été obtenus à l'aide de spectromètres Bruker Avance 300 et 400 MHz équipés de sondes adaptées à l'étude d'échantillons liquides. Les mesures effectuées sur les agrégats utilisent un spectromètre Bruker Avance 500 opérant à 500,13 MHz équipé d'une sonde HR-MAS adaptée à l'étude d'échantillons fluides non liquides. Les échantillons sont introduits dans un rotor Zirconia de 4 mm de diamètre et de volume interne 50  $\mu$ L. Les expériences ont été réalisées en rotation à l'angle magique à une vitesse de 8kHz. Les signaux sont fixés sur le signal du D<sub>2</sub>O. La température est maintenue constante à une valeur de 290 K (tenant compte de l'augmentation de la température due à la rotation). La séquence « onepulse » utilisée permet une présaturation du signal de l'eau (d'intensité PL9 = 50 dB) avec une fenêtre spectrale de 5 kHz. Typiquement, 32 scans sont enregistrés pour chaque spectre, avec une période de répétition de 3 s. Les spectres sont obtenus par transformée de Fourier et application d'une fonction Lorentzian de 1 Hz.

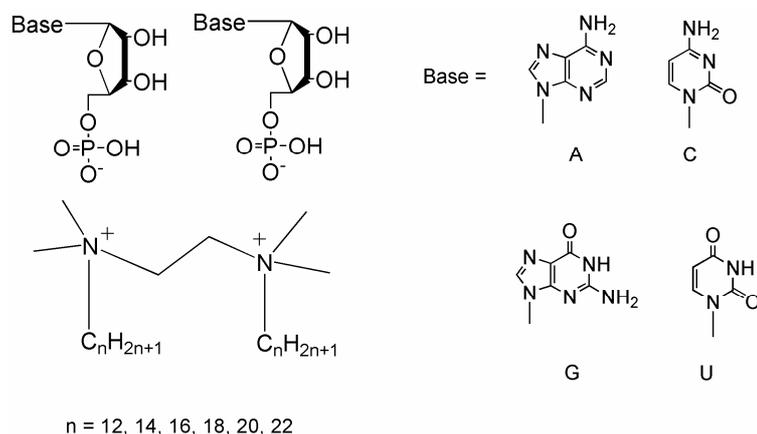
## 5.9 IR

Les mesures d'absorbance infrarouge sont effectuées sur un spectrophotomètre ThermoNicolet Nexus 670 FTIR. Les échantillons sont introduits sous forme de suspension dans une cellule démontable équipée de deux faces de CaF<sub>2</sub> et d'un espaceur en téflon de 50  $\mu$ m de largeur. Les spectres sont enregistrés pendant 1,5 minutes (50 scans) avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Ils sont ensuite traités par soustractions successives du spectre de la vapeur d'eau et du spectre de l'eau lourde. La ligne de base est systématiquement corrigée.

- Annexe 1 -

Etude de gemini complexés à des nucléotides monomériques

Au sein de notre laboratoire, l'étude de nucléo-amphiphiles a débuté avec des systèmes constitués de gemini dicationiques complexés à des monomères de nucléotides (deux monomères par gemini). De nombreuses molécules ont été synthétisées afin d'explorer des gemini de longueurs de chaînes variables, complexés à chacun des ribonucléotides AMP, CMP, GMP et UMP (Figure V-44). Dans cette étude, la longueur de l'espaceur séparant les deux têtes cationiques est de deux carbones et ne sera pas variée. Dans un souci de simplification, nous utiliserons la notation **20NMP** pour un gemini **20-2-20NMP** possédant deux chaînes aliphatiques à 20 carbones reliées par un espaceur éthylénique, et complexé à un nucléotide monophosphate NMP. Etant donné que les gemini utilisés dans cette étude possèdent des chaînes symétriques et ont une longueur d'espaceur fixe, aucune ambiguïté n'est possible avec cette notation.



**Figure V-44 : Structure moléculaire de gemini complexés aux monomères de nucléotides (AMP, CMP, GMP et UMP). Dans ces expériences, la longueur des chaînes aliphatiques est également variée ( $n = 12-22$ ).**

Dans le but d'obtenir des informations préliminaires sur le comportement d'agrégation de ces molécules et leur caractère plus ou moins hydrophobe, les températures de Krafft ont été mesurées. L'étude morphologique de ces systèmes dans différentes conditions a ensuite été menée, suivie de l'investigation des interactions intermoléculaires à l'interface air-eau.

## Etude en solution

### Détermination des températures de Krafft ( $T_k$ )

La  $T_k$  est la température à laquelle un solide hydraté se dissout dans l'eau. Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer l'influence de la longueur des chaînes aliphatiques et de la nature de la base nucléique du contre ion sur la  $T_k$  (Figure V-45).

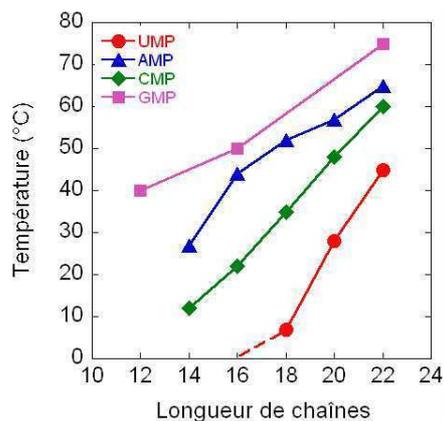


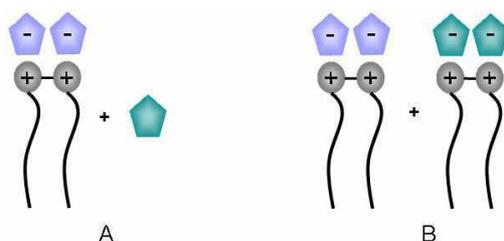
Figure V-45 : Températures de Krafft des nucléo-gemini synthétisés.

Ce graphique présente un résultat prévisible : une augmentation de la longueur des chaînes aliphatiques est associée à une augmentation de l'hydrophobie des molécules et donc de la  $T_k$ . Il souligne également l'importance de la nature de la base nucléique puisqu'elle peut faire varier la  $T_k$  d'une cinquantaine de degrés pour un même gemini. Par exemple, la  $T_k$  du gemini 16UMP est inférieure à 4 °C, alors qu'elle est de 50 °C pour le gemini 16GMP. Pour une même longueur de chaînes, la  $T_k$  est croissante avec l'ordre des contre ions suivant : UMP < CMP < AMP < GMP.

Les comportements observés au travers des mesures de  $T_k$  résultent de phénomènes complexes et coopératifs, qui impliquent notamment les interactions d'empilement, les liaisons hydrogène et l'effet hydrophobe. Les gemini complexés à des nucléotides portant des bases pyrimidiques (U et C) présentent des  $T_k$  plus faibles que ceux complexés à des nucléotides portant des bases puriques (A et G). La capacité de ces bases bi cycliques à intervenir dans des interactions d'empilement entre cycles aromatiques contribue à la formation d'agrégats stables, difficiles à solubiliser, et est illustrée par des  $T_k$  plus élevées. Cette propriété est particulièrement prononcée dans le cas de la guanosine qui s'agrège de multiples façons dans l'eau.

### Comportement d'agrégation en solution

Au cours de ces expériences, les échantillons sont solubilisés (à une température supérieure à leur  $T_k$ ) et les comportements macroscopiques d'agrégation étudiés après retour à la température ambiante ( $\sim 22\text{ }^\circ\text{C}$ ). Nous observons dans un premier temps l'aspect des échantillons suivant le gemini étudié et son environnement. Plusieurs paramètres ont été testés : la concentration, la température, la présence d'un autre nucléoside, complémentaire ou non (Figure V-46A), ou d'un autre gemini nucléotide (Figure V-46B).



**Figure V-46 : Représentation schématique des expériences menées pour l'étude du comportement d'agrégation des gemini nucléotides dans l'eau : en présence d'un nucléoside (A) ou d'un autre gemini nucléotide (B).**

Parmi les différents échantillons étudiés, trois comportements sont distingués : l'obtention d'une solution, la formation d'un précipité et d'un gel. Le Tableau V-2 présente les comportements observés pour une série de nucléo-gemini dans l'eau en présence ou pas de nucléosides (Figure V-46A). Ces observations résultent également des travaux de Yugie Wang, en stage post-doctoral au sein de notre équipe, et de Sabine Manet. Le Tableau V-3 présente une sélection de comportements observés dans le cas de mélanges de gemini nucléotides (Figure V-46B).

	n	H <sub>2</sub> O	A	T	U	C	G
<b>AMP</b>	<b>14</b>	p	s/p	s/p	s/p	s/p	p
	<b>16</b>	gel/p	p	p	p	p	p
	<b>18</b>	gel/p					
	<b>20-22</b>	p					
<b>UMP</b>	<b>14-16</b>	s					
	<b>18</b>	s	gel		s	s	
	<b>20</b>	s/gel à 70 mM	gel	g	s/g	p	
	<b>22</b>	s/gel à 20 mM	gel		s/g	gel	p
<b>CMP</b>	<b>14-16</b>	s					p
	<b>18-22</b>	p	p	p	p	p	p
<b>GMP</b>	<b>12-22</b>	p	p		p	p	p

**Tableau V-2 : Comportement des gemini nucléotides dans l'eau en présence de nucléosides**

(s = solution, p = précipité, g = gel).

	n	14UMP	16UMP	18UMP	20UMP	22UMP	18CMP	20CMP
AMP	14-16		p	p	p	p		
	18		p	p	gel	gel		
	20	p	p	p	gel	gel	p	p
	22	p	p	gel	gel	gel	p	
UMP	22						p	g/p

Tableau V-3 : Comportement de gemini nucléotides dans l'eau en présence d'autres gemini nucléotides (p = précipité, g = gel).

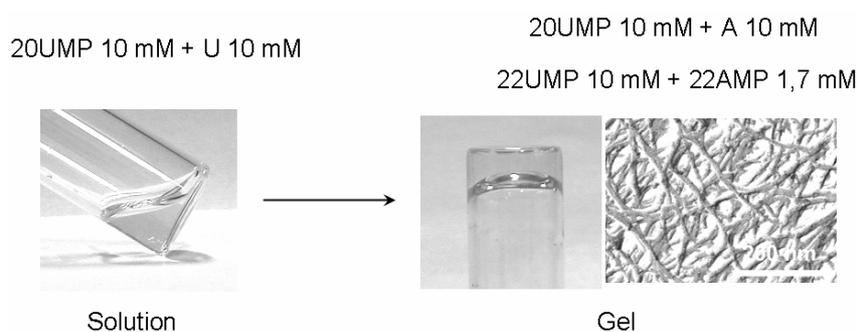
L'addition de nucléosides aux échantillons de gemini AMP, CMP et GMP ne semble pas affecter le comportement d'assemblage des gemini. Cependant, ces résultats sont complexes à interpréter étant donné la diversité des comportements observés (précipité plus ou moins fluide ou visqueux, gel plus ou moins limpide ou opaque...), et la diversité des paramètres testés (nucléotides complexés, longueur des chaînes aliphatiques, nucléosides présents en solution, concentrations de chacun des intervenants, température). S'est ajouté à cela le comportement des systèmes ayant des  $T_k$  proches de la température ambiante : des transitions de phases (de précipité à solution par exemple) ont été observées pour de très faibles variations de température. Ceci explique la notation « s/p » (notamment) reportée dans certaines cases du tableau.

Pour ces raisons, et dans un souci de simplification, nous nous limiterons à développer l'exemple d'un système (parties grisées dans les Tableaux V-1 et V-2). Nous considérerons ainsi le gemini UMP seul, en présence d'adénosine, et en présence de gemini AMP. Ce système est choisi pour présenter les travaux développés au sein de notre équipe avec les systèmes de gemini nucléotides. Ce travail a fait l'objet d'une publication<sup>24</sup>.

Ce système est constitué de bases nucléiques complémentaires : l'uracile de l'UMP complexé au gemini, et l'adénine porté soit par le nucléoside (adénosine présent en solution), soit par le nucléotide (AMP) complexé à un autre gemini. Au sein de ce système, les interactions entre bases nucléiques provoquent une transition de phase : la solution fluide de gemini UMP est transformée en gel lors de l'addition d'adénosine ou de gemini AMP (Figure V-47). La formation du gel est caractérisée en microscopie électronique par un réseau tridimensionnel de fibres nanométriques enchevêtrées. Ce réseau permet de piéger les molécules de solvant (ici l'eau) et est ainsi responsable des propriétés de non écoulement du gel. Cette transition n'est observée que dans certaines conditions et dépend de paramètres tels que la nature des nucléosides présents et la longueur des chaînes aliphatiques du gemini. Par

exemple, un gel est obtenu en présence d'adénosine pour des longueurs de chaînes aliphatiques du gemini UMP supérieures ou égales à 18 carbones (Tableau V-1). En revanche, en présence d'uridine, la formation d'un gel n'est pas observée.

Si un gel est également formé dans le cas des gemini 20 et 22UMP à 10 mM dans l'eau, la cinétique de formation du gel est fortement ralentie en absence d'adénosine (quelques mois contre quelques jours en présence d'adénosine).



**Figure V-47 : Transition de phase (solution/gel) observée avec les systèmes 20UMP+A et 22UMP+22AMP. A l'échelle nanométrique, le gel est caractérisé par la formation d'un réseau de fibres tridimensionnel (cryo fracture et cliché MET, réalisés par T. Labrot).**

De la même façon, la formation d'un gel est observée avec le mélange des gemini AMP et UMP (Figure V-47). Cette transition de phase est notamment dépendante de la concentration du gemini AMP ajouté. Dans le cas du mélange des gemini 22UMP (10 mM) et 22 AMP, une augmentation importante de la cinétique de formation du gel est observée à partir d'une concentration de gemini 22AMP d'1,7 mM. Enfin, au-delà de 10 mM, le gel devient opaque puis un précipité se forme.

Cette transition de phase observée en présence des bases complémentaires U-A n'apparaît pas en présence des bases non complémentaires U-U et U-G. Cependant, la formation d'un gel est également observée en présence des bases non complémentaires U-C. Si la complémentarité de type Watson-Crick (WC) n'est pas respectée dans ce cas, cette transition reste spécifique des bases en présence. En effet, cette transition a lieu en présence des nucléosides A et C. Pour comprendre la nature de cette spécificité d'interactions, nous avons étudié ces systèmes à l'interface air-eau.

## Etude des interactions inter moléculaires à l'interface air-eau

Différents gemini ont été étudiés sur une sous phase d'eau ultra pure, puis en présence de nucléosides en sous-phase. Cette étude a été menée de façon systématique, en présence de chacun des nucléosides A, C, G et U. Les concentrations respectives des gemini nucléotides et des nucléosides utilisées sont telles qu'il y a 500 molécules de nucléosides pour une molécule de gemini. Ainsi, les nucléosides en sous phase sont en large excès. Pour satisfaire les contraintes de solubilité, les gemini étudiés possèdent des longueurs de chaînes de 18, 20 et 22 carbones (en raison de problèmes de synthèse, les gemini 20GMP et 22CMP n'ont pas été étudiés).

### Etude systématique de gemini 18NMP

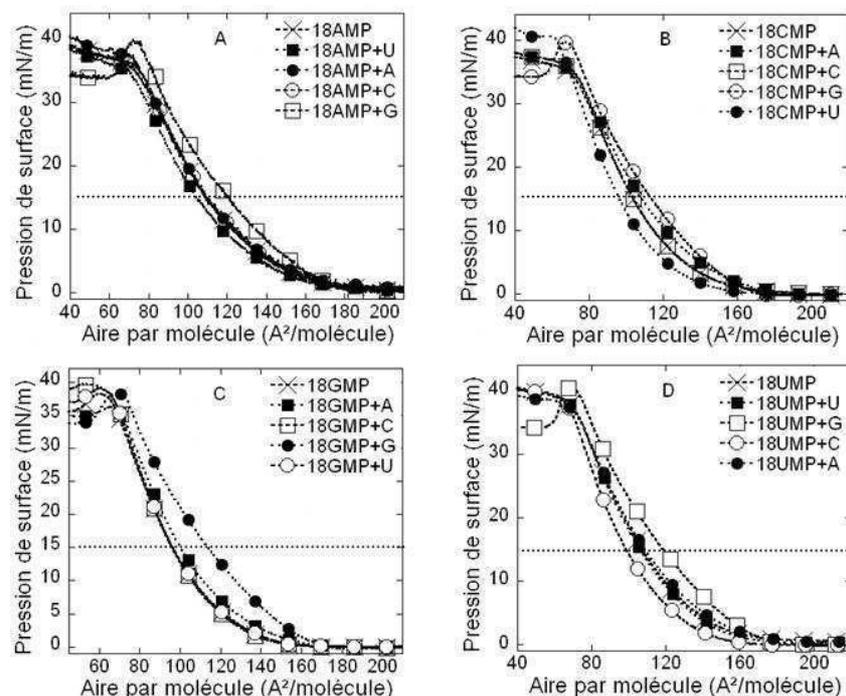
Les gemini 18AMP, 18CMP, 18GMP et 18UMP ont été étudiés successivement sur une sous phase d'eau ultra pure et sur une sous phase de nucléosides. Les interactions entre nucléotides et nucléosides sont observées sous forme de variations d'aire par molécule (expansion ou diminution) à une pression de surface de référence que l'on choisit au sein de la phase liquide, par exemple 15 mN/m.

Dans le cas du gemini **18AMP** (Figure V-48A), des isothermes superposables sont obtenus sur les sous phases d'eau et contenant les nucléosides A ou C. Aucune interaction n'est détectable en présence de ces nucléosides. En revanche, la présence de G en sous phase provoque une expansion de l'isotherme, alors que la présence du nucléoside U provoque une diminution. Malgré de nombreuses controverses quant à l'interprétation de telles variations, il est souvent admis qu'une diminution d'aire par molécule résulterait d'une augmentation des interactions d'empilement entre les bases nucléiques compactant la monocouche. A l'inverse, une expansion résulterait d'une diminution des interactions d'empilement, qui pourrait s'expliquer par l'implication des résidus mis en jeu dans les interactions d'empilement dans de nouvelles interactions, telles que des liaisons hydrogène<sup>25,26</sup>.

La monocouche de gemini **18CMP** présente également une diminution d'aire par molécule en présence du nucléoside U et une expansion en présence de G (Figure V-48B). Dans ce cas, une expansion (plus faible qu'en présence de G) est également observée sur une sous phase contenant le nucléoside A. A nouveau, aucune interaction n'est décelée en présence de C.

En ce qui concerne le gemini **18GMP** (Figure V-48C), une forte expansion en présence de G est observée, et une plus faible avec le nucléoside A. Aucune interaction n'apparaît en présence des nucléosides C et U.

Enfin, les isothermes obtenus avec le gemini **18UMP** (Figure V-48D) présentent une expansion en présence de G et une diminution en présence de C. Aucune variation n'est à noter en présence des nucléosides A et U.

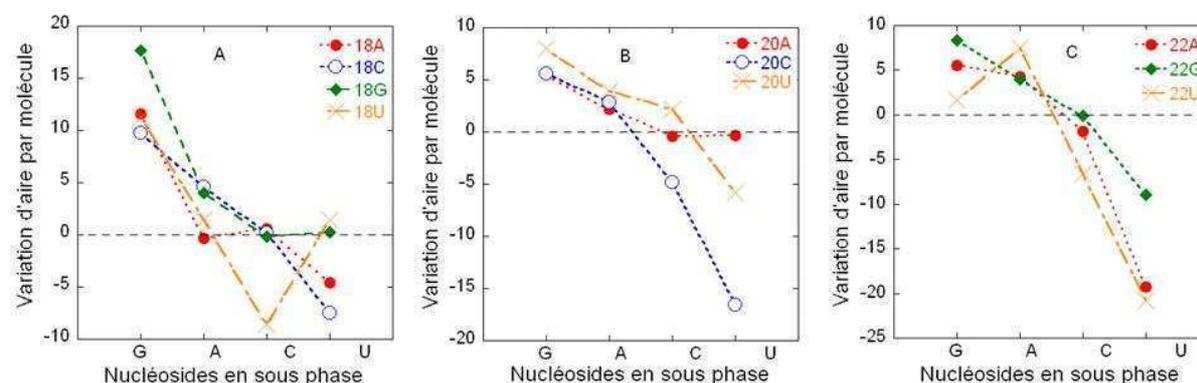


**Figure V-48 : Isothermes de Langmuir pression de surface–aire par molécule obtenus avec les gemini nucléotides 18AMP (A), 18CMP (B), 18GMP (C) et 18UMP (D) de concentrations 0,5 mM sur des sous phases d'eau et de nucléosides de concentrations 1 mM.**

D'une manière générale, les variations observées sont relativement faibles (excepté en présence de guanosine en sous phases). Cependant, elles restent fiables étant donné leur reproductibilité et leurs intensités supérieures aux écarts types calculés (cf partie expérimentale). De plus, une tendance se dégage de cette étude : G induit une expansion de l'isotherme au cours de la phase liquide quel que soit le nucléotide complexé au gemini. Les autres nucléosides ont des effets plus faibles : U montre une tendance à diminuer l'aire par molécule, contrairement à A qui semble l'augmenter légèrement (Figure V-49A). Il apparaît ainsi que les variations observées sont dépendantes de la sous phase utilisée plus que du nucléotide complexé au gemini.

### Etude des gemini 20NMP et 22NMP

Dans la suite de cette étude, en ce qui concerne les gemini 20NMP et 22NMP étudiés, nous ne détaillerons pas les cinq isothermes obtenus pour chaque gemini nucléotides, et nous nous limiterons à présenter le bilan des variations observées pour chaque gemini NMP en fonction des quatre différentes sous phases (Figure V-49).



**Figure V-49 : Variations d'aire par molécule mesurées à partir d'isothermes de Langmuir pression de surface-air par molécule pour les gemini nucléotides 18NMP (A), 20NMP (B) et 22NMP (C) de concentration 0,5 mM sur des sous phases d'eau et de nucléosides de concentrations 1 mM.**

La comparaison des variations d'aire par molécule mesurées pour chaque système présentée sur la Figure V-49 confirme les tendances observées précédemment. G induit une forte expansion de l'aire par molécule contrairement à U qui provoque une diminution. Dans le cas des gemini 20NMP et particulièrement des gemini 22NMP, cette diminution est plus importante que celle mesurée avec les gemini 18NMP. Enfin, la présence d'adénosine induit une augmentation de l'aire par molécule alors que la cytidine ne semble pas interagir avec les gemini NMP de la monocouche. Il apparaît ainsi clairement que les interactions mesurées sont dépendantes du nucléoside en sous phase plus que du nucléotide complexé.

Comme observé précédemment dans le cas des nucléo-amphiphiles monocationiques, ces interactions s'expliquent par la nature et la propension des nucléosides à intervenir dans des interactions de type empilement aromatique et liaison hydrogène.

Les expansions observées en présence des nucléosides G et A ne peuvent pas s'expliquer par leur intervention, en tant que bases puriques bi cycliques dans des interactions d'empilement. En effet, la compaction attendue de la monocouche n'est pas observée. Cependant, ces deux bases sont très hydrophobes, s'agrègent facilement dans l'eau

(particulièrement dans le cas de G) et ont tendance à adopter un positionnement préférentiel à l'interface air-eau, augmentant ainsi l'aire par molécule. L'absence d'interaction en présence de C peut s'expliquer par l'instabilité des liaisons hydrogène dans lesquelles il est impliqué et sa faible capacité à interagir par empilement aromatique. Dans de telles conditions, il semble cohérent qu'aucune interaction ne soit détectée. Cependant, les diminutions observées en présence d'uridine sont surprenantes étant donné que ce nucléoside possède les mêmes caractéristiques que la cytidine en termes de stabilité de liaisons hydrogène et d'interactions d'empilement aromatique. U est le nucléoside le plus soluble dans l'eau et ne devrait ainsi pas interagir dans le contexte de cette étude.

A partir de gemini dicationiques, nous avons observé différentes transitions de morphologies spécifiques des nucléotides complexés et des nucléosides présents dans le milieu. Par exemple, nous avons montré précédemment la transition de solution à gel au sein des systèmes constitués de gemini 22UMP en présence d'adénosine ou de gemini 22AMP.

D'un point de vue morphologique, nous avons montré en début de ce chapitre que l'utilisation de tensioactifs monocationiques permet la formation d'hélices chirales micrométriques. Ces structures résultent de la formation de liaisons hydrogène entre les bases nucléiques confinées à la surface des membranes cationiques. A l'inverse, au sein des systèmes dicationiques de gemini nucléotides, les morphologies observées ne présentent pas de chiralité à l'échelle du micromètre.

- Annexe 2 -

Mesures des pH de différents échantillons de nucléo-amphiphiles

Les valeurs de pH obtenues avec les échantillons des nucléo-amphiphiles C<sub>12</sub>GMP et C<sub>14</sub>AMP indiquent que le nucléotide complexé est mono anionique (Tableau V-4). En effet, à ces pH, le groupement phosphate ne porte qu'une charge négative (la deuxième ionisation se produisant aux alentours de pH 6,7). De plus, les bases des nucléotides complexés (adénosine et guanosine) ne sont pas chargées dans ces conditions. Les nucléosides ajoutés dans ces expériences ne portent pas non plus de charge.

Echantillon		pH
<b>C<sub>12</sub>GMP 20 mM</b>	H <sub>2</sub> O	2,84
	+A 2 mM	3,05
	+C 2 mM	3,21
	+G 2 mM	2,94
	+ U 2 mM	3,00
<b>C<sub>14</sub>AMP 10 mM</b>	H <sub>2</sub> O	4,30
	+A 2 mM	4,60
	+C 2 mM	4,73
	+G 2 mM	4,50
	+ U 2 mM	4,55
<b>C<sub>12</sub>GMP 0,4 mM</b>	H <sub>2</sub> O	4,54
	+A 2 mM	5,16
	+C 2 mM	5,45
	+G 2 mM	4,53
	+ U 2 mM	4,61
<b>C<sub>14</sub>AMP 0,4 mM</b>	H <sub>2</sub> O	5,07
	+A 2 mM	5,36
	+C 2 mM	6,01
	+G 2 mM	5,05
	+ U 2 mM	5,16

Tableau V-4 : Mesures des pH de différents échantillons de nucléo-amphiphiles.

- Annexe 3 -

### Fabrication de micropipettes

Les contraintes liées à la fabrication des micropipettes sont doubles. Les pipettes doivent avoir un diamètre, une longueur et une constante de ressort adaptés à l'objet d'intérêt ainsi qu'à leur fonction de pipette « dure » ou « souple ». De plus, elles doivent présenter une reproductibilité excellente puisqu'à partir de leur comportement vont être déterminées les propriétés mécaniques des systèmes étudiés. Pour adapter la géométrie de la micropipette à l'expérience, cinq paramètres sont ajustables au niveau de l'étireuse de pipettes :

- « Heat » : quantité d'énergie appliquée à la micropipette. Cette grandeur contrôle de façon directe la taille et le diamètre de la micropipette : plus sa valeur est importante, plus la pipette sera longue et fine.
- « Filament » (*Fil*) : 0-15 ; profils préprogrammés établissant la façon dont est appliquée la chaleur sur le verre (distribution de la chaleur).
- « Velocity » (*Vel*) : 0-255 ; vitesse de déplacement du support (gouttière).
- « Delay » (*Del*) : 0-255 ; laps de temps entre la désactivation du laser et l'étirement.
- « Pull » (*Pul*) : 0-255 ; force de l'étirement

Deux programmes adaptés à chaque type de pipettes doivent être mis en place.

**Micropipettes dures** : couramment utilisé au CRPP, ce programme permet la fabrication de micropipettes courtes (1 cm de section fine) d'un diamètre légèrement supérieur à 2,5  $\mu\text{m}$  : « Heat » : 400 ; « Fil » : 4 ; « Vel » : 50 ; « Del » : 225 ; « Pul » : 150.

**Micropipettes souples** : plus longues que les premières (2 cm de section fine), elles possèdent un diamètre inférieur à 2,5  $\mu\text{m}$  :

« Heat » : 500 ; « Fil » : 4 ; « Vel » : 50 ; « Del » : 200 ; « Pul » : 150.

Ces programmes permettent la formation de micropipettes droites et reproductibles. Cependant, de nouvelles mises au point sont nécessaires, particulièrement pour adapter le diamètre des pipettes au diamètre des hélices qui restent difficiles à maintenir par aspiration.

## Références

- 
- <sup>1</sup> Aimé, C., Manet, S., Satoh, T., Park, K.Y., Ihara, H., Godde, F., Oda, R. *Self-assembly of nucléoamphiphiles: investigating nucleosides effect and the mechanism of micrometric helix*. Langmuir, accepté.
- <sup>2</sup> Caetanoa, W., Ferreirab, M., Oliveira Jr., O. N., Itri, R.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, 38, 21
- <sup>3</sup> Aimé, C., Satoh, T., Grelard, A., Dufourc, E., Buffeteau, T., Ihara, H., Oda, R. *Nucleotide-Promoted Morphogenesis in amphiphile assemblies - Kinetic control of micrometric helix formation*. Soumis à publication.
- <sup>4</sup> Snyder, R.G., Strauss, H.L., Elliger, C.A. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 5145
- <sup>5</sup> Thomas, B.N., Safinya, C.R., Plano, R.J., Clark, N. A. *Science* **1995**, 267, 1635
- <sup>6</sup> Brizard, A., Aimé, C., Labrot, T., Huc, I., Berthier, D., Artzner, F., Desbat, B., Oda, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3754
- <sup>7</sup> Hernandez, B., Navaro, R., Hernanz, A., Vergotten, G. *Biospectroscopy* **2002**, 67, 440
- <sup>8</sup> Khalil, F.L., Brown, T.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5113
- <sup>9</sup> Petrovic, A.G., Polavarapu, P.L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 23698
- <sup>10</sup> Maevsky, A.A., Sukhorukov, B.I. *Nucleic Acids research* **1980**, 8, 3029r
- <sup>11</sup> Houchmandzadeh, B., Marko, J.F., Chatenay, D., Libchaber, A. *J. Cell Biol.* **2002**, 67, 440
- <sup>12</sup> Houchmandzadeh, B., Dimitrov, S. *J. Cell Biol.* **1999**, 145, 215
- <sup>13</sup> Poirier, M., Eroglu, S., Chatenay, D., Marko, J.F. *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 269
- <sup>14</sup> Evans, E. *Colloids Surf.* **1990**, 43, 327
- <sup>15</sup> Shoemaker, S.D., Vanderlick, T.K. *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 266, 314
- <sup>16</sup> Zhou, Y., Raphael, R.M. *Biophys. J.* **2005**, 89, 1789
- <sup>17</sup> Pincet, F., Perez, E., Loudet, J.C., Lebeau, L. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87, 178101-1
- <sup>18</sup> Smith, B., Zastavker, Y.V., Benedek, G.B. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87, 278101-1
- <sup>19</sup> Beaucage, S.L. et Iyer, R.P. *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223
- <sup>20</sup> Saito, S., Moroi, Y., Matuura, R. *J. Colloid Interface Sci.*, **1982**, 88, 578
- <sup>21</sup> Nishikido, N., Kobayashi, H., Tanaka, M., *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3170
- <sup>22</sup> Buwalda R. T., Jonker J. M., Engberts J. B. F. N., *Langmuir* **1999**, 15, 1083
- <sup>23</sup> Buwalda R. T., Engberts J. B. F. N., *Langmuir* **2001**, 17, 1054
- <sup>24</sup> Wang, Y., Desbat, B., Manet, S., Aimé, C., Labrot, T., Oda, R. *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 283, 555
- <sup>25</sup> Kitano, H., Ringsdorf, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, 58, 2826
- <sup>26</sup> Ahlers, M., Ringsdorf, H., Rosemeyer, H., Seela, F. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, 268, 132

## **- Conclusions générales -**

Le travail présenté dans ce manuscrit illustre certains des enjeux de la fonctionnalisation et du biomimétisme. Nous nous sommes particulièrement appliqués à comprendre et à reproduire de façon synthétique l'organisation d'édifices biologiques auto-assemblés. En particulier, nous nous sommes intéressés aux édifices exprimant une chiralité supramoléculaire, dont un exemple modèle réside dans la formation spontanée de la double hélice d'ADN.

La stratégie choisie au sein de notre groupe de recherche consiste en l'utilisation de molécules amphiphiles, intrinsèquement douées de propriétés d'auto-assemblage. L'originalité de nos systèmes repose sur la fonctionnalisation de ces motifs par complexation électrostatique avec des contre ions de natures variées. Ainsi, les effets spécifiques d'ions nécessitent d'être étudiés dans le but de concevoir une approche rationnelle pour la conception d'auto-assemblages définis et contrôlés.

La stratégie utilisée dans le chapitre 2 permet l'étude en phase gaz de ces interactions et ainsi de se concentrer exclusivement sur l'aspect électrostatique du complexe. Nous avons montré dans ce chapitre que le complexe gemini cationique – contre ion est particulièrement stable et ne peut pas être dissocié. L'activation du complexe par augmentation de son énergie interne induit alors sa fragmentation par substitution ou élimination. Nous avons montré au cours de ce travail que la stabilité de ce complexe et la voie de fragmentation dépendent à la fois de la nature du contre ion et de la structure de la molécule amphiphile. De plus, l'enthalpie d'activation de substitution nucléophile ne varie que faiblement avec la nature du contre ion et la longueur de l'espaceur du gemini. A l'inverse, il apparaît que la fragmentation par élimination est contrôlée par ces deux paramètres moléculaires. Cependant, ces complexes se comportent de façon très différente en solution et en phase gaz. Ces études nécessitent par conséquent un travail complémentaire en solution, pour la compréhension des contributions des différentes forces impliquées dans les phénomènes d'auto-assemblage de molécules amphiphiles ioniques.

D'un point de vue des morphologies d'auto-assemblages, nous nous sommes particulièrement intéressés aux architectures supramoléculaires chirales. Dans ce cadre, nous avons montré dans le chapitre 3 que la stratégie de complexation de petites molécules chirales à un tensioactif non chiral permet l'obtention d'auto-assemblages chiraux. De cette façon, il est possible de générer de nombreuses structures chirales nanométriques extrêmement modulables. Le transfert de la chiralité de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire peut ainsi être contrôlé subtilement simplement par complexation de contre anions chiraux tartrate. En outre ces systèmes sont apparus d'excellents supports à la réplication inorganique par transcription sol-gel. Nous avons ainsi montré qu'il était possible de répliquer l'ensemble de la diversité des architectures organiques. Ces travaux ouvrent ainsi la voie à diverses caractérisations physico-chimiques et permettent d'envisager de nombreuses applications telles que l'encapsulation ou la conception de réseaux nanométriques inorganiques.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'utilisation de nouveaux contre ions. Des biomolécules dotées de fonctions particulières et douées de reconnaissance moléculaire spécifique ont ainsi été utilisées. Dans ce contexte, les amphiphiles cationiques ont été complexés à des nucléotides. Nous avons montré dans le chapitre 5 que l'élaboration de tels tensioactifs permet également le transfert de chiralité de l'échelle moléculaire à l'échelle supramoléculaire. Les effets structurants coopératifs et réciproques ont permis la formation d'hélices micrométriques par le confinement de nucléotides monoanioniques sur des membranes cationiques. Dans ce cas, la spécificité du contre anion utilisé permet l'obtention d'agrégats de dimensions beaucoup plus élevées que dans le cas des gemini tartrate.

De plus, les systèmes nucléo-amphiphiles ont permis de contrôler les morphologies d'auto-assemblages par addition de nucléosides particuliers. Ceci résulte de phénomènes coopératifs complexes. En effet, ces interactions sont contrôlées par la capacité des nucléotides et nucléosides à interagir par des liaisons faibles (empilement aromatique, liaisons hydrogène), ainsi que par les propriétés propres de chaque entité (hydrophobie par exemple). Les systèmes présentés dans ce manuscrit ouvrent la voie à l'élaboration de systèmes nucléo-amphiphiles dérivés. L'utilisation de contre ions oligonucléotidiques pourrait ainsi constituer une stratégie permettant la fonctionnalisation d'auto-assemblages supramoléculaires doués de propriétés de reconnaissance spécifique.

Du fait de leur structure ambivalente, les molécules amphiphiles s'auto-assemblent en solution, permettant ainsi la formation d'édifices supramoléculaires d'architectures variées. Nous nous intéressons en particulier à l'étude du comportement de molécules amphiphiles cationiques.

Pour comprendre les effets spécifiques d'ions, nous avons développé une approche en phase gaz, utilisant les techniques de spectrométrie de masse et de calculs *ab initio*. Nous avons ainsi déterminé la stabilité de différents complexes amphiphile géminé- contre ion.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la conception et à la caractérisation d'auto-assemblages de morphologies chirales. En particulier, nous étudions le confinement de contre anions tartrate. Nous observons la formation de rubans nanométriques chiraux dont la morphologie est modulable par de nombreux paramètres. Ainsi, il est possible de contrôler l'auto-assemblage pour obtenir des rubans torsadés, hélicoïdaux, ou des tubules. Ce comportement a également été exploité dans le domaine de la polymérisation sol-gel pour l'élaboration de structures chirales inorganiques.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de nucléotides monoanioniques dans le but de fonctionnaliser des molécules amphiphiles cationiques. Les effets structurants coopératifs et réciproques ont permis la formation d'hélices micrométriques. Ces structures présentent des propriétés mécaniques singulières permettant leur élongation, et la formation réversible et spontanée de rubans hélicoïdaux. Le mécanisme de formation des hélices et l'effet de l'ajout de nucléosides sur le comportement d'auto-assemblage ont été étudiés par différentes techniques.

Mots clés : auto-assemblage, amphiphiles, gels, contre ions, chiralité supramoléculaire, nanotubes, hélices, nucléo-amphiphiles

Amphiphilic molecules, also called surfactants, self assemble in water into a broad diversity of structures. We are particularly interested in studying the self-assembling behaviour of cationic surfactants.

In order to understand ionic specific effects, we have developed a method in the gas phase, using mass spectrometry and *ab initio* calculations. This way, we have determined the stability of various gemini – counterion complexes.

We have then focused on the design of chiral self-assemblies. In particular, we investigate the confinement of tartrate counterions. With such systems, we have observed the formation of different nanometric chiral ribbons, exhibiting tunable morphologies through different and independent parameters. This allows to selectively creating twisted, helical or tubular structures. We take advantage of these properties to produce inorganic silica structures through sol-gel polymerization process.

Finally, we have used monoanionic nucleotides to functionalize cationic amphiphiles. Cooperative and reciprocal effects induced the formation of micrometric helices. Moreover, these nucleolipidic helices exhibit particular mechanical properties allowing elongation and reversible rolling of the helices. Nucleosides effects and the mechanism of helix formation have been investigated using different techniques.

Keywords: self-assembly, amphiphiles, gels, counterions, supramolecular chirality, nanotubes, helices, nucleo-amphiphiles