

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **CYRIL RUBIO**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

**CONCEPTION ET EVALUATION DE MODIFICATIONS
BIOSPECIFIQUES DE BIOMATERIAUX**

Soutenue le : 28 Février 2002

Après avis de :

MM. Pierre KRAUSZ (Professeur Université de Limoges)
Michel VERT (Directeur de Recherche CNRS Université de Montpellier 1)

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

MM. Charles BAQUEY (Directeur de Recherche INSERM Université Bordeaux 2)
Pierre KRAUSZ (Professeur Université de Limoges)
Michel VERT (Directeur de Recherche CNRS Université Montpellier 1)
Patrick COUVREUR ((Professeur Université Paris XI Chatenay-Malabry)
Jean-Jacques VILLENAVE (Professeur Université Bordeaux 1)
Gérard DELERIS (Professeur Université Bordeaux 2)
Laurent LATXAGUE (Maître de Conférence Université Bordeaux 2)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

A ma mère pour m'avoir permis d'en arriver où j'en suis aujourd'hui, pour avoir répondu à tant d'interrogations et résolu tant de problèmes, cette thèse, c'est avant tout la tienne. Je t'embrasse tendrement.

A mon père qui a su se priver toutes ces années pour me soutenir et qui a si souvent plaidé ma cause. Je suis sûr que l'avenir nous permettra de nous rattraper (nous avons déjà commencé).

A mes grands-parents qui ont toujours su être à mon écoute et me passer tous mes caprices je leur dédie ce travail.

Enfin, à Sandra
pour avoir enduré cette épreuve à mes côtés,
je serai là au prochain rendez-vous,
à tous les rendez-vous...merci **Bus** et à tout de suite.

REMERCIEMENTS

Les recherches de ce mémoire ont été effectuées dans l'unité INSERM 443 et plus précisément au sein de son Groupe de Chimie Bio-organique.

Ces travaux se sont inscrits dans le cadre d'un financement accordé par la Délégation Générale pour l'Armement et plus particulièrement sa Direction des Systèmes de Force et de la Prospective.

Monsieur G. DELERIS, Professeur de l'Université Bordeaux 2, m'a accueilli dans son Laboratoire en m'accordant sa confiance, a dirigé mon travail de recherche, m'a apporté son aide scientifique et m'a fait part de ses idées ingénieuses pour résoudre les impasses dans lesquelles je me suis plusieurs fois trouvé. Je l'en remercie très respectueusement et lui exprime ma plus grande reconnaissance.

Monsieur C. BAQUEY, Directeur de Recherche à l'INSERM, m'a ouvert les portes de son Unité pour effectuer l'ensemble des tests biologiques présentés dans ce mémoire. Je le remercie pour la qualité des conseils prodigués lors de la correction de ce manuscrit, mais surtout pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir accepter de présider ce jury de soutenance.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur KRAUSZ de l'Université de Limoges de bien vouloir m'écouter pour la seconde fois et juger ce travail. Je lui demande de croire en ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur M. VERT, Directeur de Recherche de l'Université de Montpellier 1, a lui aussi accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

Je suis très honoré de la présence dans ce jury de Monsieur P. COUVREUR, Professeur de l'Université de Paris XI Chatenay-Malabry, et de Monsieur J.J. VILLENAVE Professeur de l'Université Bordeaux 1 qui ont accepté la charge d'être examinateur. Je leur en suis profondément reconnaissant.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Monsieur L. LATXAGUE, Maître de Conférences de l'Université de Bordeaux 2, pour son encadrement durant ces quatre années derrière la paillasse.

Je remercie chaleureusement Madame R. BAREILLE pour m'avoir guidé et soutenu dans les méandres de la biologie m'apportant son immense savoir-faire et ses conseils avisés.

Je remercie Monsieur D. COULON Maître de conférences à l'ESTBB, de m'avoir épaulé dans des étapes de synthèse difficiles et d'avoir été patient aux cours de ces mois de travail en commun. De même je remercie Monsieur B. DESBAT Directeur de Recherche du LPCM de l'Université Bordeaux 1 pour son aide et ses précieux conseils.

J'exprime mes plus vifs et sincères remerciements aux différents membres du Laboratoire M. Bayle, A.M. Melin, G. Laïn, A. Perromat, C. Petitbois et C. Chanseau pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur tout au long de ces travaux. J'associe à ces remerciements tout le personnel de l'Unité 443, et plus particulièrement J. Amédée, M. Rouais et N. Mendoza pour leur aide précieuse.

Je tiens à remercier plus que chaleureusement les amis que j'ai pu me faire au sein du Laboratoire : GameBoy, Jakes, Karine et Bertheul avec lesquels j'ai partagé des moments de travail et de détente inoubliables. Que cette amitié perdure.

Je finirai par remercier C. MALEYRAN, celui qui a toujours su me ramener aux vraies valeurs qui entourent notre passion commune, me permettant de garder la tête sur les épaules. Rien ne pourra jamais nous enlever ces matinées de calme et de tranquillité au milieu de nulle part. Merci à toi, CYRIL.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	17
--------------------------	-----------

PREMIERE PARTIE :.....	
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :	
LE TISSU OSSEUX.....	19

1-1. ORGANISATION GENERALE	22
1-1.1. STRUCTURE TISSULAIRE	23
1-1.1.1. LE TISSU OSSEUX HAVERSIEN	23
1-1.1.2. LE TISSU OSSEUX SPONGIEUX.....	24
1-1.1.3. LE TISSU IMMATURE.....	24
1-1.2. STRUCTURE CELLULAIRE.....	25
1-1.2.1. OSTEOBLASTES	26
1-1.2.2. OSTEOCYTES.....	27
1-1.2.3. CELLULES BORDANTES.....	28
1-1.2.4. OSTEOCLASTES.....	28
1-1.3. MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	29
1-1.3.1. PHASE ORGANIQUE	29
1-1.3.2. PHASE MINERALE	31
1-2. REPARATION OSSEUSE.....	32
1-2.1. CICATRISATION OSSEUSE	33

2-2.1.3. SYNTHÈSE DES SILA-CONJUGUÉS DE BASES NUCLEIQUES	97
2-2.1.3.1. synthèse des sila-conjugués de purines	98
2-2.1.3.2. synthèse des sila-conjugués de la thymine	102
2-2.2. LES BRAS ESPACEURS	104
2-2.3. SYNTHÈSE DU BIO-CONJUGUE	107
2-3. GREFFAGE SUR UN MATERIAU : LE PVDF	108
2-3.1. LE MATERIAU	108
2-3.2. MODIFICATION CHIMIQUE DU PVDF	109
2-3.2.1. IRRADIATION DU PVDF	110
2-3.2.2. FIXATION DU BIO-CONJUGUE	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 2	117

**TROISIÈME PARTIE :
EVALUATION BIOLOGIQUE DES
DÉRIVÉS SYNTHÉTISÉS 121**

3-1. CRIBLAGE DES COMPOSÉS SYNTHÉTISÉS	124
3-1.1. SILA-CONJUGUÉS DE L'ACIDE ASCORBIQUE	124
3-1.1.1. TESTS DE CYTOTOXICITÉ	124
3-1.1.2. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT	126
3-1.2. SILA-CONJUGUÉS DES BASES NUCLEIQUES	128
3-1.2.1. TESTS DE CYTOTOXICITÉ	128
3-1.2.2. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT	129
3-2. TEST D'ADHÉSION CELLULAIRE SUR LE PVDF GREFFÉ	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 3	137

CONCLUSION 139

PARTIE EXPERIMENTALE.....	141
4-1. CHIMIE	144
4-1.1. TECHNIQUES GENERALES ET CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS.....	144
4-1.2. SYNTHESSES DES COMPOSES ET CARACTERISTIQUES PHYSICO - CHIMIQUES.....	146
4-2. BIOLOGIE	211
4-2.1. CULTURE CELLULAIRE.....	211
4-2.2. CYTOCOMPATIBILITE DES SILA-CONJUGUES SYNTHETISES.....	211
4-2.2.1. INTRODUCTION.....	211
4-2.2.2. TESTS AU MTT	212
4-2.2.3. TESTS DU ROUGE NEUTRE	213
4-2.3. TESTS DU TRANSPORT DES MOLECULES NATURELLES D'INTERET BIOLOGIQUE.....	214
4-2.3.1. TRANSPORT DE L'ACIDE ASCORBIQUE	214
4-2.3.2. CARACTERISATION DE LA DEGRADATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE 	215
4-2.3.3. TRANSPORT DE L'HYPOXANTHINE	216
4-2.4. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT DES MOLECULES NATURELLES 	217
4-2.4.1. INTRODUCTION.....	217
4-2.4.2. MISE EN ŒUVRE DU TEST.....	218
4-2.5. TESTS D'ATTACHEMENT DES OSTEOPROGENITEURS SUR LE PVDF 	219
4-2.5.1. INTRODUCTION.....	219
4-2.5.2. MISE EN ŒUVRE DU TEST.....	219

4-3. GREFFAGE.....	220
4-3.1. PVDF ET IRRADIATION.....	220
4-3.2. REACTION DE GREFFAGE	220
ANNEXE	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 4	223

ABBREVIATIONS

AA :	acide ascorbique
Ac :	acétyle
ADN :	acide désoxyribonucléique
AINC :	agent infectieux non conventionnel
APTS :	acide para toluène sulfonique
ARN :	acide ribonucléique
ATPsynthase :	adénosine tri-phosphate synthase
BMP :	bone morphogenic protein
BOC :	t-butyloxycarbonyle
CCCP :	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazone
DCC :	dicyclohexyl carbodiimide
DEAD :	azodicarboxylate de diéthyle
DMF :	diméthyl formamide
EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique
HAP :	hydroxyapatite
HBMSC :	human bone marrow stromal cell
HMDS :	hexaméthylidisilazane
HXT :	hypoxanthine
MEC :	matrice extra-cellulaire
PE :	polyéthylène
PGA :	poly(acide glycolique)
PLA :	poly(acide lactique)

PNC :	protéines non collagéniques
PPh ₃ :	triphénylphosphine
PTFE :	polytétrafluoroéthylène
PVDF :	poly(fluorure de vinylidène)
Rdt :	rendement
RMN :	résonance magnétique nucléaire
SVF :	sérum de veau foetal
TCP :	phosphate tri-calcique
MTT :	bromure de 3-(4,5-diméthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
TFA :	acide tri-fluoroacétique
TGFβ :	transforming growth factors β
THF :	tétrahydrofurane
IR-TF :	infra-rouge à transformé de Fourier
UV :	ultra violet

INTRODUCTION

L'activité de l'Unité INSERM 443 et plus précisément de son groupe de Chimie Bioorganique est la conception de molécules destinées à permettre des modifications biospécifiques de biomatériaux, dans le but de proposer des voies d'ingénierie tissulaire, aussi bien osseuse que vasculaire ou des systèmes de relargage biocontrôlés de molécules actives.

Il s'agit de greffer de manière covalente des molécules qui sont susceptibles d'être utilisées par des cellules lors de leur phase de colonisation du biomatériau ou lors de leur croissance. Ces entités sont liées au matériau par des bras conçus pour :

- être chimiquement stables et donc faire jouer au système le rôle « d'agent de concentration » des cellules sur les biomatériaux.
- ou permettre la libération des molécules supportées lors du contact des différents milieux biologiques avec les biomatériaux.

Cette approche spécifique ne s'appuie pas sur l'utilisation de molécules engagées dans les phénomènes d'adhésion comme certains peptides. Enfin et surtout, elle nécessite une définition des cibles cellulaires pour les molécules greffées mais aussi pour ce qui concerne la coupure éventuelle des bras de couplage.

L'objectif de notre travail sera la conception de systèmes favorisant la colonisation et la croissance des ostéoblastes (cellules participant à la synthèse de l'os) sur un biomatériau. En effet, après un traumatisme osseux important, les processus de réossification ne sont pas toujours aisés et la chirurgie, souvent invasive, ne permet pas à l'os de retrouver sa structure et sa composition initiale. La réalisation de tels systèmes nécessitera l'identification de molécules susceptibles d'avoir une interaction avec la membrane de ces cellules osseuses. Ces molécules d'intérêt devront être fixées à la surface du biomatériau. Elles seront modifiées par association à un lien organo-silicié tout en conservant leurs propriétés biologiques. Le système résultant appelé sila-conjugué sera fixé au biomatériau par l'intermédiaire d'un bras espaceur organique, le tout permettant d'exposer le plus efficacement possible les molécules d'intérêt aux cellules. L'association du sila-conjugué au bras espaceur constituera le bio-conjugué. Ce système organique pourra alors intervenir dans les processus biologiques d'ostéogenèse.

Dans une première partie, après avoir présenté la structure du tissu osseux, nous nous attacherons à décrire les travaux récents de conception et de réalisation des différents biomatériaux de comblement osseux utilisés actuellement.

Dans une deuxième partie nous identifierons tout d'abord plusieurs molécules susceptibles de constituer un ancrage pour les cellules, en mettant en évidence le transport de ces molécules à travers la membrane cytoplasmique des ostéoblastes. Puis nous décrirons la stratégie opérationnelle mise en œuvre à partir de ces molécules d'intérêt (les nucléobases puriques et l'acide ascorbique) pour conduire, après association à différents liens organo-siliciés, à des sila-conjugués. Nous poursuivrons par la réalisation du bras espaceur permettant l'exposition des sila-conjugués à la membrane des cellules. Les propriétés physico-chimiques indispensables à l'interface chimie (matériau) / biologie (cellule) imposeront la structure du bras. Enfin, l'association du bras espaceur et du sila-conjugué constituera le bio-conjugué que nous grefferons sur le biomatériau. Ce dernier est un support fluoropolymère (PVDF polyfluorure de vinylidène) déjà utilisé dans le domaine chirurgical.

Dans une troisième et dernière partie, nous présenterons l'ensemble des tests biologiques réalisés *in vitro*. Ils correspondent tout d'abord à l'évaluation de la cytotoxicité des différents sila-conjugués synthétisés dans la partie précédente, puis à des tests d'inhibition, par les sila-conjugués non cytotoxiques, du transporteur des molécules naturelles considérées. Pour finir nous décrirons des expériences d'adhésion cellulaire sur le matériau greffé au bio-conjugué.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

LE TISSU OSSEUX

L'os est un tissu complexe et dynamique [1]. Il est le siège de nombreuses réactions chimiques lui permettant d'assurer ses différentes fonctions. Son rôle chez les vertébrés supérieurs est tout d'abord de constituer la "charpente" squelettique et de servir de point d'attache aux masses musculaires pour permettre le mouvement. Il intervient également, de par sa nature minérale, dans les phénomènes de régulation du métabolisme phosphocalcique et comme réservoir d'éléments essentiels (Ca^{2+} notamment) [2].

D'un point de vue mécanique, le tissu osseux peut être assimilé à un "matériau composite" à fibres creuses. Cette organisation lui confère des propriétés mécaniques spécifiques. Par exemple, il offre la même résistance à la traction que la fonte tout en étant trois fois plus léger et dix fois moins flexible [3]. En fonction de son positionnement au sein du squelette, l'os peut prendre différentes formes optimisant ainsi la répartition des contraintes physiques. Nous avons les os longs (humérus, fémur), les os courts (colonne vertébrale) et les os plats (ailes iliaques) (Schéma 1).

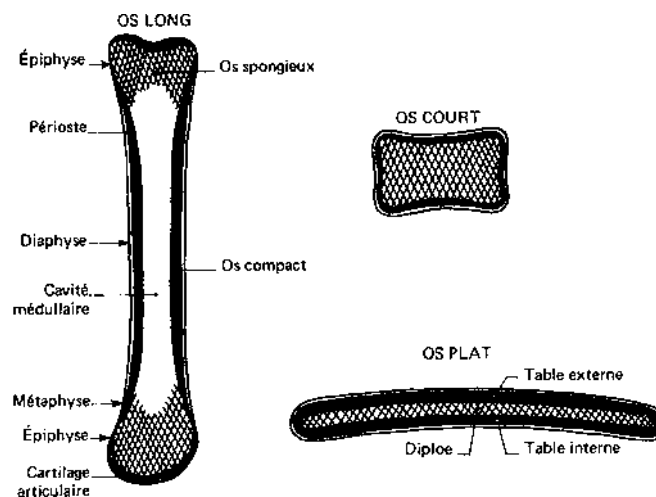


Schéma 1 : Les trois variétés anatomiques d'os et la répartition du tissu osseux compact et du tissu osseux spongieux

La compétence mécanique de l'os dépend étroitement de son organisation tridimensionnelle. Son architecture n'est pas figée et subit des modifications permanentes. Cette activité particulière, appelée remodelage osseux, associe simultanément des phénomènes de destruction (ostéoclasie) et de reconstruction osseuse (ostéogénèse).

1-1. ORGANISATION GENERALE

Comme l'ensemble des autres tissus, l'os débute sa croissance au stade embryonnaire. Il se développe à partir d'une structure cartilagineuse qui petit à petit se vascularise. Les vaisseaux sanguins permettent un apport en cellules de toute sorte ainsi qu'en nutriments indispensables à la croissance. Au cours du temps le tissu cartilagineux est résorbé pour laisser la place à un tissu osseux primaire qui, rapidement, se minéralise pour donner le tissu osseux secondaire parfaitement vascularisé (Schéma 2).

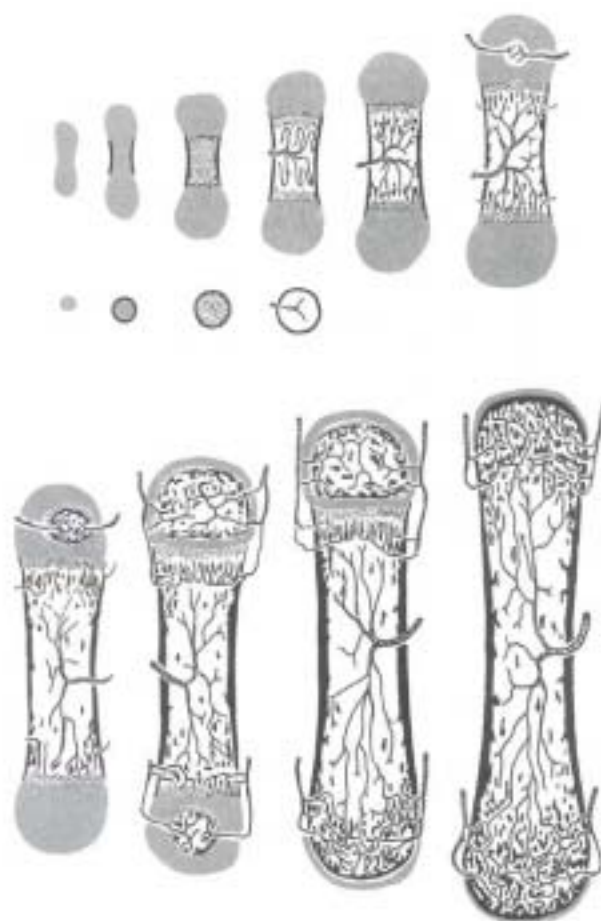


Schéma 2 : Schéma de l'élaboration de l'os

Au cours des différentes étapes de cette ossification, la collaboration cellulaire semble étroite entre les cellules qui dégradent le tissu cartilagineux (chondroblastes), les cellules endothéliales des capillaires invasifs, et les cellules qui dégradent le tissu osseux, les ostéoclastes souvent retrouvés au sommet des capillaires en développement. Le réseau

capillaire des tissus embryonnaires semble coordonner et diriger le développement des membres, et pourrait servir de guide pour la formation osseuse ostéoblastique [4, 5].

L'os est un tissu conjonctif associant des cellules et une matrice extracellulaire dont la particularité est d'être minéralisée. Les qualités mécaniques de l'os sont liées à l'organisation et à l'agencement de cette matrice minéralisée [2].

Les cellules qui ont en charge l'élaboration de cette matrice sont des cellules spécialisées : les ostéoblastes. Elles fabriquent la phase organique de la matrice en synthétisant des protéines de structure (collagène de type I), mais également d'autres protéines non collagéniques spécifiques de l'os et des protéoglycanes [3]. Puis cette matrice va se minéraliser selon des mécanismes non encore parfaitement élucidés, mais qui dépendent des protéines non collagéniques de la matrice. En effet, ces protéines ont une affinité marquée pour le phosphate de calcium dont elles semblent initier la nucléation et contrôler la croissance cristalline [6].

Une fois élaboré, le tissu osseux mature devient quiescent avant de subir une étape de remodelage. Il est soumis à un processus de destruction par des cellules spécialisées, les ostéoclastes, au cours d'une phase de résorption osseuse qui précède généralement de nouveaux processus d'ostéogenèse. Ce perpétuel remodelage osseux s'effectue sous l'influence de facteurs physiologiques et mécaniques [6].

1-1.1. STRUCTURE TISSULAIRE

Les composants fondamentaux du tissu osseux (cellules, trame protéique et phase minérale) présentent un agencement différent selon la région de l'os que l'on observe. Il est décrit habituellement trois modes d'organisation tissulaire : le mode haversien, le mode spongieux, et l'organisation immature.

1-1.1.1. LE TISSU OSSEUX HAVERSIEN

La structure élémentaire de l'os Haversien est l'ostéon (Schéma 3). Il est centré sur un axe vasculaire qui prend le nom de canal de Havers. L'ostéon est constitué de lamelles osseuses cylindriques concentriques et superposées. Ces lamelles sont formées de fibres de collagène minéralisées de même orientation. Le canal central de l'ostéon abrite des éléments

vasculaires et des terminaisons nerveuses. Ce type d'os représente environ 80 % de la masse osseuse totale.

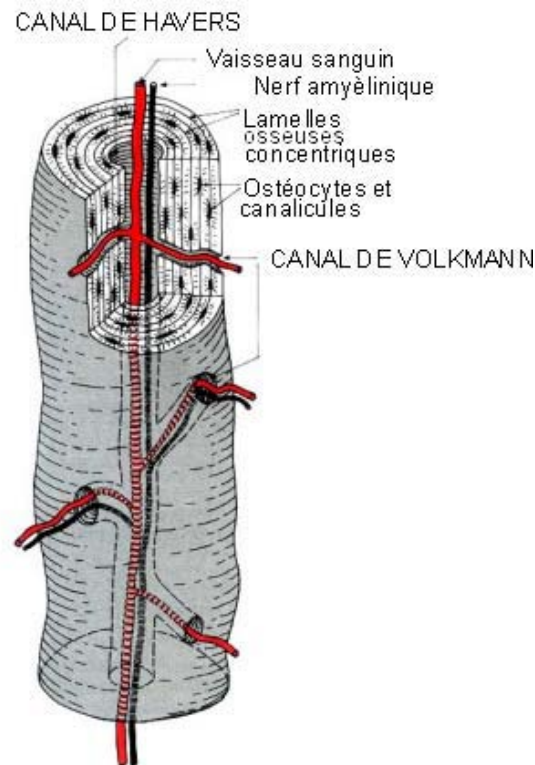


Schéma 3 : Schéma tridimensionnel d'un ostéon (ou système de Havers)

1-1.1.2. LE TISSU OSSEUX SPONGIEUX

Il est aussi appelé tissu osseux trabéculaire. Il est constitué de lamelles osseuses contenant des fibres de collagène non minéralisées qui possèdent toutes la même orientation (non concentriques). L'architecture du système, la taille et l'orientation des trabécules s'organisent selon la valeur et l'orientation des contraintes mécaniques s'exerçant sur le tissu (Schéma 1).

1-1.1.3. LE TISSU IMMATURE

Ce tissu est la dernière organisation rencontrée dans le tissu osseux. C'est un système non lamellaire ne possédant pas d'organisation particulière et dont les fibres de

collagène sont orientées anarchiquement. Cet os immature est pratiquement toujours le préambule à la mise en place d'un os Haversien ou spongieux.

1-1.2. STRUCTURE CELLULAIRE

L'os est un tissu vivant dans lequel l'activité des cellules est régulée par des facteurs hormonaux systémiques et locaux (cytokines, facteurs de croissance...) indispensables au recrutement et au maintien de l'état différencié des cellules osseuses. En outre, ces facteurs constituent des agents de communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes dans les séquences du remodelage osseux. Tous ces signaux vont permettre un maintien de l'os en qualité et en quantité afin d'adapter sa structure aux contraintes mécaniques qu'il subit.

L'activité de néoformation osseuse est liée à l'activité de trois principaux types cellulaires [7] hébergés par l'os adulte : les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes qui proviennent de cellules ostéoprogénitrices (Schéma 4).

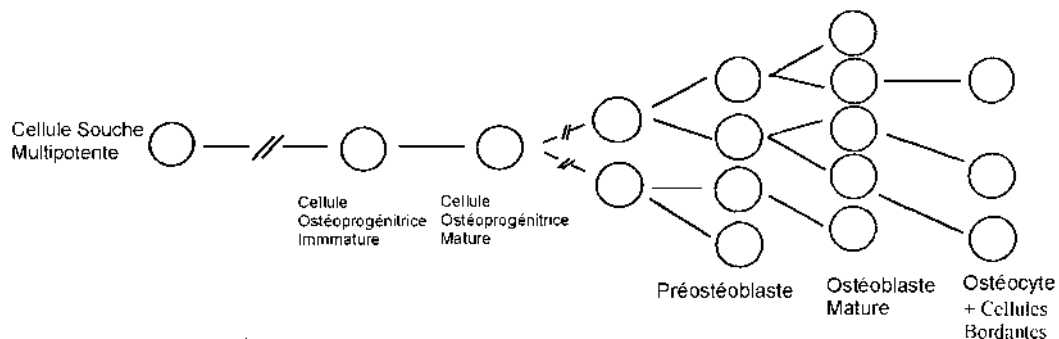


Schéma 4 : Origine des cellules conduisant à la synthèse l'os

1-1.2.1. OSTEOBLASTES

L'ostéoblaste actif est une cellule spécialisée mais qui reste capable de se diviser. La fonction de ce type cellulaire est la synthèse de la trame protéique du tissu osseux. L'ostéoblaste est toujours associé à d'autres cellules du même type, généralement sous la forme d'un film monocellulaire posé sur une couche de substance ostéoïde ou matrice extracellulaire (MEC). Cette dernière est synthétisée par les ostéoblastes eux-mêmes et en phase de minéralisation elle est adossée à un os lamellaire mature. (Schéma 5). La minéralisation de la matrice protéique est un phénomène physico-chimique autonome qui résulte de l'intervention de nombreuses protéines non collagéniques (ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine, protéoglycane) et d'éléments présents dans les liquides extracellulaires.

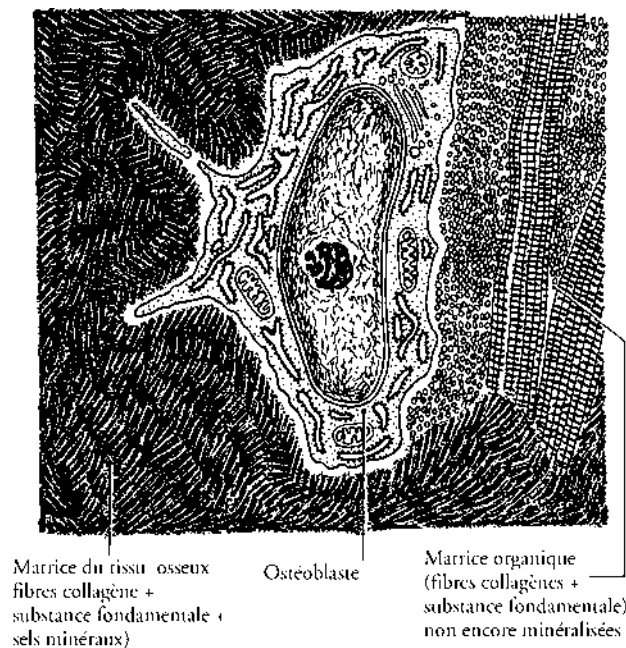


Schéma 5 : Aspect ultrastructural d'un ostéoblaste

Les ostéoblastes possèdent dans leur cytoplasme des microtubules et des micro-filaments leur permettant de se déplacer aussi bien en culture qu'au sein du tissu osseux. Leur membrane plasmique présente, en surface, de nombreuses protéines telles que des enzymes [8, 9], des transporteurs, des récepteurs hormonaux ou des protéines de connexion inter-cellules.

1-1.2.2. OSTEOCYTES

L'inclusion progressive de l'ostéoblaste dans la matrice extracellulaire résulte d'une diminution de l'activité de synthèse de la cellule qui perd son alignement, c'est à dire la plupart de ses connections, avec les autres ostéoblastes. Une fois inclus dans la matrice, l'ostéoblaste est appelé ostéocyte (Schéma 6).

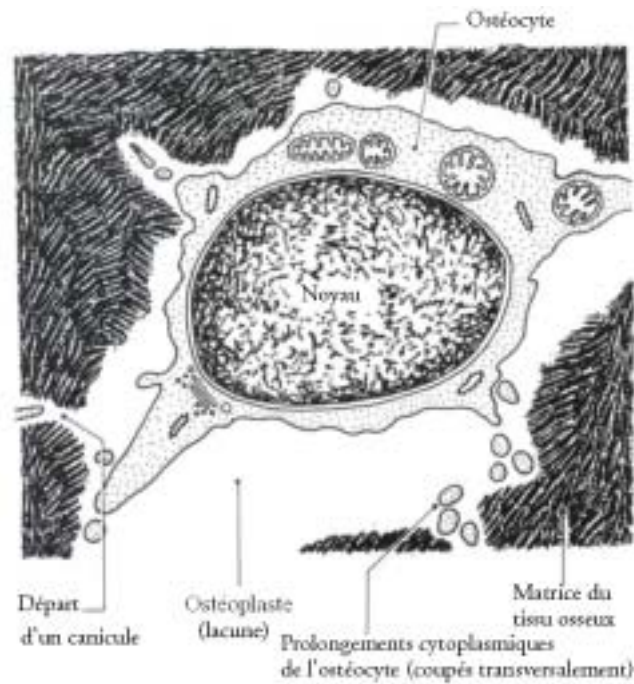


Schéma 6 : Aspect ultrastructural d'un ostéocyte

La minéralisation de la matrice extracellulaire confine le jeune ostéocyte dans une logette osseuse (ostéoplaste) depuis laquelle il maintient ses rapports membranaires avec les autres cellules par l'intermédiaire de fins canalicules osseux. Cette cellule, dite quiescente, pourrait avoir une fonction de régulation dans l'échange du calcium et du phosphore entre l'os et le sang [10].

1-1.2.3. CELLULES BORDANTES

Ce sont des cellules qui dérivent également des ostéoblastes, et qui recouvrent la majorité des surfaces osseuses du squelette. Elles ont une forme aplatie, allongée et sont inactives par perte de la quasi-totalité de leurs fonctions de synthèse. Elles sont néanmoins capables, comme les ostéoblastes, d'exprimer des récepteurs hormonaux et de produire des facteurs de croissance ou des cytokines (Schéma 7).

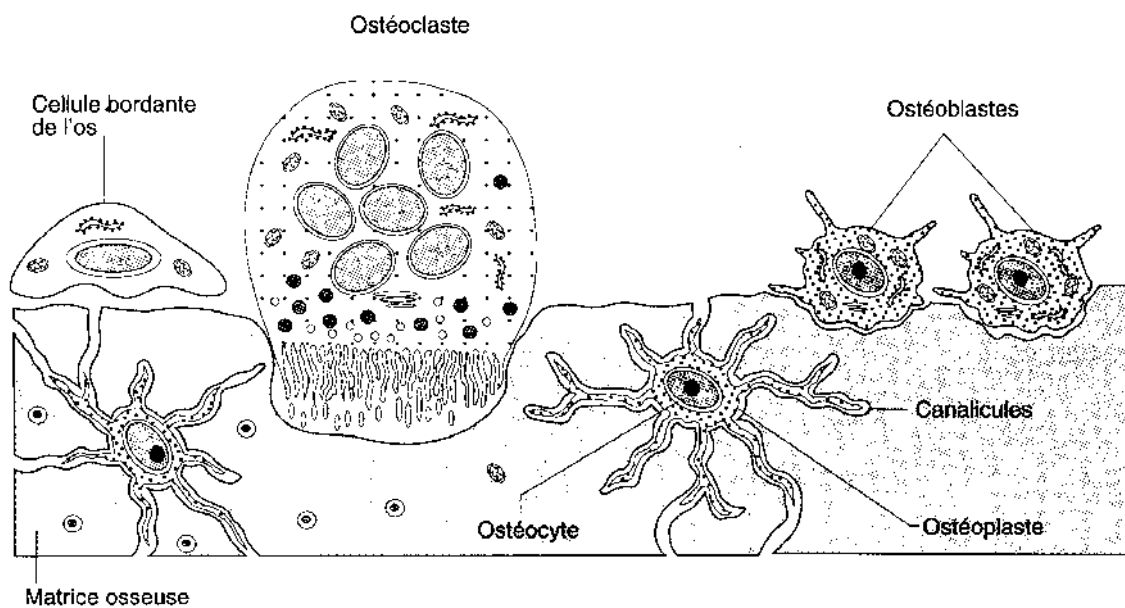


Schéma 7 : Représentation des différentes cellules au sein du tissu osseux

1-1.2.4. OSTEOCLASTES

La régulation des phénomènes de résorption osseuse implique un dernier type cellulaire original : l'ostéoclaste [11]. Cette grande cellule multinucléée (jusqu'à 10 noyaux) résulte de la fusion de précurseurs mononucléés (Schéma 8). Il possède une forme variable, et présente une structure membranaire très spécialisée appelée « bordure en brosse », qui lui permet de se déplacer à la surface du tissu osseux.

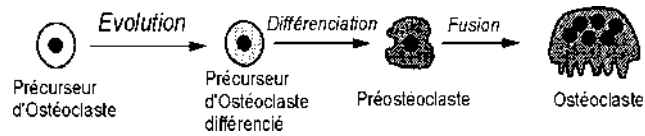


Schéma 8 : Origine cellulaire des ostéoclastes

La fonction de l'ostéoclaste différencié est la résorption de la matrice. En effet, il se structure, lors de son activation, avec un pôle basal correspondant à la zone de fixation sur la matrice extracellulaire (dégradation) et un pôle apical possédant l'ensemble des récepteurs régulant sa propre activité. Ces derniers sont la cible de facteurs hormonaux, de cytokines et de facteurs de croissance, pouvant être sécrétés par les ostéoblastes (Schéma 7).

1-1.3. MATRICE EXTRACELLULAIRE

Le tissu osseux est composé d'une MEC constituée d'une phase organique (22%), d'une phase minérale (69%) et d'eau (9%).

1-1.3.1. PHASE ORGANIQUE

Elle est constituée d'un grand nombre de protéines réparties en deux familles :

- les collagènes (90%),
- les protéines non collagéniques (PNC) qui représentent 10% de la phase organique de la MEC et qui regroupent l'ostéocalcine, la "Gla" (protéine matricielle), les sialoprotéines et l'ostéonectine [12].

➤ collagènes

Il s'agit principalement du collagène de type I. D'autres types de collagènes (de type II, III, V et X) ont été détectés en faible quantité dans l'os mais semblent provenir des tissus conjonctifs avoisinants. Le collagène de type I, extrêmement stable, est formé par l'association de 3 chaînes polypeptidiques. Ces chaînes sont tout d'abord synthétisées par les ostéoblastes sous forme de procollagène (Schéma 9 A et B) et s'assemblent par la suite dans la matrice extracellulaire pour donner le tropocollagène (Schémas 9 D).

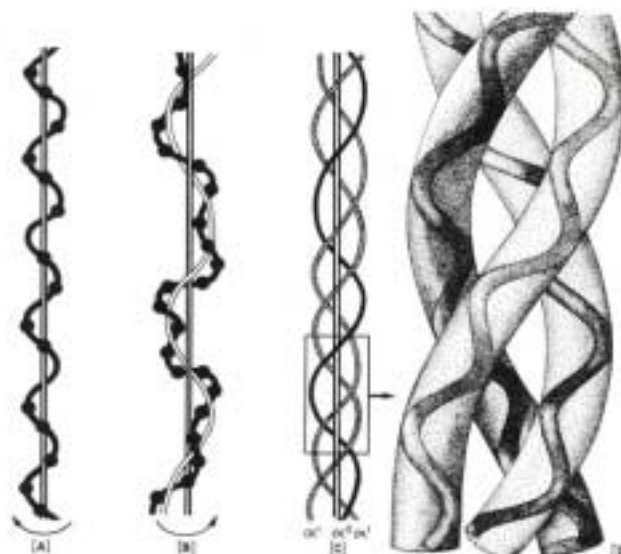


Schéma 9 : Agencement microscopique du collagène

➤ protéines non collagéniques de l'os

Les protéines non collagéniques sont longtemps restées faiblement caractérisées et très peu d'entre elles ont été purifiées, malgré leur importance dans le développement, la maturation et la physiologie du tissu osseux [13, 14]. La difficulté de détection de ces protéines est liée à leur faible proportion au sein de la phase organique ainsi qu'à une extraction et une purification difficiles à réaliser en raison de la présence de la phase minérale. Grâce à de nouvelles techniques d'extraction séquentielle en conditions dissociatives qui permettent de libérer sélectivement des protéines plus ou moins associées à la phase minérale, deux types ont pu être mis en évidence [15] : des protéines synthétisées par les cellules osseuses (ostéocalcine), et des protéines principalement d'origine plasmatique (albumine, glycoprotéines). L'impact de ces protéines au niveau du métabolisme cellulaire va permettre de maintenir une balance parfaite entre la résorption et la formation osseuse.

1-1.3.2. PHASE MINERALE

La minéralisation se produit au sein de la matrice organique extracellulaire. Cette dernière agit comme un agent de nucléation du cristal puis de croissance et joue un rôle de support servant à l'organisation de ces dépôts calciques (Schéma 10).

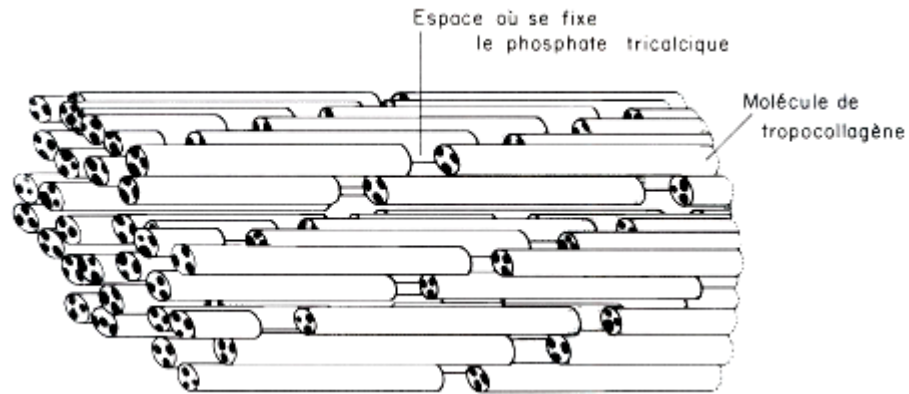


Schéma 10 : Dépôt de calcaire dans les molécules de tropocollagène

La phase minérale est constituée de cristaux de phosphate de calcium complexes qui se déposent sur et à l'intérieur des fibrilles de collagène de façon ordonnée. Le constituant principal de la substance minérale des tissus calcifiés est l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ associée sous forme indéterminée à du carbonate de calcium (Schéma 11).

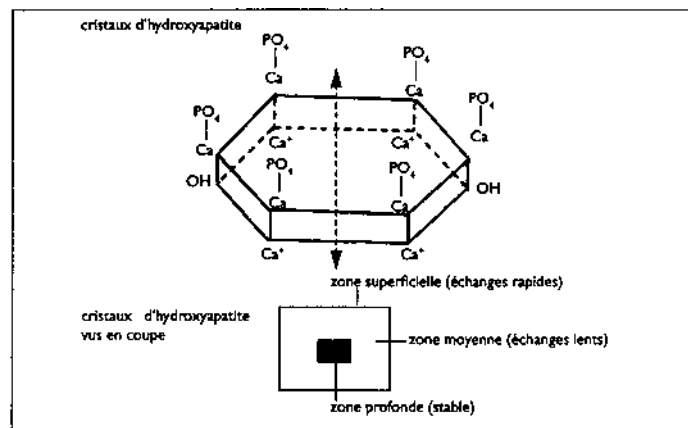


Schéma 11 : Cristaux d'hydroxyapatite de calcium

La minéralisation dans l'os est un phénomène dirigé par les cellules osseuses. Certains constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène semblent contrôler la formation du cristal initial (nucléation) et/ou réguler la taille, la morphologie et l'orientation des cristaux (croissance et multiplication) [16]. De plus, ces derniers comme nous l'avons vu précédemment, vont notamment jouer un rôle de réservoir de calcium. Ceci sera possible par

l'intervention de processus de capture ou de relargage de phosphate de calcium entre la surface du cristal (échanges lents ou rapides) et le sang.

1-2. REPARATION OSSEUSE

Comme l'ensemble des tissus mous, le squelette est exposé à de nombreux traumatismes internes ou externes. Ces derniers sont principalement de deux types :

- des lésions sans gravité pour le tissu, qui seront réparées par les processus physiologiques de cicatrisation,

- des lésions trop importantes qui malgré une réossification spontanée ne se cicatrise pas complètement. Dans ce dernier cas, l'intervention chirurgicale est indispensable.

Les pertes d'origine traumatique sont le plus souvent dues à des accidents [17] qui provoquent des fractures compliquées, ouvertes, dévitalisées et parfois considérablement souillées. Elles s'accompagnent souvent de lésions sévères des tissus mous environnants. Les pertes non traumatiques de substance osseuse sont consécutives à l'ablation chirurgicale de tissu osseux pathologique mais aussi à des phénomènes d'ostéoporose avancée chez certaines femmes ménopausées. Il peut aussi s'agir de tumeurs [18 - 20], de sites d'infection osseuse [21], mais également de tissu nécrotique au voisinage immédiat d'articulations prothétiques, en particulier des prothèses totales de hanche [22]. La perte de substance osseuse peut aussi être imposée par une correction orthopédique chirurgicale (ex : traitement d'un *genu valgum*, d'une scoliose) [23, 24]. A chaque fois, l'os manquant doit être substitué par un matériau offrant des conditions de comblement et de cicatrisation satisfaisantes, associées à des qualités mécaniques optimales [25, 26].

1-2.1. CICATRISATION OSSEUSE

Quels que soient les traumatismes subis par le tissu osseux, les mécanismes de la cicatrisation vont suivre des schémas similaires. L'os va, en général, guérir spontanément. Le processus de guérison peut se décomposer en quatre étapes successives [27, 28] (Schéma 12).

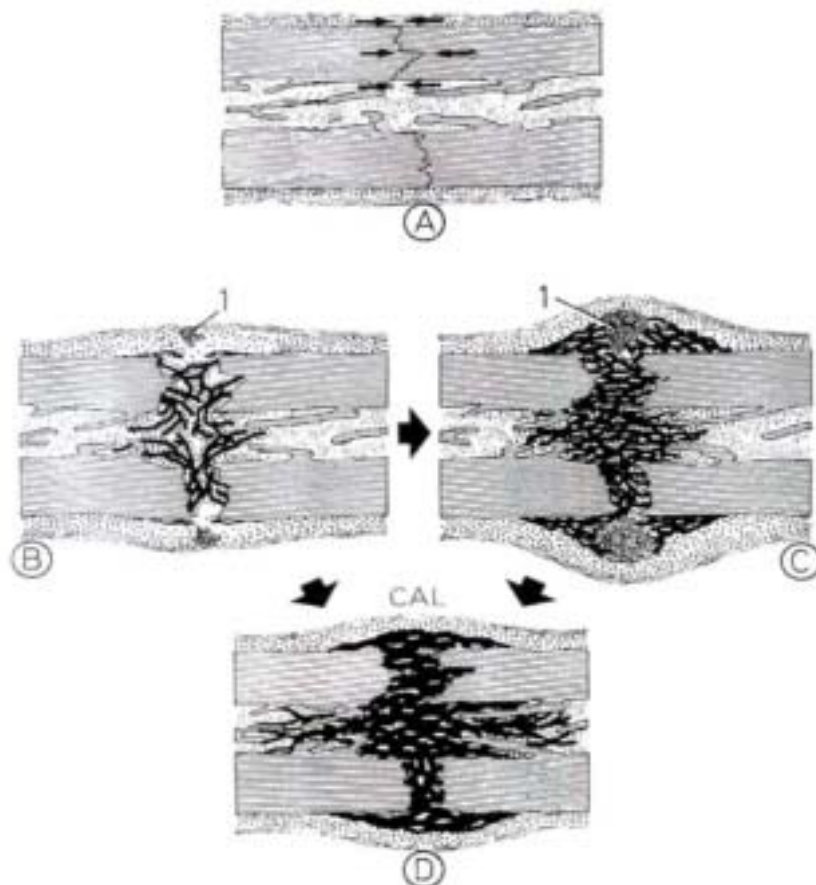


Schéma 12 : Processus de régénération du tissu osseux

Dans les premières quarante huit heures, une réaction inflammatoire aspécifique a lieu. Lors de la fracture ou de la résection, les lésions occasionnées aux capillaires, présents dans les tissus concernés (conjonctif, osseux etc...), vont conduire à la formation d'un hématome appelé aussi tissu de granulation (Schéma 12 A). Cet hématome sera le siège d'une forte activité cellulaire, avec notamment la différenciation de cellules souches conjonctives multipotentes en fibroblastes. Toutes ces cellules de l'inflammation vont permettre le nettoyage de la plaie (Schéma 12 B). Très rapidement, le mécanisme de réparation osseuse va se mettre en place plus spécifiquement. De nouvelles cellules multipotentes, susceptibles de

se différencier en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes, vont ainsi s'associer aux fibroblastes déjà présents dans l'hématome.

Cette zone, englobant maintenant les deux extrémités de l'os fracturé, s'appelle le cal fibro-cartilagineux [2, 29]. L'os se nécrose superficiellement et la prolifération des cellules conjonctives aboutit à la formation d'une trame protéique (Schéma 12 C).

De la quarante huitième heures à la troisième semaine, la prolifération fibroblastique sur la trame protéique conduit à la transformation de l'hématome en tissu fibreux. Peu à peu les fibroblastes vont laisser la place à des chondroblastes. Ces derniers apparaissent tout d'abord à la périphérie du cal et vont, au terme de la troisième semaine, l'envahir dans son intégralité (Schéma 12 D).

La troisième phase s'étend de la quatrième semaine au troisième mois. Durant cette période, le cal cartilagineux va peu à peu s'ossifier. Ceci s'effectue tout d'abord par métaplasie (ou différenciation) des chondroblastes en ostéoblastes, puis par une prolifération ostéoblastique à partir des différentes sources osseuses que sont le périoste, l'endoste et l'os cortical. A ce stade, l'os est peu organisé : il est appelé os primaire ou « *woven bone* ».

Enfin, un remaniement pouvant durer de trois mois à cinq ans transforme l'os primaire en os trabéculaire puis en os cortical. Ces deux dernières étapes non représentées sur le Schéma 12 correspondent à une évolution lente du cal jusqu'à une réparation complète de l'os.

Enfin, il est indispensable que la zone concernée ne subisse aucune contrainte mécanique. En effet, ces phénomènes, réversibles en cas de déplacement, entraînent la non-consolidation de certaines fractures [22, 30, 31].

Ces mécanismes s'effectuent conjointement à des processus de vascularisation [32]. Cette irrigation va permettre, en tout point du cal, un apport en oxygène et en métabolites indispensables. Ceux-ci comblent les besoins des ostéoblastes en croissance et favorisent ainsi l'ostéogenèse [33].

Cette chronologie de la réparation tissulaire laisse entrevoir la complexité des processus de synthèse et des cycles de régulation qui leur sont associés au niveau cellulaire. Ces phénomènes impliquent l'intervention de nombreuses molécules telles que des cytokines, des facteurs de croissance spécifiques de l'os [34] et d'autres signaux modulables par les cellules (protéines morphogènes, protéines non collagéniques) [35 - 37].

1-2.2. COMBLEMENT OSSEUX

Dans certaines conditions, les processus de cicatrisation spontanée sont insuffisants [38, 39]. Différentes solutions alternatives s'offrent alors pour combler le déficit osseux.

Des greffes d'os peuvent être utilisées, comme les autogreffes, les allogreffes ou les xénogreffes ; elles permettent de reconstituer du tissu osseux à partir d'os préexistant. Ces greffes posent néanmoins plusieurs problèmes que nous aborderons par la suite.

Il est aussi possible d'utiliser des biomatériaux. Ces derniers devront respecter le mieux possible un cahier des charges reprenant la plupart des propriétés du tissu osseux. Les biomatériaux actuellement utilisés sont de deux types : minéraux et organiques. Cependant des recherches sont en cours pour favoriser l'émergence d'une nouvelle famille de biomatériaux correspondant à l'association de matériaux déjà existant avec des molécules biochimiques naturelles ou synthétiques susceptibles d'optimiser leurs propriétés régénératrices.

1-2.2.1. LES GREFFES

La greffe d'os a été le premier geste chirurgical effectué dans le but de traiter une perte de substance osseuse. Elle est très répandue : plus de 200 000 greffes d'os, de tout type sont réalisées chaque année aux Etats-Unis [30, 40].

En fonction de la provenance des greffons une terminologie différente est utilisée. Le terme d'autogreffe est employé lorsque le donneur et le receveur sont le même individu ; l'allogreffe est issue d'un individu de la même espèce ; la xénogreffe est une greffe fournie par un sujet d'une espèce différente de celle du receveur.

Les autogreffes constituent par nature la démarche de choix pour assurer le comblement des pertes osseuses. Elles répondent de manière presque idéale au cahier des charges des matériaux de comblement osseux. Cependant leur utilisation reste restreinte. Ceci est dû à la lourdeur des techniques nécessaires à leur mise en œuvre, et au fait qu'elles ne conviennent qu'aux petits traumatismes localisés [22, 41]. L'autogreffe spongieuse est toutefois le matériau de comblement idéal : il est vivant, ostéoinducteur, ostéoconducteur, s'intègre parfaitement et garantit une parfaite biosécurité pour le patient. Il faut néanmoins lui reprocher son faible volume disponible et ses piètres qualités mécaniques.

L'allogreffe, aussi appelée os de banque, est un matériau dévitalisé, potentiellement immunogène. En l'utilisant, un phénomène de rejet est envisageable et sa gestion est parfois difficile, après intégration. La zone de contact greffon/os greffé constitue une zone de faiblesse. Le greffon n'est revitalisé que tardivement et de façon partielle. En effet, lorsque le volume de l'allogreffe est important les phénomènes de revascularisation ne se produisent qu'en périphérie du greffon provoquant au cœur un déficit de revascularisation. Dans l'intervalle, le greffon se déminéralise et reste fragile sur le plan mécanique [14, 42, 43].

Les xéno greffes constituent une piste d'autant plus intéressante qu'à l'heure actuelle, des traitements originaux semblent pouvoir les rendre non immunogènes sans compromettre leurs propriétés mécaniques [44].

Enfin, malgré de grandes précautions dans la sélection des donneurs et dans les méthodes de stérilisation, la transmission potentielle d'agents infectieux, conventionnel ou non, ne peut être ignorée. Le matériel de greffe osseuse est potentiellement contaminant [45]. S'il semble possible de s'affranchir des risques viraux [26], les agents infectieux non-conventionnels (AINC) résistent aux processus de stérilisation physiques et chimiques. Les seuls modes opératoires permettant d'arriver à les détruire sont très agressifs et conduisent à l'altération du tissu osseux. L'utilisation des os de banque ne permet donc pas de s'affranchir des multiples problèmes d'innocuité [46].

1-2.2.2. CAHIER DES CHARGES DES BIOMATERIAUX DE COMPLEMENT OSSEUX

Pour pallier tous les problèmes liés aux insuffisances des greffons d'origine naturelle, des biomatériaux destinés à être implantés en site intra-osseux ont été créés. Cependant afin de mimer la structure et la fonctionnalité d'un os naturel, ces substituts devraient obéir au cahier des charges correspondant au tissu qu'ils remplacent. Ils doivent présenter un certain nombre de caractéristiques [47, 48] dont certaines sont indispensables. Ainsi ils doivent être :

① - biocompatibles, à savoir être tolérés par l'organisme et les tissus du site d'implantation à court, moyen et long terme ; de même, lorsqu'elle doit être envisagée, leur dégradation ne doit pas conduire à la libération de dérivés toxiques.

② - ostéoconducteurs, ce qui signifie qu'ils servent de support physique au processus d'ostéogenèse.

③ - ostéoinducteurs, c'est-à-dire qu'ils induisent la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules ostéoprogénitrices et éventuellement (c'est encore à l'étude) favorisent l'ostéogenèse.

④ - bioactifs, c'est-à-dire être en mesure de déclencher ou de moduler certains processus biologiques en relargant des composés spécifiques des molécules naturelles, par exemple.

Si différents biomatériaux (minéraux ou organiques) possédant une ou plusieurs de ces caractéristiques (biocompatibilité, ostéoconduction) sont connus, le biomatériau idéal satisfaisant tous ces impératifs n'existe actuellement pas. Ce sont les notions d'ostéoinduction et de bioactivité qui font l'objet des recherches les plus récentes. Nous en ferons état dans la suite de cette présentation bibliographique.

1-2.2.3. BIOMATERIAUX

Le comblement des déficits osseux, quelle qu'en soit l'origine, peut également faire appel à des substituts non osseux, non apparentés aux greffes mais qui répondent en partie au cahier des charges décrit précédemment. Un large éventail de matériaux d'origine synthétique ou semi-synthétique a fait l'objet d'études depuis la fin des années cinquante. Ils sont employés pour combler "physiquement" les pertes de substance osseuse. Ces matériaux, principalement ostéoconducteurs ne permettent pas de réaliser un comblement osseux au sens strict, mais ils assurent une stimulation locale de l'ostéogenèse.

1-2.2.3.1. LES BIOMATERIAUX INORGANIQUES

Tous les substituts minéraux de l'os sont à base de calcium. Actuellement il existe différents dérivés minéraux commercialisés : des bioverres [49], des squelettes coralliens (d'origine naturelle ou synthétique) traités industriellement [50 - 53] des céramiques [20, 54 - 56] ou des ciments [57, 58]. Les céramiques destinées au comblement osseux sont biphasiques et associent en général l'hydroxyapatite (majoritaire) et des phosphates tricalciques [2] (Schéma 13).



Schéma 13 : Biomatériaux d'hydroxyapatite

La principale caractéristique biologique de ces substituts est d'être ostéoconducteurs. Ces matériaux sont capables d'être liés au tissu osseux sans interposition de tissu fibreux. Toutefois, la nature de l'interaction biomatériau-tissu osseux n'est pas encore parfaitement cernée.

- Les bioverres : des expériences poussées sur des primates ont permis de caractériser l'intérêt de ce type de matériau qui s'incorpore parfaitement dans le tissu osseux au contact du tissu conjonctif en empêchant l'évolution de l'épithélium fonctionnel [49]. De plus l'évolution en orthopédie des différentes technologies autour de ces bioverres a permis de fabriquer des prothèses extrêmement résistantes pouvant s'adapter au niveau d'articulations soumises à de fortes contraintes telle que la hanche.

- Les squelettes coralliens sont essentiellement composés de carbonate de calcium à l'état cristallin sous forme d'aragonite, et d'un nombre réduit d'acides aminés [55]. L'architecture et la porosité du matériau dépendent de l'espèce considérée (Porites, Lobophyllia, Acrospora...). En revanche, la biocompatibilité et l'intégration en site osseux sont correctes pour tous les types de coraux [50, 51, 59].

- Les céramiques de phosphates de calcium sont obtenues par frittage (séchage, calcination et broyage à haute température (1100 à 1300°C) pour éliminer les impuretés telles que les traces de nitrate d'ammonium). La macroporosité résulte du mélange de la poudre de phosphate de calcium avec des agents porogènes, qui seront éliminés après frittage par sublimation. Ceci permet de réaliser des matériaux à partir de particules calibrées, en contrôlant la densité et la porosité [60].

Ces matériaux vont être soumis lors de leur utilisation, à des contraintes de dégradation liées au milieu biologique (phagocytose après dissolution extracellulaire). L'HAP, peu soluble, est dégradée très lentement. Le β -TCP est plus soluble et plus rapidement résorbé par les macrophages. La vitesse de dégradation des céramiques biphasées associant HAP et TCP est donc liée aux proportions relatives des deux composants. Il faut noter que la phagocytose des particules de céramiques phosphocalciques par les macrophages ne déclenche pas d'activation des ostéoclastes [48, 54]. Le Schéma 14 représente un biomatériau associant HAP et TCP, solution au remplacement de la tête fémorale.



Schéma 14 : Couverture de tête fémorale constituée d'un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique

Dans un second temps, l'os néoformé et la céramique sous-jacente sont résorbés sans discrimination par ostéoclasie. Le matériel éliminé est ensuite remplacé par de l'os lamellaire [54]. Ces céramiques biocompatibles sont ostéoconductrices. En revanche, leurs qualités mécaniques peuvent varier considérablement [60].

- Les ciments phosphocalciques représentent des solutions alternatives pour le comblement de pertes osseuses. Les ciments de phosphates de calcium ou ciments "hydrauliques" durcissent en milieu humide, sans échauffement. Ils résultent de l'action d'une base sur un acide à l'origine de la constitution d'un mélange pâteux. La phase phosphocalcique qui précipite est différente de celle en suspension dans la pâte. Les propriétés mécaniques de

ces ciments sont fortement dépendantes de la stœchiométrie de la réaction et en particulier de la non-dilution de la pâte dans le site opératoire [61]. L'intérêt d'employer des ciments tient à leur plasticité temporaire, qui permet de les modeler pour les adapter le mieux possible à la forme de la perte de substance [57]. Des études sont conduites actuellement dans le but de renforcer les qualités mécaniques des ciments hydrauliques [61].

1-2.2.3.2. LES BIOMATERIAUX ORGANIQUES

Un certain nombre de polymères ont été évalués en tant que substituts de greffe osseuse [26, 63 - 66].

- Les poly (α -hydroxyacides) dérivés des acides lactiques (PLA) et/ou glycolique (PGA) sont connus depuis plus d'une vingtaine d'années comme constituants de fils résorbables.

Actuellement, la chimie de ces polymères permet de produire des systèmes résorbables PLA/PGA sous forme de poudres, de pâtes visqueuses, de films et de blocs possédant des qualités mécaniques et des vitesses de dégradation très variables. Les PLA/PGA sont biodégradables et biorésorbables. Ils sont hydrolysés au contact des liquides interstitiels et les produits de dégradation sont métabolisés ou excrétés par voie rénale [63]. Cependant leur application au comblement osseux soulève des problèmes impliquant leur processus de dégradation chimique et la réaction inflammatoire subséquente. En effet, l'hydrolyse des PLA/PGA est une réaction acide, qui donne naissance à des composés eux-mêmes acides. Ces derniers induisent ainsi un processus chimique auto-entretenu.

Ce phénomène chimique conduit à une dégradation préférentielle et accélérée du cœur des pièces massives dont le pH chute sensiblement. Lorsque la surface de l'implant est à son tour dégradée, elle s'effondre et la partie centrale est mise en contact avec les tissus avoisinants. Ceci déclenche alors une réaction inflammatoire posant un problème important lors de l'utilisation des implants (vis, broches, plaques) en PLA/PGA [67-69].

Des essais d'imprégnation de polymères de PLA/PGA à rôle structurel avec des protéines morphogènes ont également été réalisés, mais les études s'y rapportant sont peu nombreuses [68, 70].

- Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) expansé (Gore-Tex[®]) peut être utilisé sous la forme de membranes dans lesquelles est manchonné un déficit segmentaire de façon à protéger et orienter les phénomènes d'ostéogenèse [71 - 73]. L'utilisation de BMP en

association avec ces membranes de PTFE a été explorée *in vivo* sur des pertes de substance osseuse mandibulaire chez les rongeurs. Les premiers résultats sont encourageants quant à la colonisation et à l'orientation de la prolifération des cellules osseuses à la surface du biomatériau [74]. Il semblerait que cette association protéine-matériau favorise la colonisation de la surface du support par les cellules osseuses.

- Autres polymères : Des études sont en cours sur des biomatériaux polymères mais aussi sur leurs monomères constitutifs. En effet, le principe d'utilisation des monomères susceptibles de se polymériser par induction (chimique ou photochimique), a déjà été mis à profit en odontologie. Afin de restaurer des pertes de substance, des comblements par des résines acryliques autopolymérisables ou des résines composites photopolymérisables sont pratiqués. Dans les deux cas, il est indispensable d'associer aux monomères utilisés des molécules secondaires comme des initiateurs (camphroquinone) qui favorisent l'amorçage de la réaction de polymérisation. Cette technique permet, en quelques minutes, d'obtenir un matériau de comblement parfaitement adapté à la zone lésée [75]. Cependant la composition chimique de ces matériaux et leurs caractéristiques physico-chimiques n'en font que des matériaux de restauration temporaire, ils sont rapidement dégradés par les enzymes présentes dans la salive.

Pour finir nous aborderons la famille des hydrogels et plus particulièrement des polymères cellulotiques. La cellulose est le polymère naturel le plus rencontré au monde (cellule végétales, procaryotes). Ce polysaccharide, de part ses propriétés physico-chimiques possède de nombreuses applications notamment médicales pour la confection de membranes de dialyse. Son emploi est envisagé comme matériau de comblement osseux. Ces premières applications en chirurgie orthopédique ont été en tant que matériau de scellement de prothèse [76]. En effet, ce polysaccharide est biocompatible avec les tissus biologiques et les fluides de l'organisme [77-79].

La cellulose est un polymère peu biodégradable et qui n'est pas digéré *in vivo* par les systèmes enzymatiques humains. De plus, c'est un matériau antithrombogène qui possède une activité anticoagulante [80-81]. Cependant il n'est constitué d'aucune protéine favorisant l'adhésion cellulaire et même si dans le domaine du comblement osseux, les propriétés d'ostéoconduction ont pu être validées, l'ostéointégration complète n'a pas pu être observée [82].

Afin d'améliorer ces propriétés d'ostéointégration voire de développer des propriétés d'ostéoinduction, la cellulose a été phosphorylée, formant ainsi des esters d'acide phosphorique [83]. Cette modification a conféré à la cellulose phosphate (CP) la possibilité de se minéraliser [84] ainsi que la possibilité de jouer un rôle de "réservoir" de molécules bioactives [78, 85].

Tout d'abord la cellulose phosphatée permet la nucléation à sa surface d'apatite [86, 87] ou d'HAP [88, 89] selon qu'elle est associée ou pas à du calcium. Ceci la rend particulièrement intéressante comme matériau de comblement osseux favorisant après implantation la minéralisation de la zone lésée [90].

La cellulose phosphate peut aussi être utilisée comme support de substances bioactives. Un intérêt majeur de ce polysaccharide est d'être susceptible de réagir chimiquement avec des molécules biologiquement actives donnant lieu à des systèmes stables pharmacologiquement inertes et non-toxiques [78, 91]. Ceci peut avoir deux intérêts : la fixation covalente à la surface de la CP de molécules ou macromolécules dans l'optique de favoriser l'intégration de ce matériau dans les tissus, mais aussi, *via* sa nature hautement hydrophile [92] permettre la délivrance contrôlée *in vivo* de substances bioactives.

Si les matériaux cités ci-dessus sont ostéoconducteurs [93], aucun n'est ostéoinducteur [94, 95]. L'amélioration des propriétés d'ostéoinduction peut-être apportée par l'association au matériau de facteurs de croissance ou de facteurs ostéogénétiques (**Bone Morphogenic Proteins BMPs**) [14, 49]. Les difficultés de mise en place de cette stratégie ainsi que son manque de reproductibilité ont conduit à choisir de nouvelles substances ostéoinductrices. De nombreux travaux sur la matrice extracellulaire et les mécanismes d'adhésion ont permis d'isoler une séquence peptidique de trois acides aminés présente dans la plupart des protéines de la MEC. Ainsi, ce tripeptide **RGD** a pu être greffé à la surface des matériaux notamment dans le but de modifier leurs propriétés adhésives vis-à-vis des cellules ; nous y reviendrons dans le paragraphe suivant.

1-2.2.3.3. LES MATERIAUX OSTEOINDUCTEURS

Les premières recherches sur les mécanismes d'ostéoinduction ont amené Urist à identifier des molécules provenant de la déminéralisation d'os et susceptibles de stimuler les processus d'ostéogenèse [14]. Ces molécules ou BMPs appartiennent à la superfamille du Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Les BMPs sont des facteurs morphogènes et mitogènes, c'est à dire induisant la différenciation de cellules souches et leur division par mitose. Elles ont été révélées comme agent inducteur de tissus chondro-osseux à partir de cellules mésenchymateuses puis comme agent inducteur des processus d'ossification [96, 97]. Leur association par adsorption sur un matériau a été rapidement envisagée dans le cadre d'importantes fractures mais n'a pas donné de résultats concluants ; des systèmes de délivrance synthétiques se sont alors avérés nécessaires [98, 99]. L'utilisation de BMPs au sein de ciments d'hydroxyapatites a montré une très bonne biocompatibilité ainsi qu'une bonne ostéoinduction [100]. Les applications potentielles des BMPs sont très vastes [41, 43, 101] et certaines de ces protéines ont été reproduites par génie génétique. Cependant le coût de leur fabrication est très élevé et il n'est pas encore possible de garantir leur totale innocuité du fait de leurs propriétés mitogènes.

Ces paramètres ont amené les chercheurs à identifier des molécules beaucoup plus petites et plus faciles à associer au biomatériau. Ainsi des études ont été effectuées sur de nombreuses protéines composant la matrice extracellulaire (cadhérines, fibronectine etc...).

Une séquence peptidique commune à l'ensemble de ces protéines a pu être d'identifiée la séquence RGD (Arginine, Glycine, acide Aspartique) [102]. Les travaux sur ce peptide ont permis de définir son rôle promoteur sur l'adhésion des cellules endothéliales [103]. Puis, il a été établi que cette séquence était l'unité fonctionnelle minimum induisant l'attachement des cellules. Cette localisation au sein des protéines d'adhésion a ouvert une nouvelle voie dans la reconnaissance des mécanismes moléculaires d'adhésion cellulaire [104, 105]. Des observations récentes avancent que la spécificité pourrait résider dans la conformation du tripeptide RGD et le rôle des séquences environnantes serait de pousser ces peptides à adopter une conformation appropriée. Il est connu que les séquences RGD peuvent prendre différentes conformations dans différentes protéines [106]. Au cours de ces dernières années, des études ont été effectuées sur l'adhésion de différents types de cellules sur des matériaux polymères. Ceci est réalisé par immobilisation covalente des peptides de type

RGD. Ces essais ont été essentiellement effectués sur des matériaux destinés à la substitution vasculaire (PET, PTFE, PVA, polyuréthanes) [107 - 109]. Dans le cadre des matériaux de comblement osseux des travaux de recouvrement de surface par adsorption ont été réalisés par dépôt de peptides de type RGD [110].

Parallèlement, certains travaux visent à modifier la nature de la fixation de la molécule d'intérêt biologique sur le biomatériau. Des techniques de fixation covalente ont été développées : ceci implique l'utilisation de matériaux possédant une surface réactive d'un point de vue chimique. De plus, il est indispensable dans ce type de stratégie de concevoir un système organique permettant d'exposer la molécule d'intérêt, aux cellules. Ainsi, des peptides de type RGD ont pu être greffés de façon covalente, par l'intermédiaire d'un bras espaceur dont la longueur a été optimisée, sur un polymère de (méthyl)métacrylate [111-113].

Ce type d'approche, par modification chimique de la surface d'un matériau, a aussi été abordé dans le domaine des substituts vasculaires, avec un greffage covalent d'analogues du site actif de l'héparine sur du polyfluorure de vinylidène. Ce type de travail a notamment servi de support stratégique à la réalisation de notre projet de greffage sur le PVDF [114].

Aux vues des multiples études que nous venons d'énumérer, nous remarquons que l'optimisation des propriétés d'ostéoinduction des matériaux de comblement s'est déroulé selon deux axes :

- tout d'abord l'identification de substances ostéoinductrices en solution et leur minimisation de taille afin de les rendre facilement utilisables,
- l'association de ces molécules à un biomatériau soit par adsorption, soit par fixation covalente.

Ces méthodes possèdent des avantages et des inconvénients. Après le recouvrement du matériau par adsorption des molécules d'intérêt (BMPs ou peptides de type RGD) des phénomènes de relargage non contrôlé et d'échange sont observés après implantation *in vivo* [99, 100]. En termes de fixation et de maintien de la molécule d'intérêt en surface, le greffage de façon covalente semble plus satisfaisant. Actuellement les travaux conduisant à ce type de modification, concerne principalement les molécules héparine like (substituts vasculaires) et les peptides de type RGD (comblement osseux et substituts vasculaires).

Bien que ces modèles induisent l'adhésion avec une bonne spécificité cellulaire [112, 114], de nombreux champs d'investigation restent à étudier tel que des phénomènes de colonisation conjointe ostéoblastes / cellules endothéliales favorisant l'arrivée de néovaisseaux à proximité du cal osseux [115-116].

Notre travail présente l'originalité de greffer de manière covalente des métabolites utilisés par les cellules lors de leurs phases de colonisation du matériau ou de leur croissance. Nous avons donc centré nos recherches sur la mise en évidence de molécules susceptibles d'avoir une bonne affinité pour les cellules osseuses. De plus nous avons tenté d'optimiser le bras espaceur séparant la molécule d'intérêt biologique et le matériau. Cette optimisation a été menée dans deux buts bien précis :

- être chimiquement stables, exposant ainsi la molécule d'intérêt aux membranes cellulaires et lui permettant de jouer son rôle "d'agent de concentration" des cellules sur les matériaux.

- permettre la libération contrôlée des molécules supportées, sous l'action d'enzymes sécrétées par les cellules lors du contact entre ces dernières et le matériau. Différentes voies d'oxydation seraient susceptibles d'engendrer la coupure du bras espaceur libérant la molécule naturelle ou un de ses proches dérivés à proximité de la zone lésée. La molécule relarguée serait alors captée et utilisée par la cellule.

Il s'agit ici d'une approche spécifique qui nécessite une définition des cibles cellulaires pour les molécules greffées ainsi que le choix de la structure chimique du bras espaceur en tant que cible enzymatique (séquence peptidique spécifique des MMP(métallo protéases de matrice) ou lien organo-silicié oxydé par les cytochromes).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 1

- [1] Marks S.C., Hermey D.C. : The structure and development of bone. *Principles of bone biology* Ed. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A.. 1 : 3-14.
- [2] Yaszemski M.J., Payne R.G., Hayes W.C., Langer R., Mikos A.G.: Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* **1996** ; 17 : 175-185.
- [3] Buckwalter J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R., Recker R. : Bone Biology. Part 1: Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. *J. Bone Joint. Surg. (Am.)* **1995** ; 77 : 1256-1274.
- [4] Brandi M.L. : Bone endothelial cells : a tool for analyzing cell to cell interaction in skeletal tissues. *Angiogenesis: Key Principles-Science Technology Medicine*. Ed by Steiner P.B., Weisz R., Langer R. **1992** Birkhauser Verlag Basel / Switzerland.
- [5] Zaidi M. : Role of the endothelial cell in osteoclast control : new perspectives. *Bone* **1993** ; 14 : 97-102.
- [6] Glimcher M.J. : Gross and microscopic features of bone as an organ and tissue. In : Veis A, Ed. *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. Amsterdam: Elsevier, **1981** ; 620-633.
- [7] De Vernejoul M.C., Marie P. : Protéine de l'os. In : *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris : **1996** ; 3-16.
- [8] Bizios R. : Mini-review: Osteoblasts: An In Vitro Model of Bone-Implant Interactions. *Biotech. Bioeng.* **1994** ; 43 : 582-585.
- [9] Meyer U., Szulcwski D.H., Möller K., Heide H., Jones D.B. : Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cells and Materials* **1993** ; 3(2) : 129-140.
- [10] Lanyon L. : Skeletal responses to Physical Loading. In: Mundy G., Martin T., eds. *Physiology and Pharmacology of Bone*, vol 1. Berlin: Springer-Verlag, **1993** ; 485-505.
- [11] Martin T., Findlay D., Heath J., Ng K.: Osteoblasts: Differentiation and Function. In: Mundy G, Martin T, Ed. *Physiology and Pharmacology of Bone*, vol 1. Berlin: Springer-Verlag, **1993** ; 149-183.
- [12] Malaval L., Chenu C., Delmas P.D. : Protéine de l'os. In : *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris : **1996** ; 17-35.

- [13] Triffitt J.T., Owen M. : studies of bone matrix glycoproteins : incorporation of ¹⁴C glucosamine and plasma glycoprotein into rabbit cortical bone. *Biochem. J.* **1973** ; 136 : 125-134.
- [14] Urist M.R., Mikulski A., Lietze A. : Solubilized and insolubilized bone morphogenic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979** ; 76 : 1828-1832.
- [15] Delmas P.D., Russell P., Tracy B., Riggs L., Mann K.G. : Identification of the non collagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif. Tissue Int.* **1984** ; 36 : 308-316.
- [16] Bellow C.G., Aubin J.E., Heersche J.N.M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro* : the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* **1991** ; 14 : 27-40.
- [17] Tukiainen E., Asko-Seljavaara S. : Use of the Ilizarov Technique after a free microvascular muscle flap transplantation in massive trauma of the lower leg. *Clin Orthop* **1993** ; 297 : 129-134.
- [18] Clayer M, Oakeshott R : Allograft Bone in the Treatment of Desmoplastic Fibroma. A Case Report. *Clin. Orthop.* **1994** ; 300 : 219-224.
- [19] Köhler P., Kreicbergs A. : Chondrosarcoma Treated by Reimplantation of Resected Bone After Autoclaving and Supplementation With Allogeneic Bone Matrix. *Clin. Orthop.* **1993** ; 294 : 281-284.
- [20] Uchida A., Araki N., Shinto Y., Yoshikawa H., Ono K., Kurisaki E. : The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J. Bone Joint. Surg. (Br.)* **1990** ; 72(2) : 298-302.
- [21] Marsh J.L., Prokuski M.D., Biermann S. : Chronic infected tibial nonunions with bone loss. Conventional techniques versus bone transport. *Clin. Orthop.* **1994** ; 301 : 139-146.
- [22] Jones D.B., Nolte J.G. : Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast like cells. *Biomaterials* **1991** ; 3 (12) : 101-110.
- [23] Malinin T., Brown M.D. : Arthrodesis of the spine with bone allografts. In: Czitrom A.A., Winkler H, eds. *Orthopaedic Allograft Surgery*, vol 1. Vienne: Springer -Verlag, **1996**; 292.
- [24] Summers B.N., Eisenstein S.M. : Donor site pain from the ilium: A complication of lumbar spine fusion. *J. Bone. Joint. Surg.[Br]* **1989** ; 71 : 677-684.
- [25] Bahn S.L. : Plaster: A bone substitute. *Oral Surg., Oral Med. & Oral Path.* **1966** ; 21(5) : 672-681.
- [26] Damien C.J., Parsons J.R. : Bone Graft and Bone Graft Substitutes : A review of current technology and applications. *Journal of applied Biomaterials* **1991** ; 2 : 187-208.

- [27] Banks H.H.: The healing of intra articular fractures. *Clin. Orthop.* **1965** ; 40 : 17-29.
- [28] Ogisto B., Huges F.J. : Fibroblast inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* **1991** ; 146 : 442-450.
- [29] Iwaki A., Jingushi S., Oda Y., Izumi T., Shida J., Tsuneyoshi M., Sugioka Y. : Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunochemistry. *J. Bone Miner. Res.* **1997** ; 12(1) : 96-102.
- [30] Buckley M.J., Banes, A.J. : Osteoblast increase their rate of division and alignment response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone Miner.* **1988** ; 4 : 225-236.
- [31] Lanion L.E. : Control of bone architecture by functional load bearing. *J. Bone Miner. Res.* **1992** ; 7 : S369 : S375.
- [32] Rhinelander F.W., Wilson J.W. : Blood supply to developing, mature and healing bone. In: Sumner-Smith G, ed. *Bone in clinical orthopedics.*, vol 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company, **1982** ; 435.
- [33] Tuncay O., Ho D., Barker M. : Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **1994** ; 105(5) : 457-463.
- [34] Sandberg M., Aro H., Vuorio E. : Gene expression during bone repair. *Clin. Orthop.* **1993** ; 289 : 292-312.
- [35] Ishidou Y., Kitajima I., Obama H., Maruyama I., Murata F., Imamura T., Yamada N., Tendijke P., Miyazono K., Sakou T. : Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **1995** ; 10(11) : 1651-1659.
- [36] Shuto T., Sarkar G., Bronk J., Matsui N., Bolander M. : Osteoblasts express types I and II activin receptors during early intramembranous and endochondral bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **1997** ; 12(3) : 403-411.
- [37] Felding-Habermann B., Cheresch D. : Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1993** ; 5(5) : 864-868.
- [38] Key J.A. : The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures. *J. Bone. Joint. Surg. [Am.]* **1934** ; 16 : 176-184.
- [39] Toombs J.P., Wallace L.J., Bjorling D.E., Rowland G.N. : Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia : an experimental model for augmented bone healing studies. *Am. J. Vet. Res.* **1985** ; 46(2) : 513-518.
- [40] Kenley R.A., Yim K., Abrams J. : Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceutical Research* **1993** ; 10(10) : 1393-1401.

- [41] Nakamura K., Kawaguchi H., Aoyama I., Hanada K., Hiyama Y., Awa T., Tamura M., Kurokawa T. : Stimulation of Bone Formation by Intraosseous Application of Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor in Normal and Ovariectomized Rabbits. *J. Orthop. Res.* **1997** ; 15(2) : 307-313.
- [42] Canalis E. : Effects of growth factors on bone cells replication and differentiation. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1985** ; 193 : 246.
- [43] Sakano S., Murata Y., Iwata H., Sato K., Ito T., Kurokouehi K., Seo H. : Protooncogene Expression in Osteogenesis Induced by Bone Morphogenetic Protein. *Clin. Orthop.* **1997** ; 338 : 240-246.
- [44] Nemzek J.A., Arnoczky S.P., Swenson C.L. : Retroviral Transmission by the Transplantation of Connective Tissue Allografts. *J. Bone Joint. Surg. (Am.)* **1994** ; 76(7) : 1036-1041.
- [45] Younger E.M., Chapman M.W. : Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma.* **1989** ; 3 : 192-195.
- [46] Schena C., Mitten R., Hoefle W. : Segmental Freeze-Dried and Fresh Cortical Allografts in the Canine Femur. I. A Sequential Radiographic Comparison Over a One-Year Time Interval. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **1983** ; 20 : 911-925.
- [47] Remes A., Williams D.F. : Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* **1992** ; 13(11) : 731-743.
- [48] Frayssinet P., Fages J., Bonel G., Rouquet N. : Biotechnology, material sciences and bone repair. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **1998** ; 8 : 17-25.
- [49] Ohgushi H., Dohi Y., Yoshikawa T., Tamai S., Tabata S., Okunaga K., Shibuya T. : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996** ; 32(3) : 341-348.
- [50] Doherty M.J., Schlag G., Schwarz N., Mollan R.A.B., Nolan P.C., Wilson D.J. : Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials* **1994** ; 15(8) : 601-608.
- [51] Gao T.J., Tuominen T., Lindholm T.S., Kommonen B., Lindholm T.C. : Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral® or tricalcium phosphate cylinders. *Biomaterials* **1997** ; 18(3) : 219-223.
- [52] Okumura M., Ohgushi H., Tamai S. : Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. *Biomaterials* **1991** ; 12(4) : 411-416.
- [53] Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S. : Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996** ; 32 : 481-492.

- [54] Frayssinet P., Rouquet N., Tourenne F., Fages J., Hardy D., Bonel G. : Cell-degradation of calcium phosphate ceramics. *Cells and Materials* **1993** ; 3(4) : 383-394.
- [55] Frayssinet P., Trouillet J.L., Rouquet N., Asimus E., Autefage A. : Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials* **1993** ; 14(6) : 423-429.
- [56] Johnson K.D., Frierson K.E., Keller T.S., Cook C., Scheinberg R., Zerwerkh J., Meyers L., Sciadini M.F. : Porous Ceramics as Bone Graft Substitutes in Long Bones Defects : A Biomechanical, Histological and Radiographic Analysis. *J. Orthop. Res.* **1996** ; 14 : 351-369.
- [57] Kurashina K., Kurita H., Hirano M., Kotani A., Klein C., Groot K.D. : In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials* **1997** ; 18 : 539-543.
- [58] Yoshimine Y., Akamine A., Mukai M., Maeda K., Matsukura M., Kimura Y., Makishima T. : Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement used as a bone graft substitute. *Biomaterials* **1993** ; 14(6) : 403-406.
- [59] Guillemin G., Patat J. : Corail natutel: Biocompatibilité. Caractérisations physico-chimiques, expérimentations animales. In: Mainard D., Delagoutte J., Merle M., eds. *Actualités en biomatériaux*. Paris : Romillat, **1990** ; 151-159.
- [60] Mainard D., Delagoutte J., Wepierre G. : Les substituts de l'os: possibilités actuelles. In: Mainard D., Delagoutte J., Merle M., eds. *Actualités en biomatériaux*. Paris : Romillat, **1990** ; 128-150.
- [61] Lacout J., Mejdoubi E., Michaud P. : Ciment hydraulique à base de phosphate de calcium. In: Mainard D., Merle M., Delagoutte J., et al., eds. *Actualités en biomatériaux*. Paris : Romillat, **1996** ; 247-264.
- [62] Linkhart T., Mohan S., Baylink D. : Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* **1996** ; 19(1 suppl) : 1S-12S.
- [63] Knowles J.C., Hastings G.W., Ohta H., Niwa S., Boeree N. : Development of a degradable composite for orthopaedic use: in vivo biomechanical and histologica evaluation of two bioactive degradable composites based on the polyhydroxybutyrate polymer. *Biomaterials* **1992** ; 13(8) : 491-496.
- [64] Miyamoto S., takaoka K., Yoshikawa H., Hashimoto J., Suzuki S., Ono K. : Polylactic Acid-Polyethylene Glycol Block Copolymer. *Clin. Orthop.* **1993** ; 194 : 333-343.
- [65] Radder A.M., Davies J.E., Leenders H., Blitterswijk C. : The PEO/PBT copolymer mineralized matrix interface in vitro. *Cells and Materials* **1993** ; 3(4) : 367-376.
- [66] Radder A.M., Leender H., Blitterswijk C. : Interface reactions to PEO/PBT copolymers (Polyactive®) after implantation in cortical bone. *J. Biomed. Mater. Res.* **1994** ; 28 : 141-151.

- [67] Vert M. : Mécanismes chimiques de la dégradation des polymères biorésorbables dérivés des acides glycolique et lactique. In: Mainard D., Merle M., Delagoutte J., et al., eds. *Actualités en biomatériaux*, vol 2. Paris: Romillat, **1993** ; 23-30.
- [68] Hollinger J.O., Leong K. : Poly (α-hydroxy acids); carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* **1996** ; 17 : 187-194.
- [69] Zegzula D., Buck D., Brekke J., Wozney J., Hollinger J. : Bone Formation with Use of rhBMP-2 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2). *J. Bone Joint. Surg.* **1997** ; 79-A(12) : 1778-1790.
- [70] Yang X.B., Roach I., Clarke P., Oreffo R.O.C. : Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* **2001** ; 6 : 523-531.
- [71] Dahlin C., Linde A., Gottlow J., Nyman S. : Healing of Bone defects by Guided Tissue Regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* **1988** ; 81(5) : 672-676.
- [72] Dahlin C., Sandberg E., Alberius P., Linde A. : Restauration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **1994** ; 23(4) : 237-242.
- [73] Dyer B.L., Caffesse R.G., Nasjleti C.E., Morrison E.C. : Guided Tissue Regeneration With Dentin Biomodification. *J. Periodontol.* **1993** ; 64(11) : 1052-1060.
- [74] Zellin G., Hedner E., Linde A. : Bone Regeneration by a Combination of Osteopromotive Membranes with Different BMP Preparations: A Review. *Connective Tissue Research* **1996** ; 35(1-4) : 279-284.
- [75] Moremas M., Deschaumes C., Compagnon D. : Prothèse fixée transitoire et biomatériaux. Etat actuel des connaissances. *Cash. Prothèse* **1998** ; 104 : 5-13.
- [76] Chauveaux D., Barbié C., Barthe X., Baquey C., Poustis J. : Biological behaviour of cellulosic materials after bone implantation : preliminary results. *Clin. Mater.* **1990** ; 5 : 251-258.
- [77] Peppas N.A., Langer R. : New challenges in biomaterials. *Science* **1994** ; 263 : 1715-1720.
- [78] Dimitriu S. Dimitriu M. : Hydrogels as support for drug delivery systems. In : Dimitriu S. editor. *Polysaccharides in medicinal application*. N.Y. USA. **1996** ; 705-764.
- [79] Peppas N.A. : Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials : a review. *Biomaterials* **1996** ; 17 : 1553-1561.
- [80] Miyamoto T., Takahashi S., Ito H., Inagaki H., Noishiki Y. : Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989** ; 23 : 125-133.

- [81] Hayashi T. : Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog. Polym. Sci.* **1994** ; 19 : 663-702.
- [82] Poustis J., Baquey C., Chauveaux D. Mechanical properties of cellulose in orthopaedic devices and related environments. *Clin. Mater.* **1994** ; 16 : 119-124.
- [83] Charpentier G., Urbain G. : Action des solutions d'acide ortophosphorique sur la cellulose ordinaire. *CR Acad. Sci.* **1933** : 930-933.
- [84] Dalas E., Kallistis J., Koutsoukos P.G. : The growth of sparingly soluble salts in polymeric substrates. *Colloid surfaces* **1991** ; 7 : 1822-1826.
- [85] Lagoa R., Murtinho D., Gil M.H. : Membranes of cellulose derivatives as support for immobilization of enzymes. In Iman S.H., Greene R.V., Zaidi B.R. editors. *Biopolymers. Utilizing nature's advanced materials*, ACS Symposiums series 723. **1999** ; 228-234.
- [86] Mucalo M.R., Yokogawa Y., Suzuki T., Kawamoto Y., Nagata F., Nishizawa K. : Further studies of calcium phosphate growth on phosphorylated cotton fibres. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.* **1995** ; 6 : 658-669.
- [87] Li S., Liu Q., de Wijn J, Wolke J., Zhou B., de Groot K. : In vitro apatite formation of phosphorylated bamboo. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.* **1997** ; 8 : 543-549.
- [88] Shimabayashi S., Hashimoto N., Kawamura H., Uno T. : Formation of hydroxyapatite in the presence of phosphorylated and sulfated polymer in an aqueous phase. In : Amjad Z. editor. *Mineral scale formation and inhibition. Proc. Am. Chem. Soc. Symp.* N.Y. USA. **1995** ; 154-167.
- [89] Shimabayashi S., Hashimoto N., Uno T. : Formation of hydroxyapatite in the presence of bovine serum albumine in an aqueous phase. *Phosphorus Res. Bull.* **1995** ; 5 : 19-24.
- [90] Wan Andrew C.A., Khor E., Hastings G. : The influence of anionic chitin derivatives on calcium phosphate crystallization. *Biomaterials* **1998** ; 19 : 1309-1316.
- [91] Rogovin Z.A., Virnik A.D. : In : Bikales N.M., Segal L. editors. *Cellulose and cellulose derivatives. High Polymers* **1971** ; 5 : 1333-1336.
- [92] Kim S.S., Jeong W.Y., Shin B.C., Oh S.Y., Kim H.W., Rhee J.M. : Behaviour of CHO cells on phosphated cellulose membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998** ; 40 : 401-406.
- [93] Daculsi G., Passuti N. : Bioactive ceramics, fundamental properties and clinical application : the osseo-coalescence process. *Bioceramics* **1990** ; 77A5 : 734-750.
- [94] Jarcho M. : Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* **1981** ; 157 : 259-278.

- [95] Mac David P.T., Boone M.E., Kafraivy H.A., Mitchell D.F. : Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to ceramic. *J. Dent.* **1979** ; 58 : 1487-1492.
- [96] Kamegai A., Tanabe T. : Immunohistochemical and enzyme histochemical studies in bone formation induced by bone morphogenetic proteins in mouse muscle tissue. In Suga S. ed *Mechanism and phylogeny of mineralization in biological system* Tokyo Springer Verlag **1991** ; 111-115.
- [97] Reddi A.H. : Implant-stimulated interface reaction during collagenous bone matrix induced bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **1985** ; 19 : 233-239.
- [98] Deatherage J.R. : Extraction and delivery of the bone morphogenetic factor as substitute for hydroxyapatite in osseous augmentation. *J. Am. Dent. Assoc.* **1987** ; 114 : 159-160.
- [99] Urist M.R., Nielsson O. : Bone morphogenetic protein (BMP) β tri-calcium-phosphate (TCP) composite in skull trephine defect in dog. *Clin. Orthop.* **1987** ; 214 : 295-304.
- [100] Akihida K., Norimasa S. : Bone formation under the influence of bone morphogenetic proteins / self setting apatite cement composite as a delivery system. *J. Biomed. Mat. Eng.* **1994** ; 4 : 291-307.
- [101] Wozney J., Rosen V. : Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein Gene Family in Bone Formation and Repair. *Clin. Orthop.* **1998** ; 346 : 26-37.
- [102] Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. : Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984** ; 81 : 5985-5988.
- [103] Holland J., Hersh L. : Culture of human vascular endothelial cell on RGD containing synthetic peptide attached to starch-coated polystyrene surface : comparison with fibronectin-coated tissue grade polystyrene. *Biomater.* **1996** ; 17 : 2147-2156.
- [104] Hern D.L., Hubbell J.A. : Incorporation of adhesion peptide into nonadhesion hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998** ; 39 : 266-276.
- [105] Rezaei A., Thomas C.H. : The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997** ; 37 : 9-19.
- [106] Roberts C., Chen C.S., Mrksich M. : Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)3OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998** ; 120 : 6548-6555.
- [107] Hubbell J.A., Massia S.P., Drumheller P.D. : Surface-grafted cell binding peptides in tissue engineering of the vascular graft. *Anal. Acad. Sci. New York* **1992** ; 13 : 253-258.
- [108] Walluscheck K.P., Steinhoff G., Kelm S., Haverich A. : Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur. J. Endovasc. Surg.* **1996** ; 12 : 321-330.

- [109] Massia S.P., Hubbel J.A. : Covalent surface immobilisation of RGD and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg containing peptides to obtain well defined cell adhesive substrates. *Analytical Biochem.* **1990** ; 187 : 292-301.
- [110] Verrier S., Pallu S., Bareille R., Jonczyk A., Meyer J., Dard M., Amédée J. : Fonction of linear an cyclic RGD-containing peptide in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* **2002** ; 23 : 585-596.
- [111] Kantlehner M., Finsinger D., Meyer J. : Selective RGD-Mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants. *Angew Chem. Int. Ed.* **1999** ; 38 : 560-562.
- [112] Kantlehner M., Schaffner P., Finsinger D., Kessler H. : Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblasts adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBioChem* **2000** ; 1 : 107-114.
- [113] Porté-Durrieu M.C., Labrugère C., Villars F. : Developpment of silica surface graft with RGD peptides : XPS characterization and human endothelial cells interactions. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999** ; 46 : 368-375.
- [114] Porté-Durrieu M.C., Betz N., Baquey C. : Development of heparin-like polymers using swift heavy ion and gamma radiation- part I : preparation and characterization of the materials. *J. Biomed. Mat. Res.* **2000** ; 52 : 119-127.
- [115] Zilla P., Von Oppell U., Deutsch M. : The endothelium : a key for the future. *J. Card. Surj.* **1993** ; 8 : 32-60.
- [116] Krishnaswamy G., Kelley J., Yerra L., Smith J.K., Chi D.S. : Human endothelium as a source of multifunctional cytokines : molecular regulation and possible role in human disease. *J. Interferon Cytokine Res.* **1999** ; 19 : 91-104.

DEUXIEME PARTIE :

SYNTHESE DE BIO-CONJUGUES

Les cellules, quelle que soit leur fonction au sein de l'organisme, vivent grâce aux échanges qu'elles effectuent, avec le milieu extérieur, *via* leur membrane plasmique. Ces échanges peuvent correspondre à des signaux envoyés par l'organisme pour stimuler une fonction spécifique de la cellule. Dans ce cas, le signal est une macromolécule (cytokines, hormones...) qui va venir se fixer avec une très forte affinité, sur une protéine membranaire spécifique, **un récepteur**. Cette fixation induit une cascade de réactions intracellulaires conduisant au processus physiologique désiré. Ces échanges peuvent aussi être issus des besoins que les cellules ont de puiser dans le milieu extérieur les éléments essentiels qu'elles ne sont pas en mesure de synthétiser *de novo*. Ceci est à nouveau possible par l'intermédiaire de protéines membranaires appelées **transporteurs**. Ces derniers, après une étape de reconnaissance de la molécule à incorporer permettent son importation au sein de la cellule.

Dans le cadre de notre travail nous avons privilégié les protéines de transport. Même si l'utilisation de telles protéines ne peut pas se substituer aux phénomènes naturels d'adhésion et qu'elles présentent une plus faible affinité pour leur substrat par rapport aux récepteurs, elles ont l'avantage de ne provoquer aucune réponse cellulaire. Nous sommes en droit d'espérer que la présence de molécules très affines greffées sur un matériau entraînera la concentration des cellules à sa surface ; par voie de conséquence la mise en œuvre des processus d'adhésion et de prolifération en sera favorisée. Nous avons donc recherché des molécules susceptibles d'être reconnues par des transporteurs cellulaires.

Des études bibliographiques nous ont conduits à sélectionner comme molécules d'intérêt :

- **l'acide ascorbique** qui joue un rôle important dans le développement des cellules ostéoprogénitrices en favorisant notamment leur différenciation en ostéoblastes, puis en cellules matures (ostéocytes) [1, 2]. L'acide ascorbique est aussi impliqué dans les étapes de synthèse du collagène.

- **les nucléobases** et leur éventuel transport. La multiplication des ostéoblastes au niveau des zones de fracture implique un important besoin en nucléobases puisées dans le milieu extracellulaire.

Après avoir vérifié l'existence d'un système substrat / transporteur pour l'acide ascorbique et une ou plusieurs nucléobases, nous avons axé notre travail sur le greffage de ces molécules sur un biomatériau. L'idée de fixer directement la molécule bioactive sur un support semblant problématique en terme d'accessibilité (différence de taille relative, replis de la membrane cytoplasmique, ...), il apparaissait donc souhaitable de concevoir un système susceptible d'autoriser l'exposition des molécules cibles au milieu biologique et donc aux cellules. Nous avons imaginé, à partir de la molécule d'intérêt biologique, de synthétiser tout d'abord un sila-conjugué en fixant sur la molécule d'intérêt un lien organo-silicié ; la justification de cette approche est présentée paragraphe 2-2.1.. Ce sila-conjugué serait ensuite associé à un bras espaceur conçu pour ses propriétés physico-chimiques et constituant le bio-conjugué. Pour finir, ce dernier sera greffé sur un biomatériau susceptible d'être implanté sur une zone de défaut osseux. L'ensemble de la construction est présenté Figure 1.

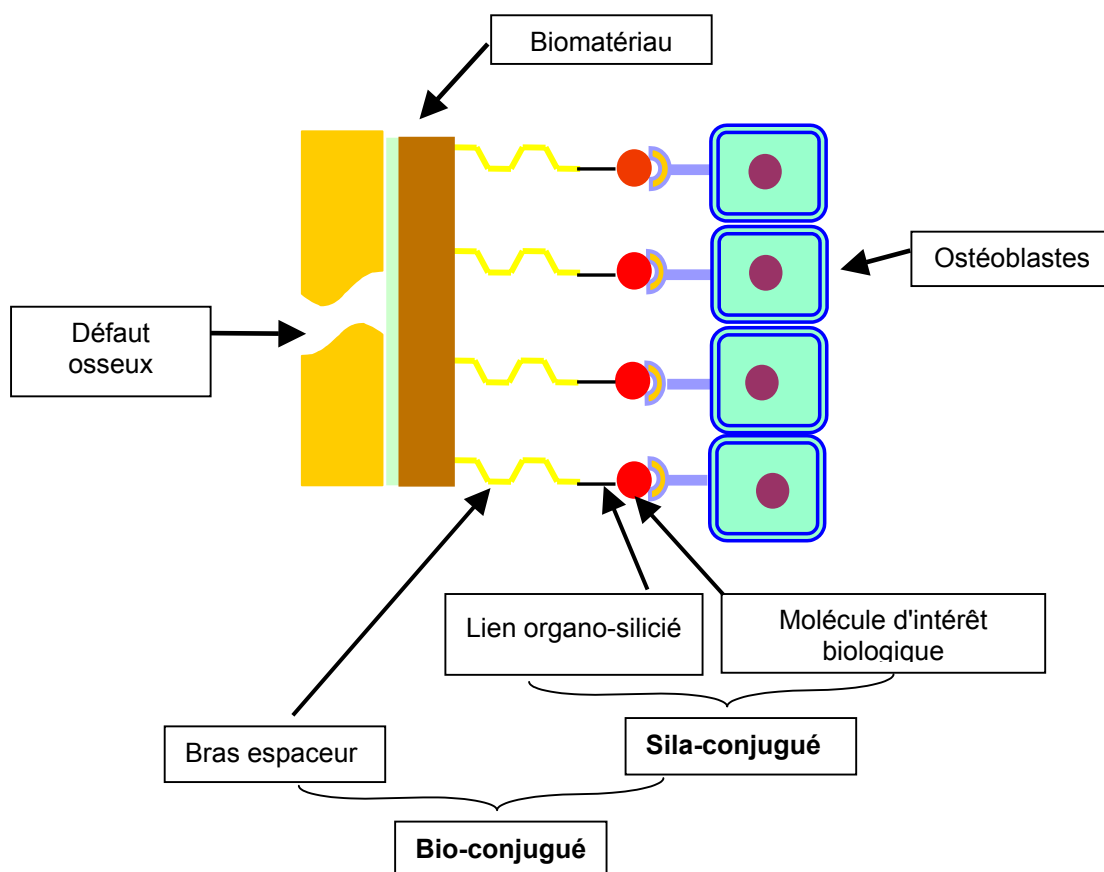


Figure 1 : Représentation schématique de l'objectif de notre travail

2-1. MOLECULES D'INTERET POUR LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE

2-1.1. ACIDE ASCORBIQUE

Les travaux ont été réalisés sur cette molécule principalement à partir de cellules osseuses provenant de souches immortalisées de rat (lignée ROS 17/2.8) ou de porc [1, 2]. Le transport de cette molécule a pu être caractérisé comme un transport actif sodium dépendant défini par un $K_m = 30 \pm 5 \mu\text{M}$ et une $V_{max} = 24,3 \pm 2,3 \text{ nmol/s}$ par gramme de protéine. Enfin, d'autres études ont souligné que la partie de l'acide ascorbique reconnue par la protéine de transport se situe au niveau des carbones 1, 2 et 3 du cycle lactonique (Figure 2). En effet, la synthèse de dérivés de l'acide ascorbique substitués en position 2 et 3 a permis de constater une forte diminution de l'activité de la molécule synthétisée par rapport à la molécule naturelle [3].

Sur la base des travaux effectués sur des cellules animales, nous avons adapté les protocoles décrits aux cellules osseuses ostéoprogénitrices humaines. Ces ostéoprogéniteurs sont issus des cellules stromales de la moelle osseuse humaine (HBMSC Human Bone Marrow Stromal Cells) et sont à un stade de différenciation ostéoblastique qui leur confère d'importantes propriétés de division et d'activité métabolique. Nous avons utilisé de l'acide ascorbique marqué au carbone 14 en position 1 (Figure 2).

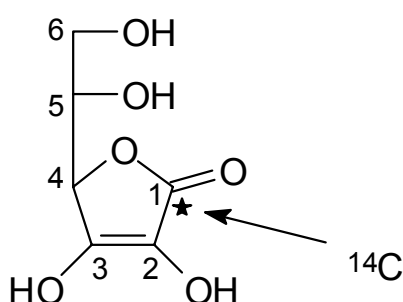


Figure 2 : Acide L-ascorbique radioactif marqué au carbone 14

Nous avons mis des ostéoprogéniteurs en présence de concentrations variables d'acide ascorbique radioactif et sur différentes durées. Ces expériences ont permis de

caractériser le transport de l'acide ascorbique à l'intérieur des ostéoblastes humains. Nous assistons à une incorporation de la radioactivité dans les cellules selon des évolutions qui sont décrites dans la Figure 3.

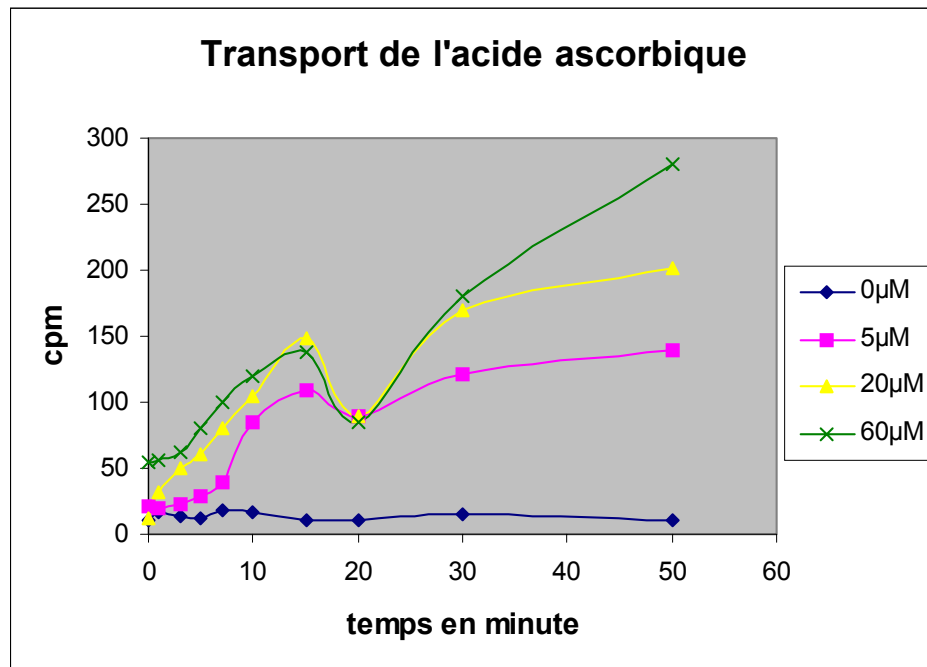


Figure 3 : Mise en évidence du transport de l'acide ascorbique au sein des ostéoblastes en fonction du temps.

Les résultats semblent mettre en évidence un processus triphasique de transport de l'acide ascorbique. En effet, entre 0 et 15 minutes nous assistons à une entrée de l'acide ascorbique marqué dans la cellule ; suit ensuite une décroissance de la quantité de radioactivité dont nous devons chercher la cause. Enfin, nous assistons à une nouvelle croissance qui semble proportionnelle à la concentration de la molécule déposée dans les puits de culture au début de la mise en contact et au temps.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'analyser les phases de croissance (0 à 15 min) et de décroissance (15 à 20 min). Les résultats d'une nouvelle expérience effectuée sur un temps plus court et en balayant une gamme de concentrations en acide ascorbique marqué plus étendue sont présentés dans la Figure 4 : ils reprennent parfaitement les résultats mis en évidence dans l'expérience précédente.

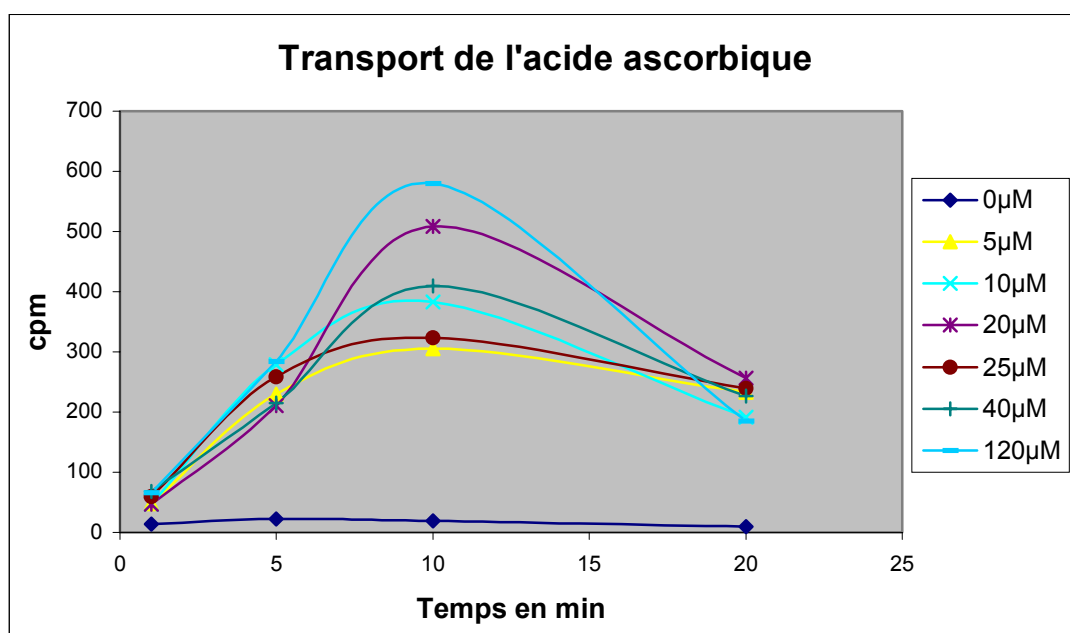


Figure 4 : Mise en évidence du transport de l'acide ascorbique entre 0 et 20 minutes.

Les courbes présentées sur la Figure 4 sont représentatives d'une entrée d'acide ascorbique dans les cellules, suivie d'une baisse de la radioactivité quelle que soit la concentration d'acide ascorbique initialement utilisée (de 5 à 120 μM). Sur cette échelle de temps il semble que le phénomène d'entrée soit indépendant de la concentration initiale de la molécule.

Nous avons cherché à expliquer les différentes étapes du phénomène mis en évidence par les résultats de ces deux expériences. La première phase de croissance correspondrait à l'entrée de la molécule marquée dans la cellule par le mécanisme de transport déjà décrit. Pour la phase de décroissance, nous avons tout d'abord imaginé qu'une partie des cellules présentes dans les puits de culture pouvait être altérée par la présence de l'acide ascorbique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déposé dans les puitsensemencés, une quantité fixe d'acide ascorbique marqué et nous avons placé l'ensemble à température ambiante pendant une heure. Nous avons ensuite lavé les puits en prenant soin de ne pas détacher les cellules et renouvelé l'expérience de transport précédemment décrite (Figure 5).

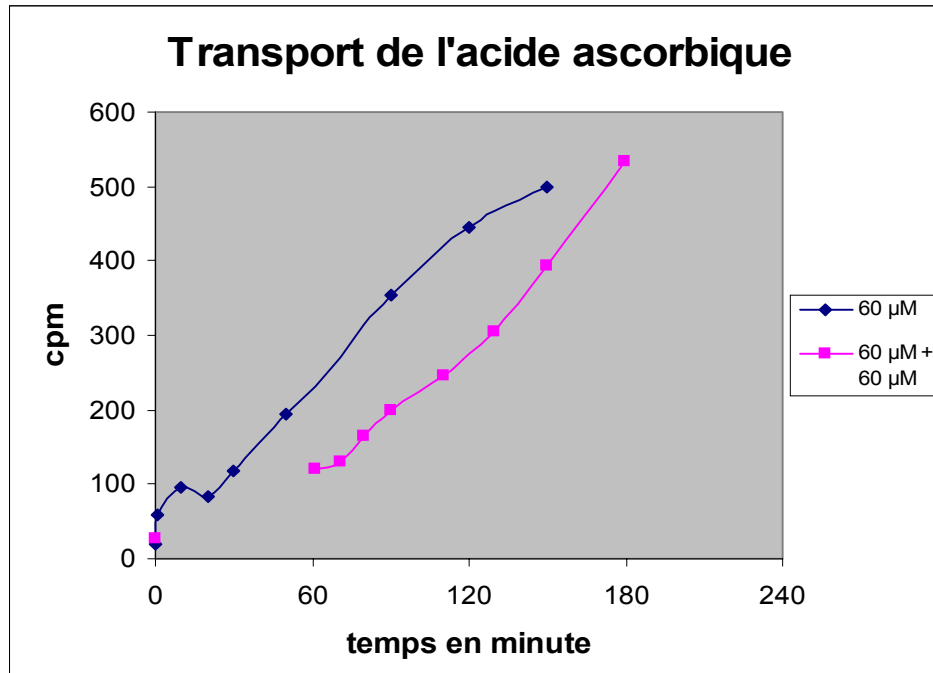


Figure 5 : Représentation du transport de l'acide ascorbique radioactif avant et après incubation des cellules avec cette même molécule.

La Figure 5 représente en bleu le comportement des cellules en présence de 60 μM d'acide ascorbique et en rose le comportement cellulaire à l'addition de 60 μM d'acide ascorbique après une heure d'incubation préalable des cellules avec 60 μM d'acide ascorbique et lavage des puits. La Figure 5 présente des courbes d'allure identiques ; ceci nous permet d'avancer que l'état physiologique des ostéoblastes n'a pas été altéré par la présence de la molécule marquée.

Nous avons alors envisagé une dégradation possible de l'acide ascorbique lors de ou après son incorporation au sein des ostéoblastes. De ce catabolisme résulterait la scission de la partie de la molécule contenant l'atome de carbone enrichi. Ce fragment radio-marqué serait alors directement relargué par la cellule et évacué lors des lavages successifs par le tampon PBS 1X (annexe).

Au sein des cellules, l'acide ascorbique joue un rôle de coenzyme pour la proline hydroxylase impliquée dans la synthèse du collagène [4]. L'acide ascorbique est un agent réducteur pour l'enzyme qui se régénère ensuite par l'intermédiaire d'un autre couple oxydo-réducteur. Cependant, si après oxydation, l'acide ascorbique n'est pas réduit à nouveau, il s'accumule sous forme d'acide déhydroascorbique (DHAA). Cette accumulation, toxique

pour la cellule, induit une dégradation irréversible de l'acide déhydroascorbique en acide 2,3-dicétogulonique (2,3-DKG) [5, 6] (Figure 6).

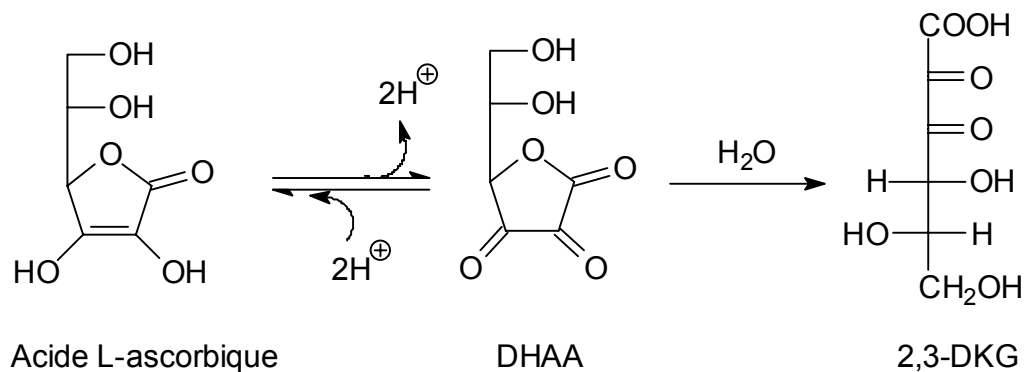


Figure 6 : Processus de dégradation irréversible de l'acide ascorbique

Ce composé est un β -céto acide susceptible de se décarboxyler en position 1 avec libération d'une molécule de CO_2 radioactive [7, 8] ; ceci rendrait compte de la diminution progressive de la radioactivité au sein des cellules (Figure 7).

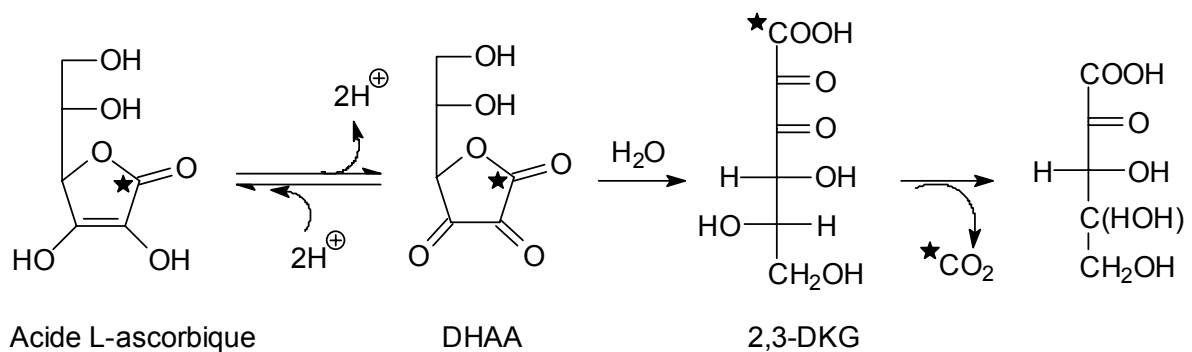


Figure 7 : Hypothèse de la disparition de la radioactivité du milieu réactionnel

Cependant d'autres études bibliographiques sur les différents intermédiaires de cette dégradation font état du fait que l'acide 2,3-dicétogulonique se retrouve, en fonction des expériences réalisées, soit dans le sang soit dans les urines [9]. Ceci pourrait signifier que cette décarboxylation ne se fait pas dans les milieux circulants de l'organisme, mais plutôt dans les cellules en présence d'une enzyme (décarboxylase) susceptible de catalyser la réaction [7].

Afin de valider une telle hypothèse, nous avons réalisé un appareillage capable de piéger un éventuel dégagement de CO₂ radioactif provenant de cellules ostéoprogénitrices en croissance mis en culture dans une boîte de Pétri de 10 cm² (Figure 8). Pour récupérer l'ensemble des gaz nous avons utilisé un flux d'argon avec un débit de 5 ml / s. Ce gaz, très dense permet de purger l'intégralité de l'enceinte A.

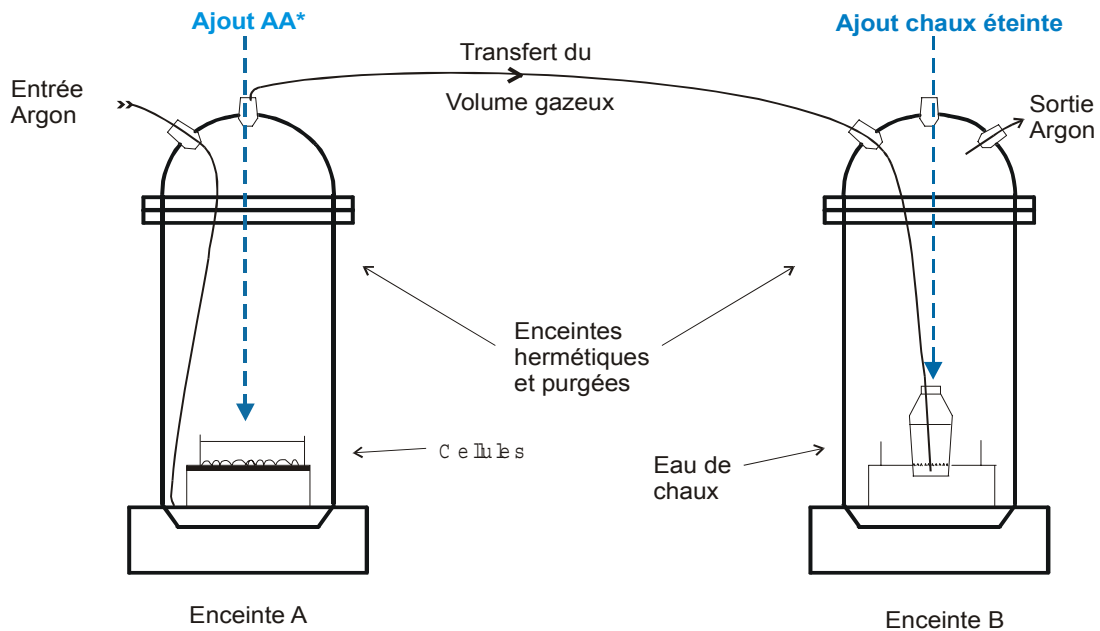


Figure 8 : Montage permettant de caractériser le dégagement de CO₂ radioactif sous flux d'argon

La mesure d'un dégagement éventuel de CO₂ radiomarqué s'effectue par piégeage au moyen d'une solution de chaux éteinte placée dans l'enceinte B. Cette expérience s'est déroulée sur une période de 4 heures.

L'expérience terminée, nous prélevons des échantillons de la solution de chaux éteinte. La radioactivité des tubes est alors déterminée. Les résultats sont présentés dans l'histogramme ci-après (Figure 9). Les valeurs données sont des moyennes d'expériences réalisées en triple exemplaires.

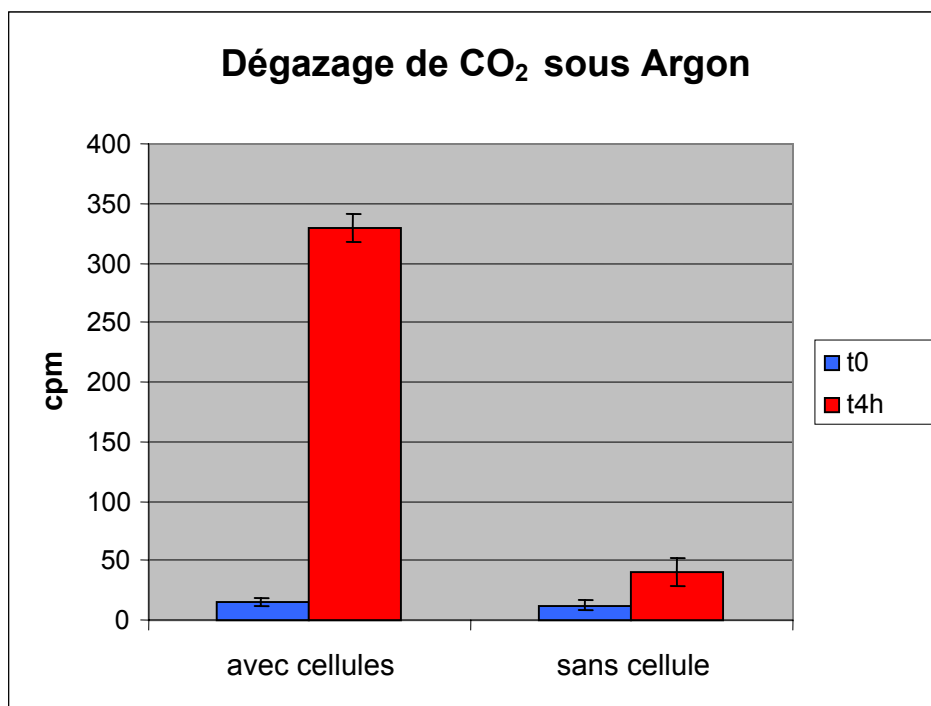


Figure 9 : Mesure du dégagement de CO₂ par les ostéoblastes sous flux d'Argon

Les résultats présentés dans la Figure 9 mettent en évidence la présence de radioactivité dans les fractions de chaux éteinte après 4 heures d'incubation des ostéoprogéniteurs avec de l'acide ascorbique. De plus, nous remarquons qu'en absence de cellules, l'acide ascorbique radiomarqué ne se dégrade pratiquement pas. Pour finir nous avons réalisé un comptage de la radioactivité présente dans les cellules lysées après l'expérience. Ce résultat non présenté dans l'histogramme (600 ± 15 cpm) valide le fait que l'acide ascorbique est bien entré dans les cellules pendant cette réaction, la radioactivité pouvant alors provenir de la molécule elle-même ou d'une de ses formes de dégradation (DHAA, 2,3-DKG) voire même de CO₂ dissout sous forme HCO₃⁻.

Cependant les raisons physico-chimiques qui nous ont incités à utiliser un flux d'argon posent des problèmes biologiques. En effet, le flux du gaz lourd va très rapidement priver d'oxygène l'enceinte A et plus ou moins le milieu tampon recouvrant les cellules. Ces dernières vont donc se trouver, dans des délais assez courts, dans un état d'hypoxie leur imposant pour survivre la mise en place de voies métaboliques anaérobies. Ce sont peut-être ces voies qui ont provoqué la dégradation de l'acide ascorbique comme source de carbone par exemple.

Nous avons donc réalisé une expérience complémentaire en introduisant un flux d'air soutenu (10 ml / s) dans les enceintes pour permettre comme précédemment, de

recupérer un éventuel dégagement radioactif. Ceci a été possible en plaçant, en premier, une enceinte pleine de chaux éteinte de façon à fixer toute trace de CO₂ contenu dans l'air.

Ce système mis en place, nous avons réitéré l'expérience décrite précédemment et nous avons obtenu les résultats présentés dans l'histogramme de la Figure 10.

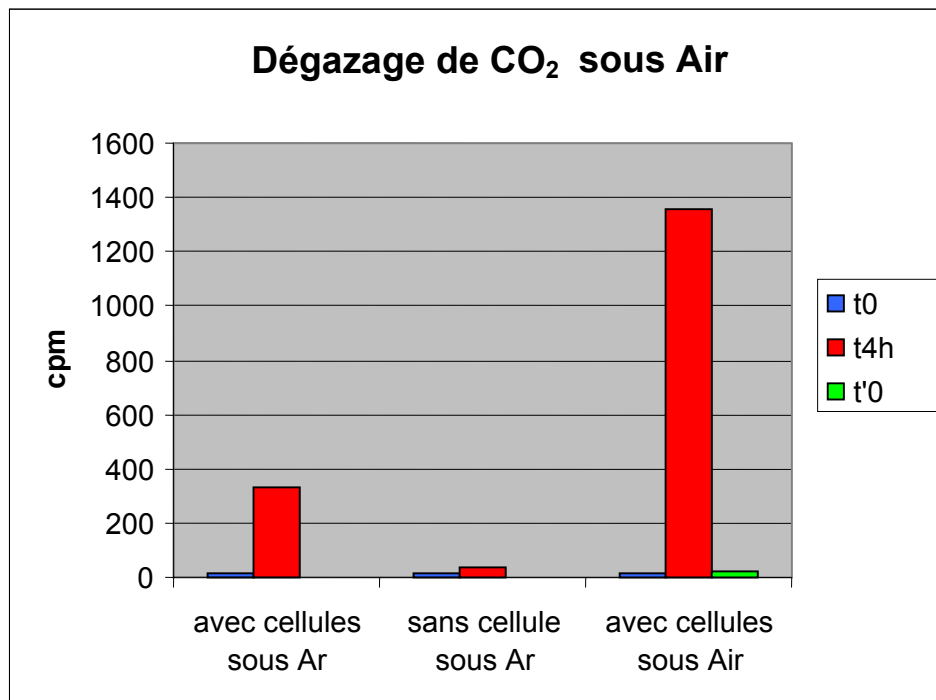


Figure 10 : Mesure du dégagement de CO₂ par les ostéoblastes sous flux d'Air

t'0 correspond à la mesure de la radioactivité initiale de la chaux éteinte de la première enceinte (filtre à CO₂), alors que t0 correspond à la mesure de la radioactivité initiale de la chaux éteinte de la troisième enceinte.

A la lecture de l'histogramme nous remarquons que la situation d'aérobie des cellules n'est pas à l'origine de la dégradation de l'acide ascorbique qui conduit au dégagement de CO₂. Nous sommes donc bien en présence d'une décarboxylation provenant de l'acide ascorbique au sein des ostéoblastes (puisque le 2,3-DKG est stable dans les urines et le sang [9]). Ceci validerait l'hypothèse de la présence et de l'action d'une décarboxylase.

Pour finir, la dernière phase de la Figure 2 qui suit l'étape de catabolisme décrite précédemment correspond à une augmentation croissante de l'entrée de radioactivité dans les cellules entre 20 et 50 minutes. Ce type de comportement cellulaire est caractéristique de la présence en grande quantité dans le milieu extérieur d'un composé (acide ascorbique). La cellule met alors en place plusieurs processus de métabolisme de l'acide ascorbique voire

de ses produits de catabolisme décrits précédemment. Par exemple, le CO₂ émis lors de la décarboxylation pourrait être simultanément utilisé comme substrat par des enzymes à biotine (carboxylases). Ceci aurait pour effet de déplacer les différents équilibres entre l'acide ascorbique et ses multiples produits de catabolisme.

2-1.2. HYPOXANTHINE

Les bases nucléiques sont des molécules d'une importance capitale pour les cellules et sont indispensables en grande quantité lors de la division mitotique [10]. De nombreux travaux ont déjà été effectués sur le transport des bases puriques notamment sur les érythrocytes humains permettant de caractériser les constantes cinétiques de chacune des bases avec plus ou moins de précisions [11]. En ce qui nous concerne, nous avons travaillé sur le transport, au sein de cellules ostéoprogénitrices humaines, de l'adénine, de l'hypoxanthine, et de la thymine. Pour l'adénine et la thymine leurs transports n'ont pas pu être caractérisés ; en effet, il semble que leur incorporation dans les cellules soit beaucoup trop rapide pour que nous puissions les suivre et les caractériser. Néanmoins, en ce qui concerne l'hypoxanthine nous avons eu des premiers résultats encourageant que nous avons décrits dans le paragraphe suivant.

2-1.2.1. CARACTERISATION DU TRANSPORT

Nous avons établi un protocole permettant de caractériser un éventuel transport de l'hypoxanthine dans les ostéoblastes au moyen d'hypoxanthine marquée au carbone 14 en position 4 (Figure 11).

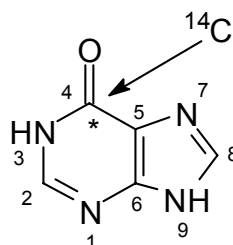


Figure 11 : Hypoxanthine radioactive marquée au carbone 14

Deux solutions différentes d'hypoxanthine marquée ($1\mu\text{M}$ et $36\mu\text{M}$) ont été mises en contact avec des cellules ostéoprogénitrices en culture [10] pendant une période de 90 minutes. A intervalle de temps réguliers, nous mesurons la quantité de radioactivité présente dans les cellules. Les résultats sont consignés dans le graphique de la Figure 12.

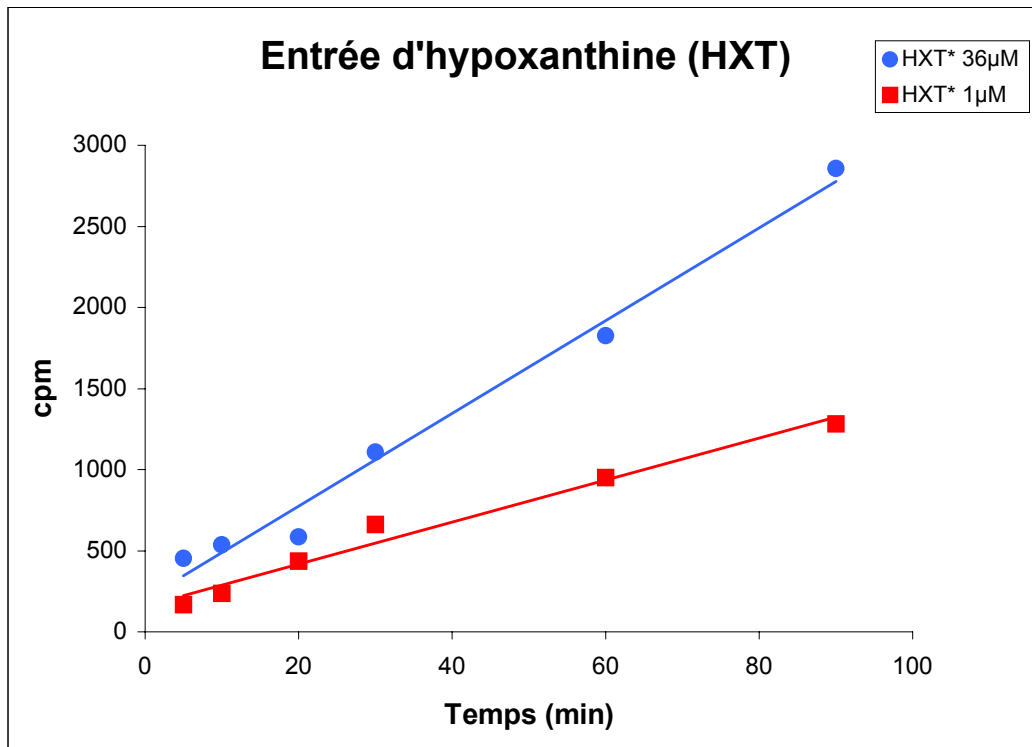


Figure 12 : Entrée de l'hypoxanthine radioactive dans les ostéoprogéniteurs en fonction du temps

Le graphique (Figure 12) montre une augmentation régulière de la radioactivité dans les cellules, en fonction du temps et de la concentration de la molécule dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène peut avoir plusieurs origines :

- une adsorption aspécifique qui conduirait à la fixation à la surface ou dans la membrane cytoplasmique (phospholipides notamment) de nombreuses molécules d'hypoxanthine. Ce phénomène peut dans certains cas faire croire à un transport actif de la molécule.

- une diffusion facilitée au travers de la membrane, dépendante du gradient de concentration en hypoxanthine de part et d'autre de cette membrane. Ce mécanisme conduirait à une rapide entrée de l'hypoxanthine jusqu'à l'équilibre des concentrations des deux côtés de la membrane cytoplasmique.

- une entrée active *via* un système de transport. Dans ce cas nous serions en présence d'une protéine dont il serait intéressant de mettre à profit les propriétés.

Afin de valider une de ces hypothèses, nous avons utilisé des composés permettant de bloquer les différentes sources d'énergie de la cellule. Nous avons associé deux composés toxiques, l'azoture de sodium (NaN_3) qui bloque le fonctionnement des mitochondries et la 3-chlorophényl mésoxalonitrile hydrazone (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP)) qui permet de perméabiliser la membrane cellulaire aux protons. Cette dernière molécule empêche la formation d'un gradient de concentration en proton entre les deux faces de la membrane cellulaire et bloque ainsi le fonctionnement des ATPsynthases. La cellule se retrouve donc dans l'incapacité de produire de l'ATP source d'énergie. Après avoir incubé les cellules en présence de ces deux composés, nous avons placé au contact des cellules la solution d'hypoxanthine marquée ($36\mu\text{M}$). Nous avons comparé les résultats obtenus en présence des agents toxiques (■) (en fonction du temps) avec ceux obtenus avec l'hypoxanthine marquée seule (●) (Figure 13).

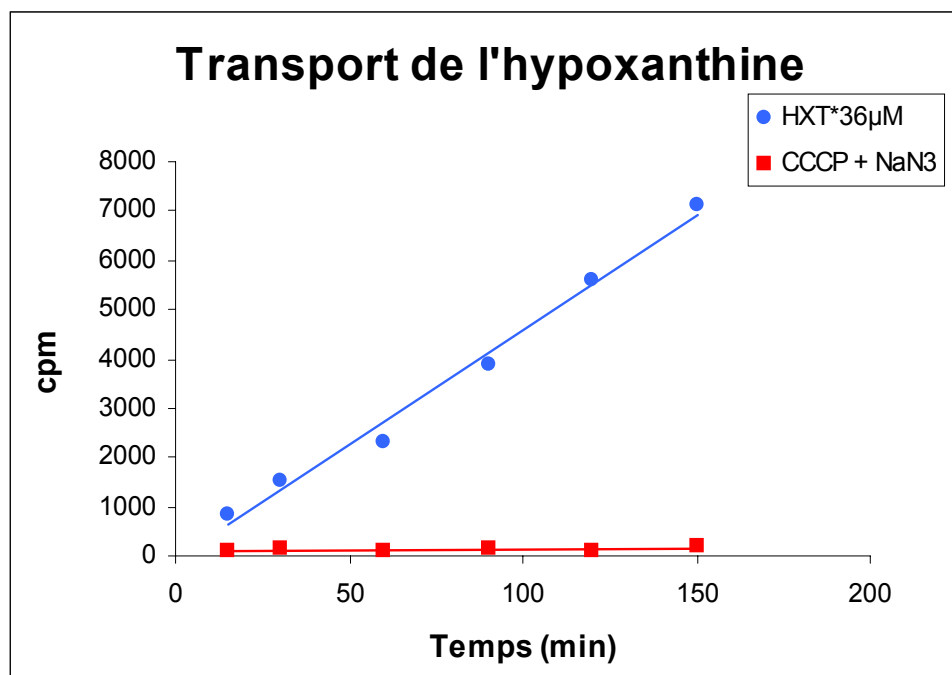


Figure 13 : Caractérisation du transport actif de l'hypoxanthine

En présence des agents toxiques, nous ne constatons plus d'incorporation de radioactivité (pente nulle de la courbe en rouge Figure 12). Nous pouvons en déduire :

- l'absence de toute fixation aspécifique qui se serait traduite par une augmentation de la radioactivité.

- l'absence d'une diffusion facilitée qui elle aussi se serait traduite par une augmentation de la radioactivité avec l'atteinte d'un plateau à l'équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane cytoplasmique.

Ces différents éléments nous permettent d'affirmer que nous avons mis en évidence, pour la première fois sur les ostéoprogéniteurs humains, le transport actif de l'hypoxanthine à travers la membrane cytoplasmique de ces cellules.

2-1.2.2. ETUDE CINETIQUE DU TRANSPORT

Afin de définir les paramètres cinétiques du transport de l'hypoxanthine, nous avons tout d'abord rapporté pour chaque concentration d'hypoxanthine sa vitesse d'entrée dans 10^6 cellules. Cette vitesse d'entrée, calculée à partir des mesures en cpm est représenté Figure 14.

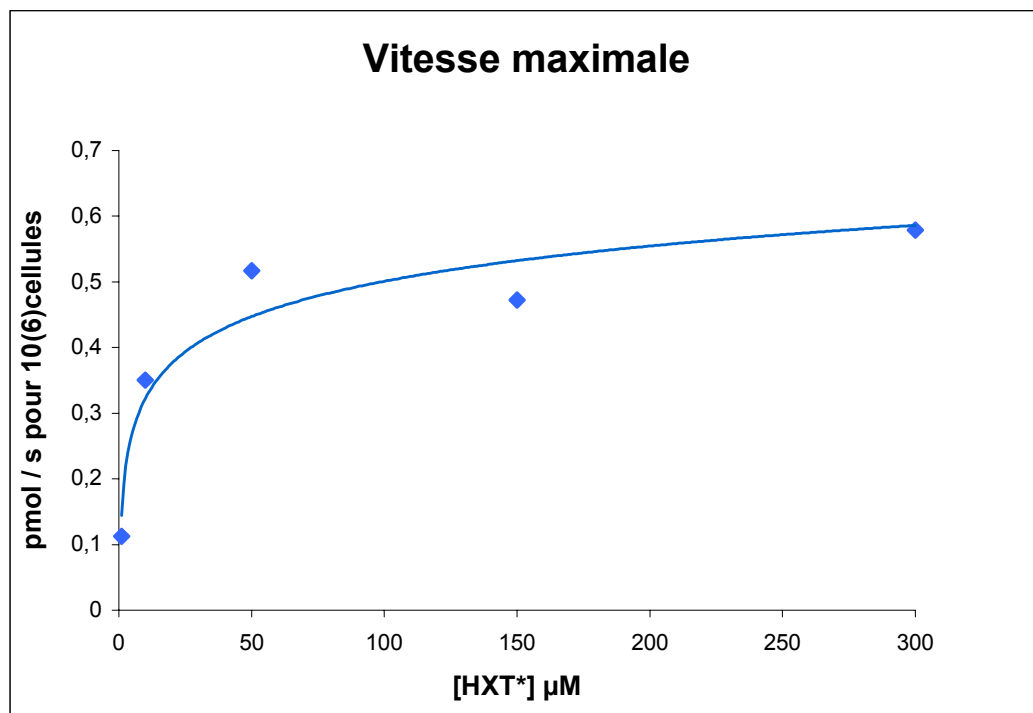


Figure 14 : Détermination de la vitesse maximale d'entrée de l'hypoxanthine dans les cellules

La branche d'hyperbole présentée Figure 14 est caractéristique d'un phénomène de transport selon un comportement régi par une cinétique de Michaëlis-Menten pour la molécule considérée. Nous sommes parvenus à la saturation du transport en augmentant la concentration d'hypoxanthine jusqu'à 300 µM. Cette indication nous a permis de déduire la

vitesse maximale (V_{max}) d'entrée de la molécule dans les ostéoblastes humains établie à $0,57 \pm 0,09$ pmol / s pour 10^6 cellules.

Nous avons exploité les résultats de la Figure 14, grâce à une représentation mathématique de Lineweaver Burk en double inverse. Ceci nous a permis d'accéder au deuxième paramètre cinétique indispensable à la caractérisation du transporteur : la constante d'affinité de Michaëlis-Menten (K_m). Nous avons ainsi déterminé pour ce transport actif un K_m de $2,3 \pm 0,5$ μM (Figure 15).

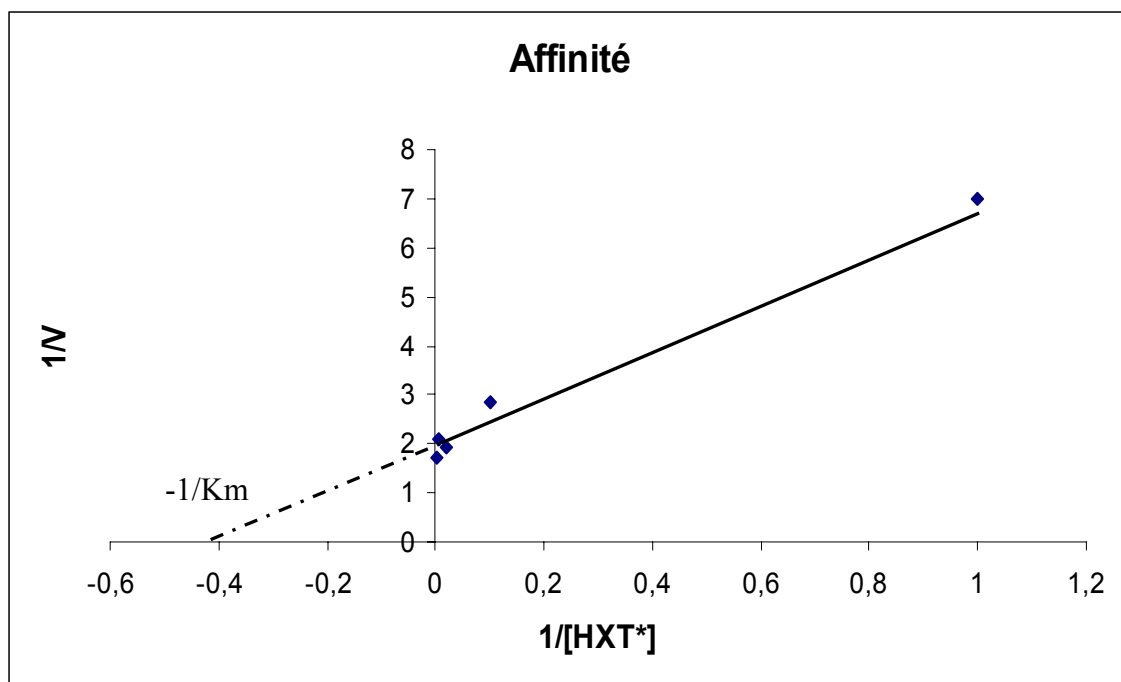


Figure 15 : Détermination de la constante de Michaëlis-Menten de l'hypoxanthine vis à vis de son transporteur

En conclusion nous avons mis en évidence pour la première fois à notre connaissance un transport actif d'hypoxanthine chez les cellules ostéoprogénitrices humaines (K_m de $2,3 \pm 0,5$ μM et V_{max} de $0,57 \pm 0,09$ pmol / s pour 10^6 cellules) sans toutefois pouvoir en faire de même avec l'adénine et la thymine. Ceci est d'autant plus original que le transport de l'hypoxanthine chez les érythrocytes humains est un système de transport facilité commun à l'ensemble des bases puriques [11].

L'hypoxanthine constitue donc une cible potentielle intéressante : sa présence à la surface d'un biomatériau devrait permettre d'augmenter l'affinité cellulaire vis-à-vis du matériau. Nous sommes, dès lors, en droit d'espérer qu'une fois les cellules ostéoprogénitrices

concentrées par ce biomatériau spécifiquement modifié, les phénomènes naturels d'adhésion puis de prolifération seront facilités.

2-2. INGENIERIE MOLECULAIRE DU SYSTEME BIO-CONJUGUE

Notre travail a consisté dans un premier temps à synthétiser différents sila-conjugués. Ces derniers correspondent à l'association d'un lien organo-silicié avec les molécules d'intérêt précédemment définies. Nous avons aussi tenté de synthétiser des sila-conjugués d'autres bases nucléiques (adénine, 6-chloropurine et thymine) afin de vérifier la spécificité du transporteur de l'hypoxanthine pour cette dernière. Ces couplages ont été rendus possibles, en exploitant une réaction inhabituelle pour l'obtention de ce type de liaison (éther, amine) : la réaction de Mitsunobu. Cette dernière nous a conduit, pour la première fois, à différents sila-conjugués de longueurs de chaînes différentes et de fonctions terminales variées (Figure 16).

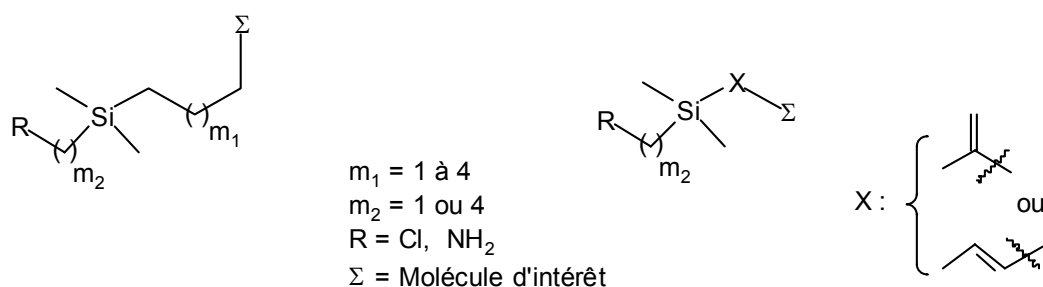


Figure 16 : Formule générale des sila-conjugués

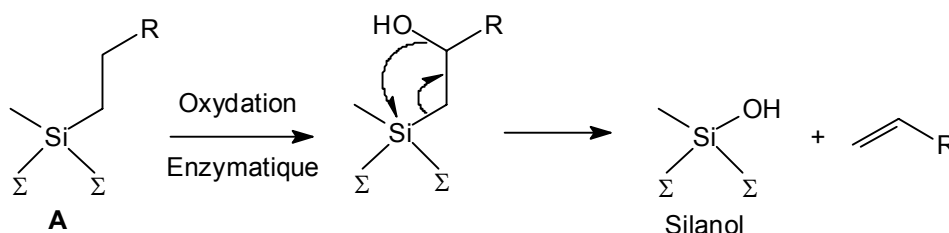
Dans un deuxième temps, nous avons synthétisé un bras espaceur présentant des caractéristiques physico-chimiques particulières. Il est constitué de fragments organiques séquentiels hydrophiles et hydrophobes afin de permettre la meilleure exposition du sila-conjugué au milieu biologique aqueux [12]. Puis nous avons couplé ce bras au sila-conjugué par l'intermédiaire d'une liaison amide ou ester, pour obtenir en fin de synthèse le bio-conjugué.

Pour finir cette partie sur la réalisation du biomatériau chimiquement modifié, nous avons greffé le bio-conjugué sur le polyfluorure de vinylidène (PVDF) matériau biocompatible et déjà largement utilisé dans le domaine médical. Nous avons caractérisé la

présence du système organique à la surface du PVDF par spectrométrie infra-rouge à transformé de Fourier (IR -TF).

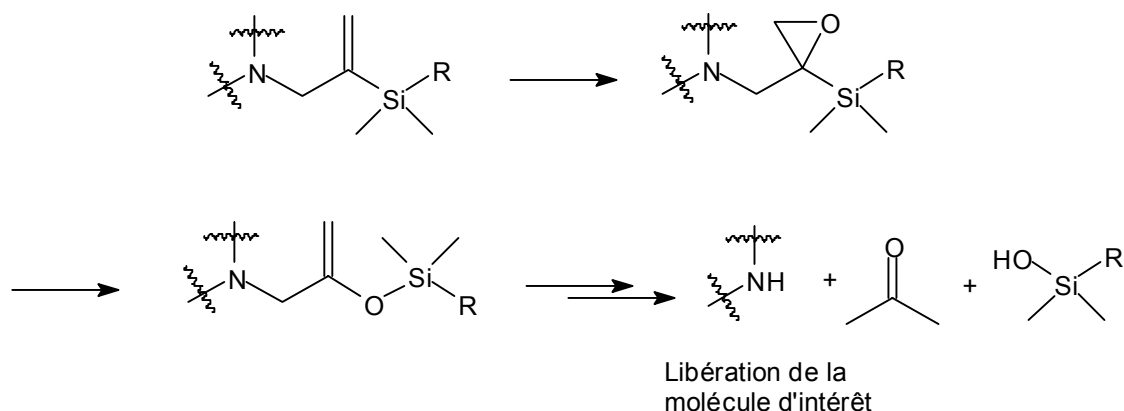
2-2.1. SYNTHESE DES SILA-CONJUGUES

L'idée d'utiliser un lien silicié entre la molécule d'intérêt biologique et le bras espaceur, est motivée par plusieurs raisons faisant intervenir les propriétés chimiques des dérivés organo-siliciés [13]. Il est possible d'envisager un relargage de cette molécule de la surface du biomatériau par scission de la chaîne siliciée. Il s'agit de l'exploitation de traits particuliers et originaux du métabolisme des dérivés organo-siliciés. Il a été décrit, dans la littérature, différents modes de scission de chaînes organo-siliciées par oxydation comme dans le cas du silaméprobamate **A** ($\Sigma = \text{H}_2\text{NCO}_2\text{CH}_2$) [14] :



La coupure des liens siliciés serait donc envisageable pour l'ensemble des sila-conjugués synthétisés conduisant à la libération d'un dérivé vinylique de notre molécule d'intérêt. En effet, lors de l'implantation du biomatériau il se crée dans le cal osseux une zone d'inflammation importante où de nombreux macrophages sont recrutés. Ces derniers par la libération de poches lysosomiales contenant de nombreuses enzymes vont permettre une augmentation en concentration locale importante en oxydases.

De même, il existe dans la littérature des exemples d'oxydation d'insaturation [15, 16] qui nous permettent d'envisager la libération de la molécule naturelle. Un exemple de schéma réactionnel est présenté ci-dessous :



Il sera aussi intéressant de mettre à profit les caractéristiques particulières de la chimie des dérivés organiques du silicium. La réaction d'hydrosilylation permettant d'introduire une fonction siliciée au sein d'une chaîne carbonée comme la réaction de substitution en α du silicium constituent des éléments forts en faveur de l'utilisation de ces intermédiaires de synthèse.

Nous avons, au fur et à mesure de notre travail de synthèse, soumis les sila-conjugués obtenus à des tests de cytotoxicité puis à des tests d'inhibition du transport de la molécule naturelle vis-à-vis des cellules ostéoprogénitrices. L'ensemble de ces résultats biologiques sera présenté dans la troisième partie de ce manuscrit.

2-2.1.1. SYNTHESE DES LIENS ORGANO-SILICIÉS

Nous avons conçu un système de lien entre la molécule naturelle d'intérêt et le bras espaceur. Ce lien est constitué d'un enchaînement organo-silicié saturé **A** ou insaturé **B** (Figure 17) d'environ dix atomes. L'introduction de l'atome de silicium dans la chaîne carbonée est possible grâce à une réaction très générale pour cet hétéroatome qui est la réaction d'hydrosilylation.

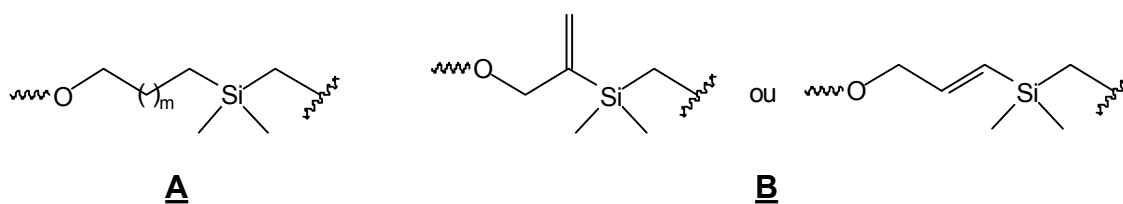
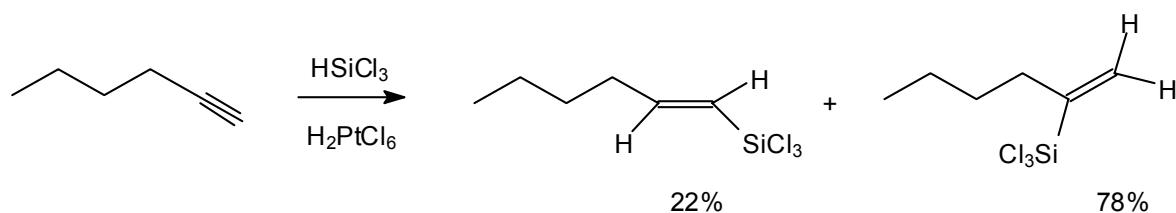


Figure 17 : Liens organo-siliciés saturés A ou insaturés B

Cette réaction, découverte à la fin des années 40, est désormais largement documentée [17]. L'hydrosilylation d'insaturations carbone – carbone est une des plus importantes réactions permettant l'introduction d'un atome de silicium dans un squelette carboné. Cette réaction peut se faire selon deux modes opératoires. Le premier fait appel à un mécanisme radicalaire qui, à partir du trichlorosilane permet l'introduction d'un $\text{Cl}_3\text{Si}^\bullet$ sur un alcène [18 - 20]. Le second, que nous avons utilisé fait intervenir le plus souvent un complexe chloroplatinique (catalyseur de Speier $\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$) comme catalyseur et donne les produits d'addition correspondant avec un très bon rendement [21]. L'acide hexachloroplatinique permet l'hydrosilylation de doubles et triples liaisons carbone – carbone. Ainsi des vinylsilanes ont pu facilement être obtenus à partir de l'acétylène [22]. Avec un alcyne substitué la réaction d'hydrosilylation conduit à l'obtention d'alcènes régio-isomères avec des pourcentages de rendement variables mais toujours en faveur de l'obtention en excès de l'isomère possédant l'insaturation en bout de chaîne. Par exemple, c'est le cas dans la réaction de l'hex-1-yne avec le trichlorosilane, qui conduit au mélange des régio-isomères 1- et 2-trichlorosilylhex-1-ène [23].



A partir du schéma général présenté Figure 18 nous avons envisagé la synthèse des liens organo-siliciés saturés A :

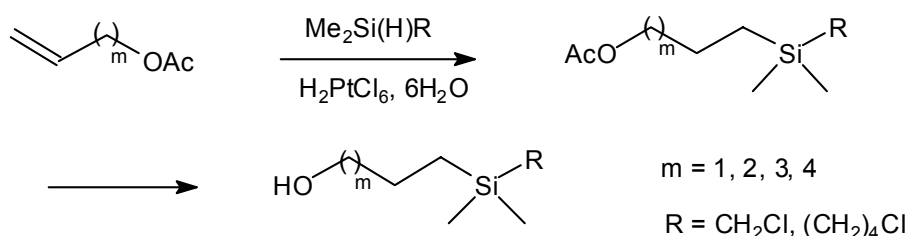


Figure 18 : Schéma général de synthèse des liens organo-siliciés saturés A

Nous avons fait varier la chaîne carbonée ($m = 1$ à 4) afin d'optimiser la longueur du lien organo-silicié.

La synthèse des liens insaturés **B** s'appuie sur un schéma général similaire avec comme point de départ un composé propargylique (Figure 19) :

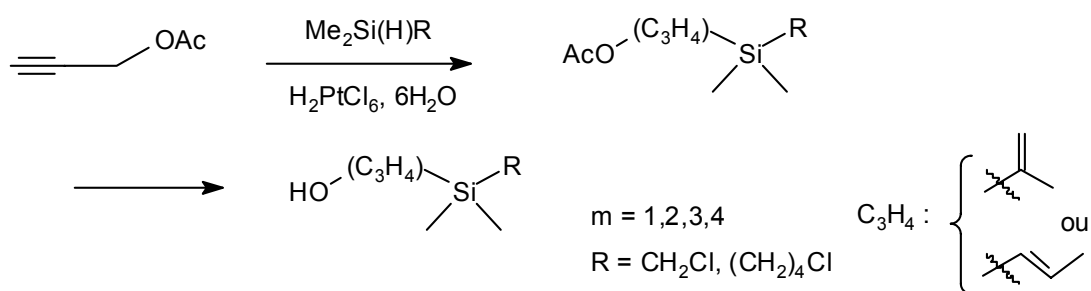


Figure 19 : Schéma général de synthèse des liens organo-siliciés insaturés **B**

Nous avons pu évaluer l'impact des contraintes de structure imposées par la double liaison sur le système de reconnaissance par le transporteur.

2-2.1.1.1. SYNTHESE DES HYDROGENOSILANES

Deux alkylchlorosilanes commerciaux - le chlorométhyl diméthylchlorosilane (**1**) et le chlorobutyldiméthylchlorosilane (**2**) - nous ont permis d'aboutir aux chlorométhyl diméthylsilane (**3**) et chlorobutyldiméthylsilane (**4**), par réduction par l'hydruure de lithium et d'aluminium [24] (Figure 20, Tableau 2).

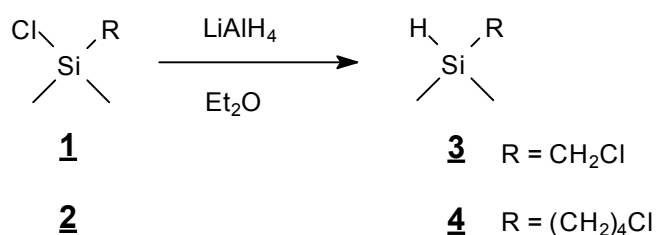


Figure 20 : Réduction des alkylchlorosilanes

R	Rendement Rdt %	Produits
CH ₂ Cl	70	3
(CH ₂) ₄ Cl	80	4

Tableau 1 : Rendement de la réaction de réduction des alkylchlorosilanes

2-2.1.1.2. SYNTHESE DES LIENS ORGANO-SILICIQUES SATURES

Hormis l'acétate d'allyle commercial, nous avons préparé au préalable les acétates **6** à **8** à partir des alcools insaturés correspondants avec de très bons rendements (Figure 21, Tableau 3). Puis nous avons soumis ces divers acétates insaturés (**5** à **8**) à une réaction d'hydrosilylation.

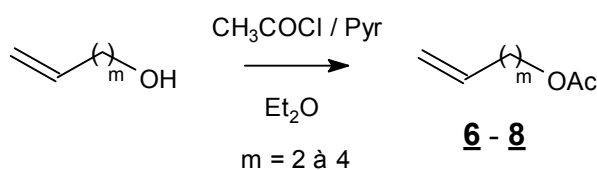


Figure 21 : Acétylation des alcools vinyliques

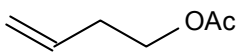
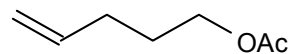
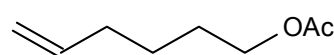
m	Rdt %	Produits
2	85	 6
3	92	 7
4	98	 8

Tableau 2 : Rendement de la réaction d'acétylation des alcools vinyliques

En présence d'acide hexachloroplatinique dans le THF au reflux, les hydrogénosilanes **3** et **4** ont réagi avec les acétates **5** à **8** obtenus précédemment pour conduire, dans de bonnes conditions, aux adduits **9** à **16** (Figure 22, Tableau 4).

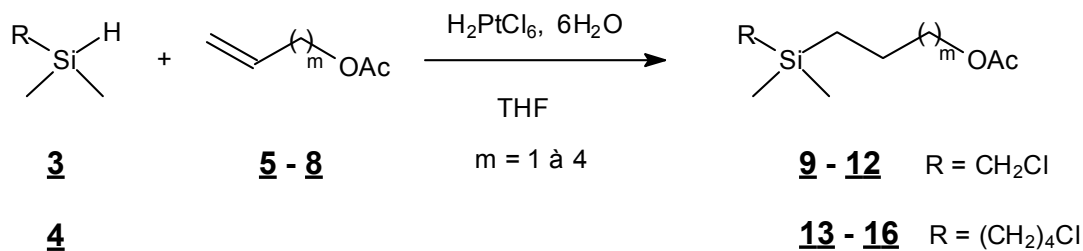


Figure 22 : Hydrosilylation des alkylsilanes

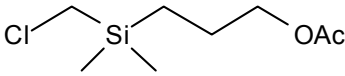
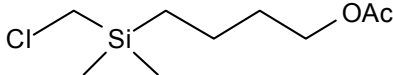
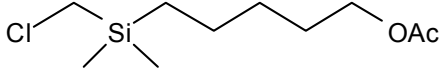
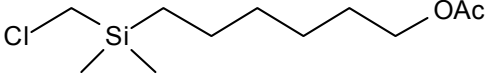
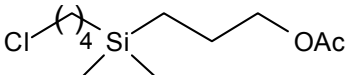
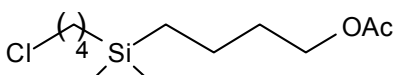
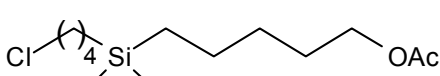
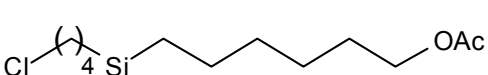
R	m	Rdt %	Liens organo-siliciés
CH ₂ Cl <u>3</u>	1	88	 <u>9</u>
	2	78	 <u>10</u>
	3	80	 <u>11</u>
	4	78	 <u>12</u>
(CH ₂) ₄ Cl <u>4</u>	1	77	 <u>13</u>
	2	60	 <u>14</u>
	3	45	 <u>15</u>
	4	41	 <u>16</u>

Tableau 3 : Rendement de la réaction d'hydrosilylation

L'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle des acétates **5** à **8** ne semble pas affecter les rendements de la réaction d'hydrosilylation conduisant aux composés **9** à **12** (environ 80%). Cependant la présence du groupe chlorobutyl, volumineux, sur l'hydrogénosilane **4** semble affecter sensiblement la réaction lorsque la chaîne alkyle des acétates croît. Nous observons une diminution régulière du rendement d'hydrosilylation conduisant aux composés **13** à **16**.

Enfin, la méthanolyse des dérivés **9** à **16** effectuée en présence d'acide para toluène sulfonique (APTS) conduit aux composés **17** à **24** dans de très bonnes conditions : (Figure 23, Tableau 5)

➤ Aménagement de l'extrémité chloroalkyle en extrémité aminoalkyle

Le lien organo-silicié est synthétisé dans le but d'être fixé d'un côté à la molécule d'intérêt (partie hydroxyalkyle) et de l'autre au bras espaceur. Cette fixation est possible après transformation de l'extrémité chloroalkyle du sila-conjugué en extrémité hydroxyalkyle et ensuite la liaison ester avec le bras espaceur est réalisée. Nous avons tenté, *via* le même schéma de transformation, d'aboutir à un sila-conjugué possédant une extrémité aminoalkyle pouvant conduire à une liaison amide avec le bras espaceur. Ceci nous a amené à transformer les groupements chloroalkyles en aminoalkyles *via* une réaction de type Gabriel.

A partir des alcools obtenus (**17** à **20**) Figure 23, nous avons obtenu les phtalimidométhyles correspondants (Figure 24, Tableau 6).

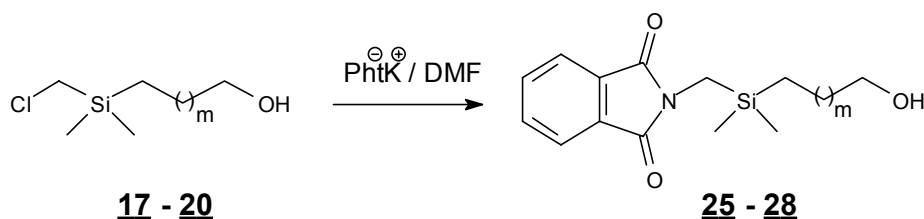


Figure 24 : Obtention des dérivés phtalimidométhyles

m	Rdt %	Liens organo-siliciés
1	37	25
2	75	26
3	76	27
4	76	28

Tableau 5 : Rendement d'obtention des dérivés phtalimidométhyles

Parmi ces composés, 27 et 28 ont cristallisé après purification sur colonne de silice, 28 a pu être analysé par diffraction des rayons X.

Les résultats de l'analyse cristallographique, présentés dans la partie expérimentale, ont permis d'aboutir à la représentation de la Figure 25.

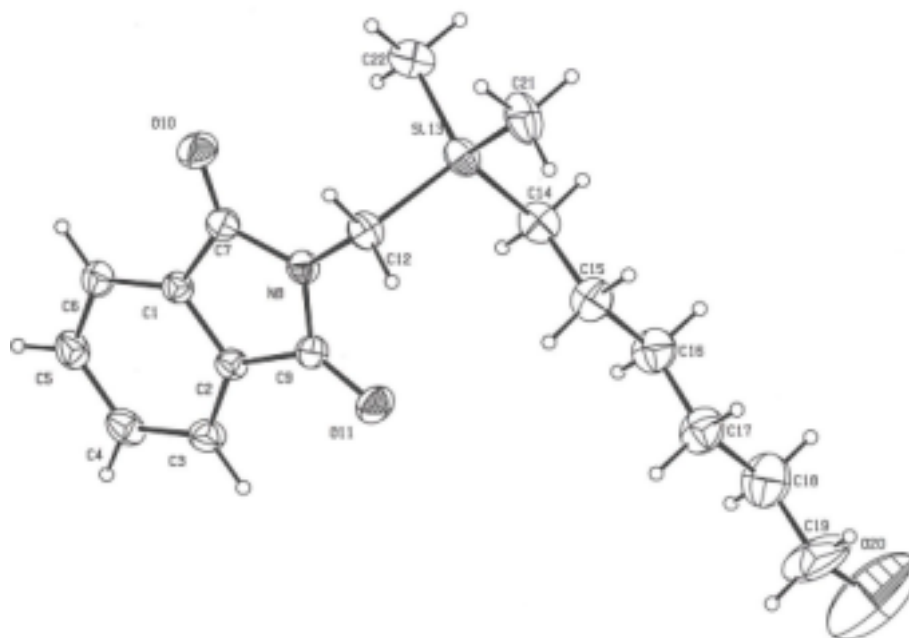


Figure 25 : Représentation cristallographique du composé 28

Le tableau suivant représente les caractéristiques du cristal ainsi que les longueurs et les angles de liaison entourant l'atome de silicium. Le système a cristallisé selon une maille triclinique avec les paramètres de maille présentés ci-dessous.

Code d'identification	<u>28</u>
Formule	$C_{17}H_{25}NO_3Si$
Masse Molaire	319.47
Température	296(2) K
Longueur Liaison	1.54178 Å
Système cristallin	triclinique, P^{-1}
Paramètres de maille	$a = 7.807(8) \text{ \AA}$
($Cu\alpha$)	$b = 10.145(4) \text{ \AA}$
	$c = 11.886(4) \text{ \AA}$
	$\alpha = 93.53^\circ(3)$
	$\beta = 105.84^\circ(4)$
	$\gamma = 89.77^\circ(5)$

Longueurs de liaisons

N8 C12	1,446 (3)
C12 Si13	1,889 (3)
Si13 C14	1,855 (3)
Si13 C21	1,857 (3)
Si13 C22	1,856 (4)
C14 C15	1,506 (5)
C15 C15	1,511 (5)

Angles de liaisons

N8 C12 Si13	116,17 (18)
C14 Si13 C12	111,18 (15)
C14 Si13 C21	111,52 (18)
C14 Si13 C22	109,70 (17)
C21 Si13 C22	111,10 (2)
C21 Si13 C12	105,18 (15)

Ces résultats sont intéressants dans le sens où très peu de dérivés siliciés tétra-alkylés ont pu être cristallisés. Ces paramètres cristallins peuvent donc fournir des informations pertinentes pour d'éventuelles études en modélisation moléculaire.

La déprotection des phtalimidométhylsilanes **25** à **28** effectuée par l'hydrazine dans l'éthanol, a permis d'aboutir aux aminométhylsilanes correspondant (Figure 26, Tableau 7).

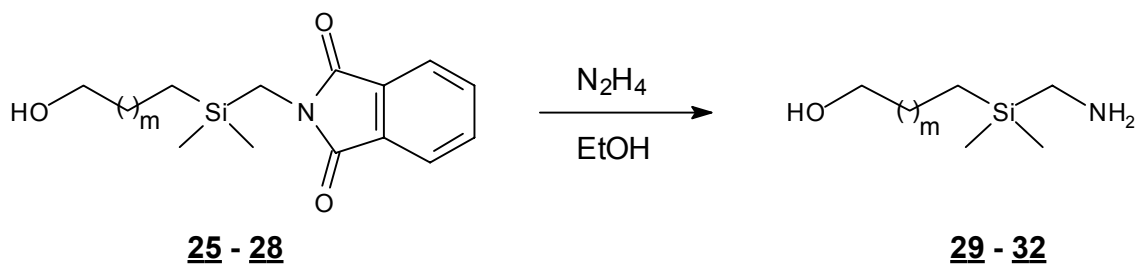


Figure 26 : Hydrolyse des dérivés phtalimidométhylsilanes

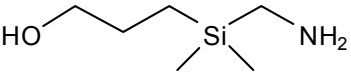
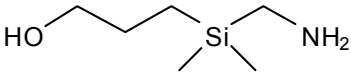
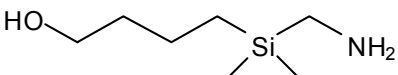
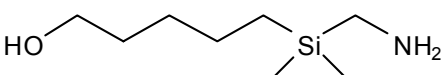
m	Rdt %	Liens organo-siliciés
1	94	 <u>29</u>
2	94	 <u>30</u>
3	91	 <u>31</u>
4	92	 <u>32</u>

Tableau 6 : Rendement de la réaction de libération de l'amine libre

La volonté d'utiliser ces composés ultérieurement et leur relative instabilité, nous ont obligés à protéger l'amine libre par un groupe tertio-butyloxycarbonyle (BOC) et conduits aux composés **33** à **36** (Figure 27, Tableau 8).

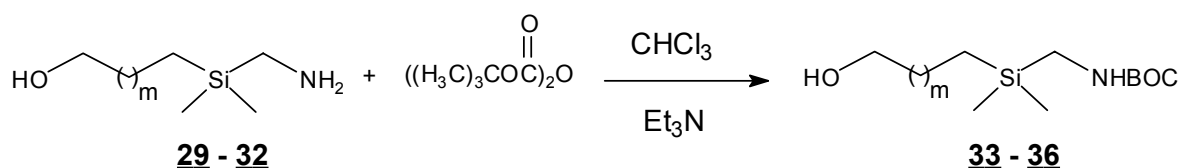


Figure 27 : Protection de la fonction amine par un groupement BOC

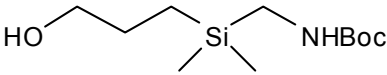
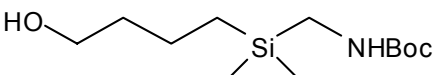
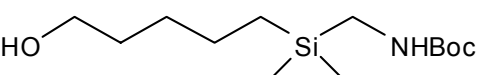
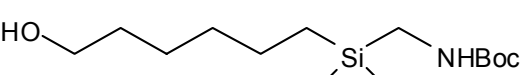
m	Rdt %	Liens organo-siliciés
1	50	 <u>33</u>
2	45	 <u>34</u>
3	75	 <u>35</u>
4	79	 <u>36</u>

Tableau 7 : Rendement de la réaction de protection de l'amine libre

2-2.1.1.3. SYNTHESE DES FRAGMENTS SILICIÉS
INSATURES

Nous avons engagé les hydrogénosilanes **3** et **4** pour hydrosilyler l'acétate de propargyle (**37**) ; les dérivés **38** à **41** obtenus sont présentés dans le Tableau 9.

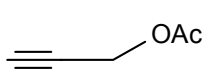
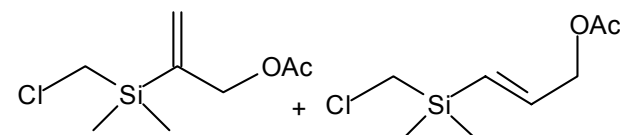
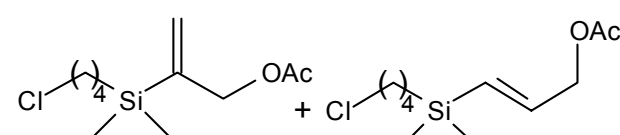
R	Acétate	Rdt %	Liens organo-siliciés
CH ₂ Cl	 37	90	 38 + 39
(CH ₂) ₄ Cl		80	 40 + 41

Tableau 8 : Rendement de la réaction d'hydrosilylation à partir de l'acétate de propargyle

Nous obtenons les différents isomères éthyléniques de type vinylidène et de configuration E dans des proportions de l'ordre 60 / 40. La configuration Z, par contre, probablement défavorisée par l'encombrement stérique autour du silicium n'a pas été obtenue dans des proportions notables. Les deux couples d'isomères **38** - **39** et **40** - **41** se sont révélés inséparables par les techniques classiques de purification (chromatographie sur colonne de gel de silice). Nous avons donc poursuivi la synthèse sur les mélanges respectifs de ces acétates.

Comme en série saturée, nous avons tout d'abord effectué une désacétylation des mélanges purifiés mais non séparés des acétates **38** / **39** et **40** / **41** par méthanolyse en présence d'acide para toluène sulfonique (APTS) (Figure 28, Tableau 10).

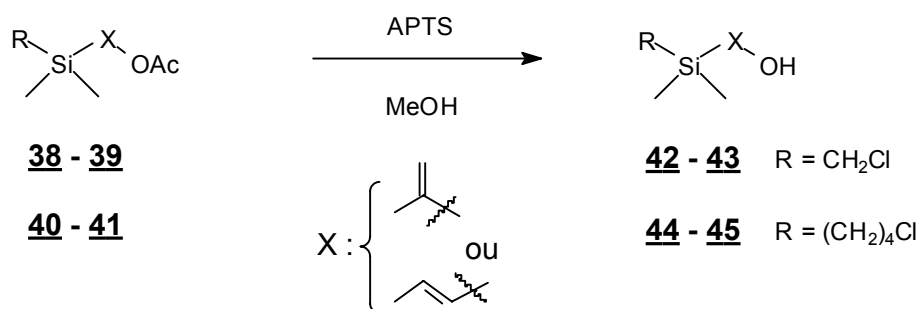


Figure 28 : Méthanolyse des dérivés acétylés

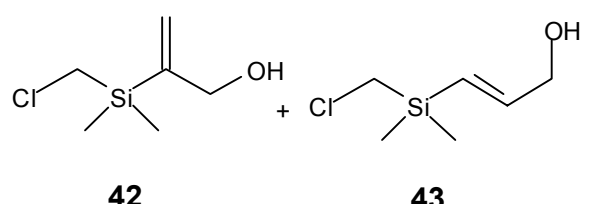
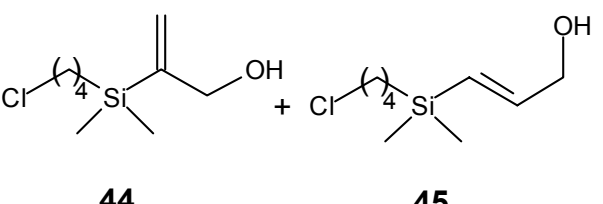
R	Rdt %	Liens organo-siliciés
CH ₂ Cl	90	 42 43
(CH ₂) ₄ Cl	92	 44 45

Tableau 9 : Rendement de la réaction de méthanolyse des acétates insaturés

Les deux couples d'alcools isomères (**42-43** et **44-45**) ont désormais pu être séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Néanmoins, les différences de rapport frontal parmi chaque couple d'isomères ne dépassent pas 0,1 en chromatographie sur couche mince. Ainsi la séparation en quantité importante de ces alcools nécessite plusieurs passages. Nous avons donc cherché de nouvelles méthodes afin d'obtenir de meilleures conditions de séparation des deux isomères.

Divers travaux sur l'hydrolyse enzymatique des composés organo-siliciés ont été effectués [25]. Avec des estérases de foie de porc, par exemple, l'hydrolyse énantiosélective du 2-méthyl-2-[(diméthyltertbutyl)silyloxyméthyl] malonate de diméthyle conduit à un excès énantiomérique de 95% [26, 27]. Toutefois, le degré d'hydrolyse et d'énantiosélectivité dépend fortement de l'origine et de la nature de l'enzyme [28]. Dans le cas des acétates

isomères de (chlorométhyl-diméthylsilyl)-2-propényle, nous avons supposé que la position de l'insaturation par rapport à l'atome de silicium et au groupement acétyle pouvait induire une sélectivité pendant une hydrolyse enzymatique. De plus, l'utilisation d'une enzyme immobilisée permettrait un meilleur isolement après la réaction. Nous avons donc utilisé la lipase de *Candida antarctica* comme biocatalyseur immobilisé sur une résine acrylique macroporeuse. Des aliquotes de chaque réaction ont été prélevées en fonction du temps et analysées par RMN du proton. Les cinétiques de réaction ont été établies par comparaison des intégrations des spectres RMN des différents mélanges avec celles des spectres des produits purs. Toutes les réactions ont été effectuées en triple exemplaire, à deux températures différentes et les résultats représentés Figure 30 et 31. Afin de valider l'activité enzymatique à une température proche de l'ambiante, les premières réactions ont été effectuées à 30°C. A cette température la lipase *Candida antarctica* est capable d'hydrolyser le mélange des deux acétates. Les analyses en chromatographie sur couche mince (CCM) ont révélé trois spots, l'un correspondant aux acétates et les deux autres aux composés **42** et **43**. Les spectres RMN ont confirmé la présence d'une desacétylation avec l'apparition du signal hydroxyméthyle sur le spectre (4,2-4,3 ppm) Figure 29.

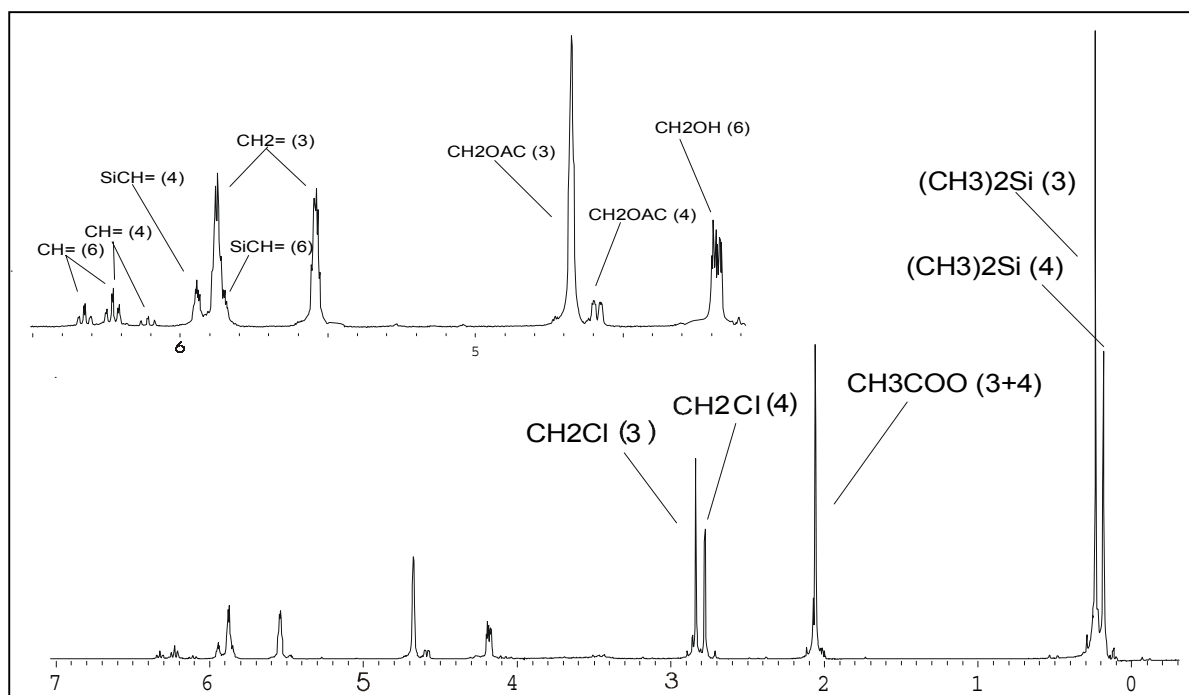


Figure 29 : Spectres RMN du milieu réactionnel au bout de deux heures

Une étude précise du spectre, a montré que *Candida antarctica* hydrolyse le composé **39** avec une très forte sélectivité. Après 24 heures d'incubation le composé **39** a été hydrolysé quantitativement pour donner le composé **43** alors que seulement 21% du composé

38 a été hydrolysé en composé **42**. Cependant les analyses CCM ont révélé la présence de produits de dégradation (de faibles Rf) que nous n'avons pas essayé d'identifier.

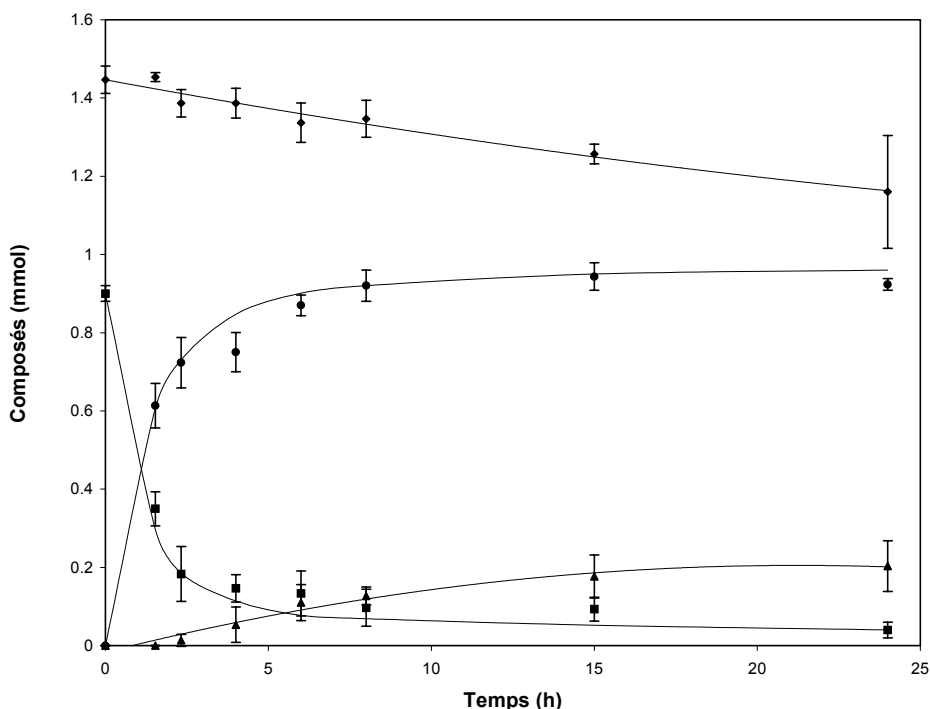


Figure 30 : Courbes cinétiques d'hydrolyse des dérivés siliciés acétylés à 30°C

(♦ : composé **38**, ■ : composé **39**, ▲ : composé **42**, ● : composé **43**)

Candida antarctica est connue pour être une enzyme thermorésistante [29, 30] avec une température optimale de réaction voisine de 60°C. C'est pourquoi l'hydrolyse du mélange des acétates **38** et **39** a été effectuée à cette température dans le but d'optimiser les rendements et de minimiser l'apparition de produits de dégradation. Les réactions cinétiques ont été suivies par RMN du proton, après l'addition du catalyseur. Le taux d'hydrolyse s'est avéré supérieur, et nous avons constaté une augmentation de la sélectivité de l'hydrolyse.

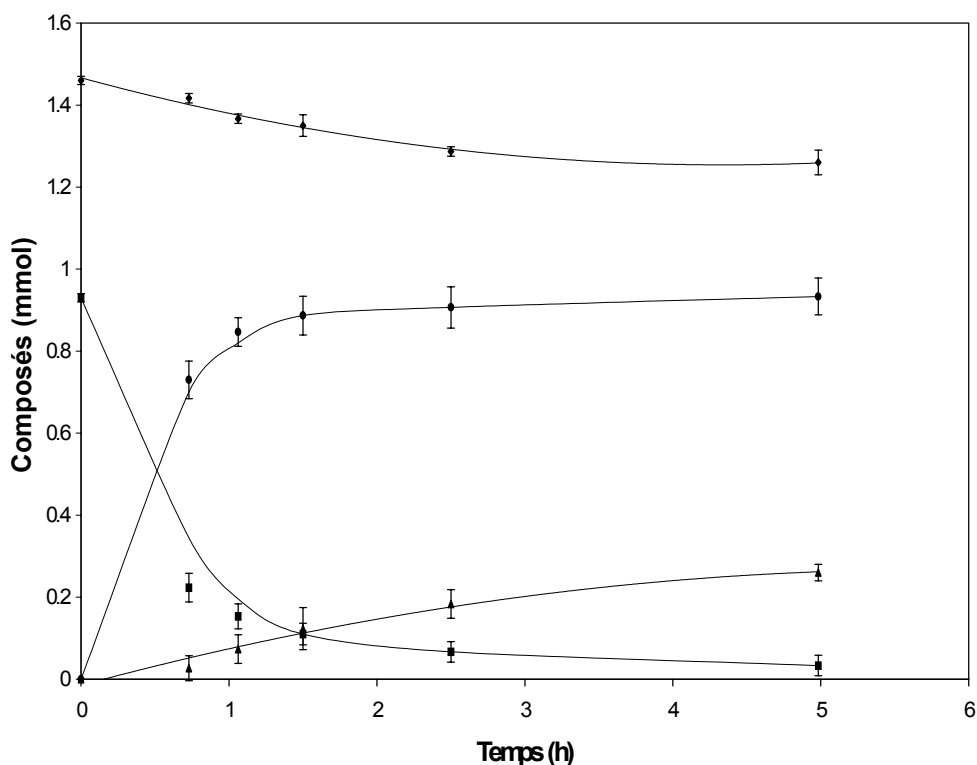


Figure 31 : Courbes cinétiques d'hydrolyse des dérivés siliciés acétylés à 60°C

(◆ : composé 38, ■ : composé 39, ▲ : composé 42, ● : composé 43)

Si nous comparons les Figures 30 et 31 au bout de 2 heures et demi par exemple nous constatons que la proportion d'alcool 43 est 4 fois supérieure à celle de l'acétate 39 à 30°C alors qu'à 60°C cette proportion est dix fois plus élevée. De plus à 60°C, 5 heures seulement ont été nécessaires pour hydrolyser totalement le composé 39 en composé 43. Dans ces conditions expérimentales, seul le composé 38 est resté inchangé en fin de réaction, avec l'alcool 43 et des traces d'alcool 42. Le composé 38 a été facilement séparé des deux alcools 42 et 43 pour être desacétylé en présence d'acide para toluène sulfonique dans le méthanol et donner le composé 42 avec les rendements déjà énoncés dans le Tableau 10.

Cette voie enzymatique représente donc une solution beaucoup plus efficace et rentable pour l'obtention des alcools 42 et 43, séparés et purs. Le bilan réactionnel des différentes étapes peut être schématisé de la façon suivante (Figure 32) :

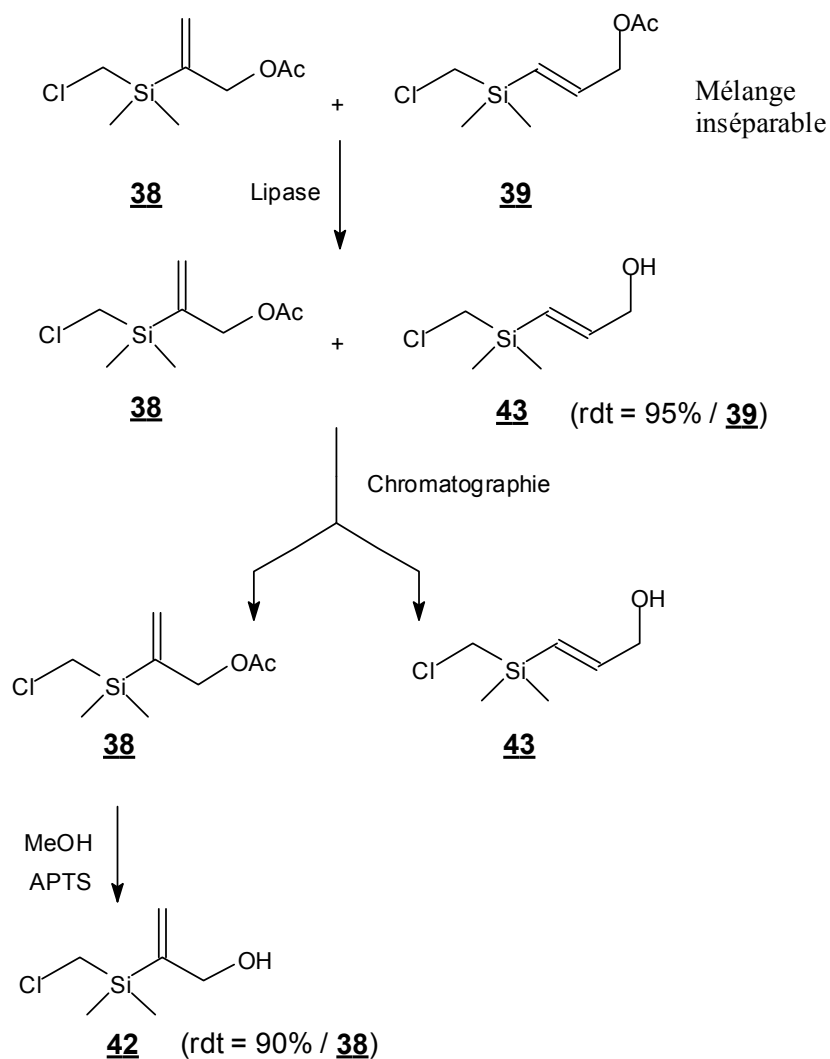


Figure 32 : Bilan de la séparation enzymatique des isomères **38** et **39**

2-2.1.2. SYNTHESE DES SILA-CONJUGUES DE L'ACIDE ASCORBIQUE

L'étape suivante de nos travaux a concerné le couplage des molécules d'intérêt reconnues sélectivement par les transporteurs caractérisés précédemment dans les cellules ostéoprogénitrices, l'acide L-ascorbique et l'hypoxanthine, aux liens organo-siliciés dont nous venons de décrire la préparation. Il s'agit en l'occurrence de former une liaison éther entre la position 6 de l'acide ascorbique et une fonction alcool primaire du lien organo-silicié ou bien de procéder à l'alkylation de l'azote en position 9 d'une purine.

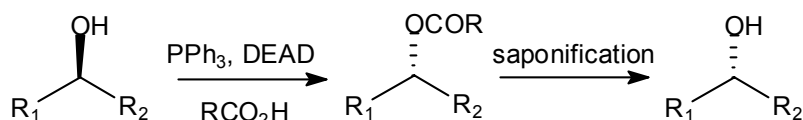
Les premiers travaux réalisés l'ont été sur l'acide ascorbique ; nous avons axé nos modifications sur la position 6 de la molécule qui semble plus accessible et plus réactive que les autres positions (2 et 3). Nous avons tenté de réaliser la liaison éther en passant par la formation d'un tosylate activateur d'une des deux fonctions alcools [31]. Cette réaction n'a donné aucun résultat. De plus, les autres modes d'obtention de liaisons éther (H₂SO₄ [33] FeCl₃ ou PCl₅ / POCl₃ [34]) nous ont semblés particulièrement agressives pour nos réactifs (acide ascorbique). Nous avons donc cherché de nouveaux moyens d'obtention d'éther. Les études bibliographiques nous ont amenées à nous intéresser à la réaction de Mitsunobu qui permettait de réaliser des liaisons entre une amine primaire et un alcool ou entre deux alcools (un primaire et l'autre secondaire) [35, 36].

Nous avons travaillé sur les conditions opératoires de la réaction de Mitsunobu et nous sommes parvenus pour la première fois à obtenir, avec des rendements intéressants, une liaison éther à partir de deux alcools primaires.

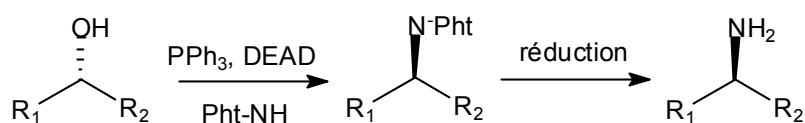
2-2.1.2.1. REACTION DE MITSUNOBU

La réaction de Mitsunobu est couramment utilisée dans la formation de liaisons carbone-hétéroatome (C-O ou C-N). Globalement, elle se présente comme une déshydratation intermoléculaire entre un alcool et un composé comportant un proton labile en présence d'azodicarboxylate de diéthyle et de triphényl phosphine [35]. Ce couplage entraîne toujours une inversion de configuration des carbones asymétriques concernés. Deux exemples sont présentés ci-dessous :

- formation de liaisons C-O [36]



- formation de liaisons C-N [36]



Son mécanisme passe par la formation d'un sel d'azaphosphonium (A) associant l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) et la triphényl phosphine (PPh₃). Ce complexe, par son rôle activateur, permet l'association des deux molécules mises en jeu (complexe A et un premier nucléophile NuH) pour fournir un sel d'azaphosphonium (B) (Figure 33). L'autre alcool attaque ensuite le groupement triphénylphosphine avec formation de DEAD réduit. La dernière étape consiste en une substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) qui donne le produit final avec élimination d'oxyde de triphénylphosphine.

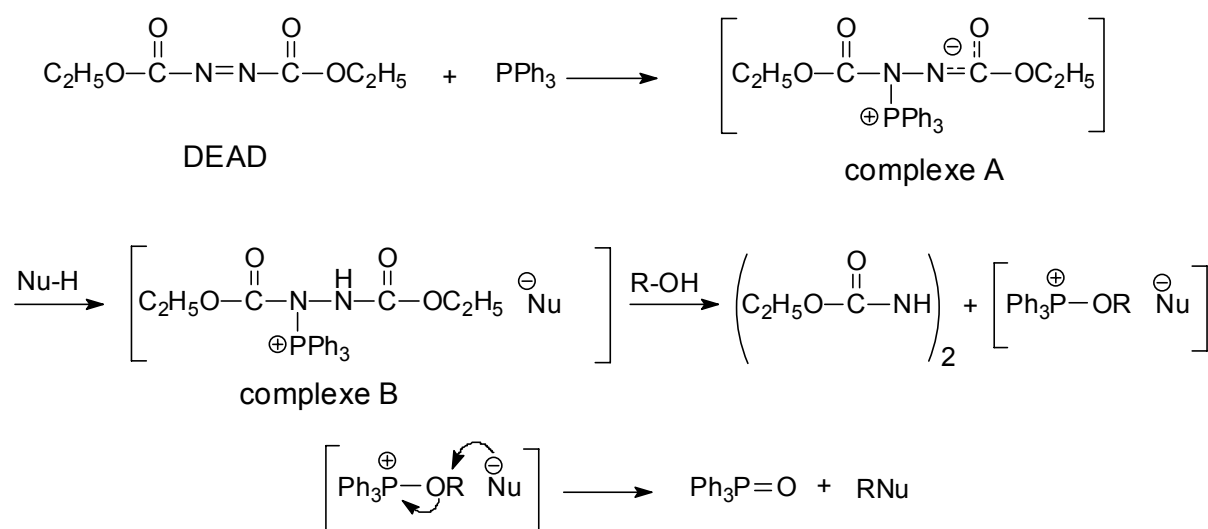


Figure 33 : Mécanisme général de réaction de Mitsunobu [30]

Le couplage de deux fonctions alcools n'avait été réalisé jusqu'à présent, en utilisant le couple DEAD / PPh₃, que pour former des éthers d'alkyle et aryle, d'énol ou des dialkyléther cycliques. Plus récemment des fluoroéthers ont également été synthétisés [36, 37]. A notre connaissance la formation efficace d'éthers à partir d'alcools peu activés, par ce moyen, n'a jamais été mentionnée. De nouveaux systèmes redox comme le TMAD-TBP (N,N,N',N'-tétraméthylazodicarboxylate / tributylphosphine) [38], l'ADDP-TBP (1,1'-(azodicarboxyl)-dipipéridine / tributylphosphine) et le TIPA-TBP (N,N,N',N'-tétraisopropylazodicarboxylate / tributylphosphine) ont été utilisés dans le cas de nucléophiles possédant un pK_a élevé afin d'améliorer les rendements des réactions.

Pour notre part, nous avons tenté d'utiliser le système TMAD / TBP avec les deux alcools primaires (lien organo-silicié et acide ascorbique) ; la réaction n'a malheureusement pas donné de résultats exploitables. Nous sommes alors revenus à un système plus classique DEAD / PPh₃.

Nous avons pu ainsi obtenir les sila-conjugués de l'acide ascorbique avec des rendements allant de 30 à 50% et cela pour la première fois à notre connaissance. Les résultats sont présentés dans les chapitres suivants.

2-2.1.2.2. OBTENTION DES SILA-CONJUGUES CHLOROMETHYLES

La formation d'une liaison éther entre la fonction hydroxyle primaire en position 6 de l'acide ascorbique et les liens organo-siliciés **9** à **16** a été effectuée avec la triphényl phosphine et l'azodicarboxylate de diéthyle dans du THF à -4°C : (Figure 34, Tableau 11)

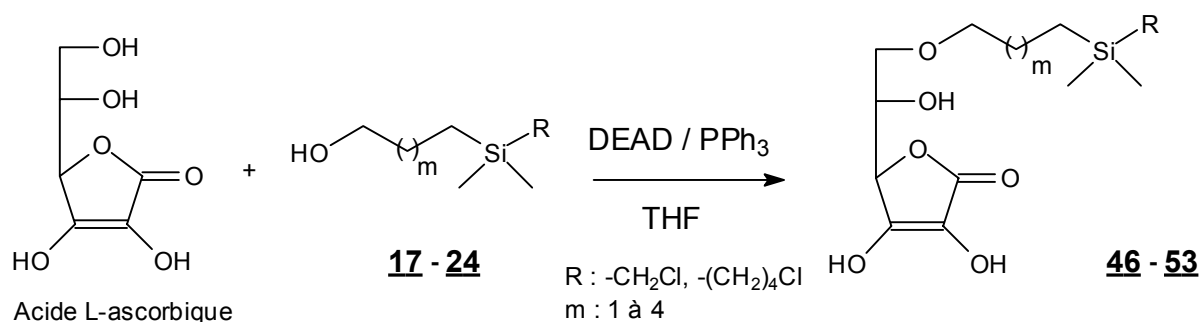


Figure 34 : Réaction de Mitsunobu avec l'acide ascorbique comme substrat

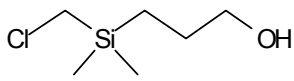
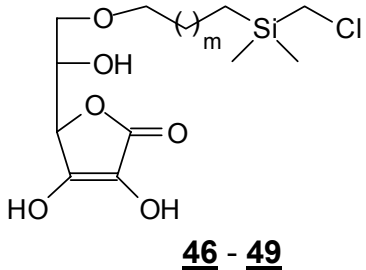
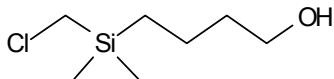

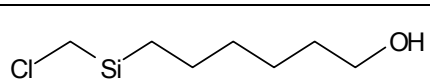
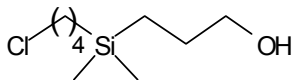
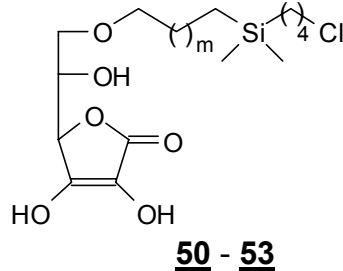
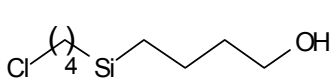
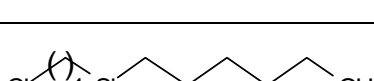
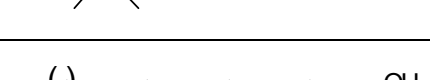
R	Liens organo-siliciés	Rdt %	Sila-conjugués m = 1,2,3,4
CH ₂ Cl	 <u>17</u>	20	 <u>46 - 49</u>
	 <u>18</u>	30	
	 <u>19</u>	30	
	 <u>20</u>	40	
(CH ₂) ₄ Cl	 <u>21</u>	27	 <u>50 - 53</u>
	 <u>22</u>	11	
	 <u>23</u>	23	
	 <u>24</u>	19	

Tableau 10 : Rendement de la réaction de Mitsunobu avec l'acide ascorbique comme substrat

La réaction de Mitsunobu effectuée dans les mêmes conditions sur les liens organo-siliciés insaturés **42** à **45** a donné les résultats présentés dans le Tableau 12.

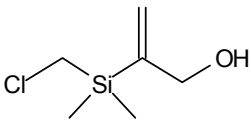
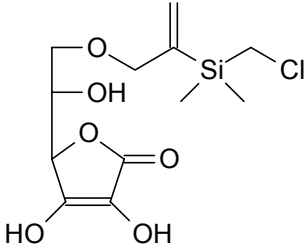
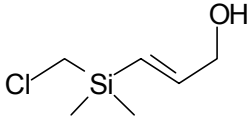
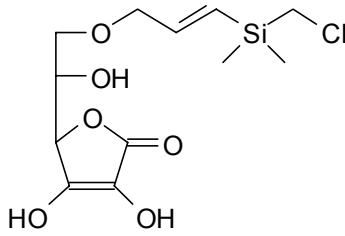
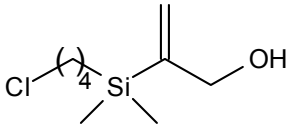
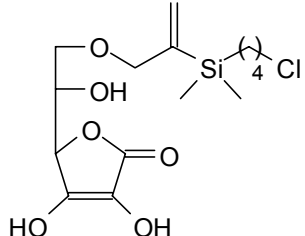
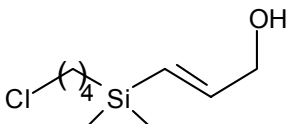
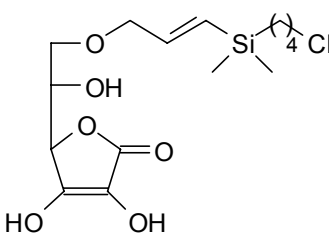
Liens organo-siliciés	Rdt %	Sila-conjugués m = 1,2,3,4
 <p style="text-align: center;"><u>42</u></p>	26	 <p style="text-align: right;"><u>54</u></p>
 <p style="text-align: center;"><u>43</u></p>	27	 <p style="text-align: right;"><u>55</u></p>
 <p style="text-align: center;"><u>44</u></p>	22	 <p style="text-align: right;"><u>56</u></p>
 <p style="text-align: center;"><u>45</u></p>	23	 <p style="text-align: right;"><u>57</u></p>

Tableau 11 : Rendement de la réaction de Mitsunobu avec l'acide ascorbique et les alcools insaturés comme substrat

2-2.1.2.3. OBTENTION DES SILA-CONJUGUES AMINOMETHYLES

Les liens organo-siliciés synthétisés dans le chapitre précédant (**33** à **36** paragraphe 2-2.1.1.2) et possédant une fonction amine protégée ont aussi été utilisés dans une réaction de Mitsunobu conduisant à la formation d'une liaison éther avec l'acide ascorbique (Tableau 13).

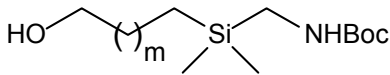
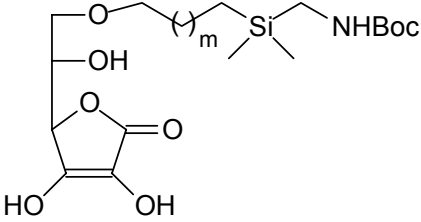
Liens organo-siliciés m = 1,2,3,4	Rdt %	Sila-conjugués m = 1,2,3,4
 <p style="text-align: center;">33 - 36</p>	33 : 28%	 <p style="text-align: center;">58 - 61</p>
	34 : 41%	
	35 : 42%	
	36 : 46%	

Tableau 12 : Rendement de la réaction de Mitsunobu avec l'acide ascorbique et les dérivés siliciés protégés comme substrat

Cette réaction nous permet d'aboutir à des sila-conjugués qui posséderont une extrémité aminée permettant de réaliser une liaison amide avec le bras espaceur. Les tests de cytotoxicité et d'activité des sila-conjugués synthétisés dans ce chapitre (à l'exception des composés **58** à **61**) sont présentés dans la troisième partie de notre mémoire.

2-2.1.3. SYNTHESE DES SILA-CONJUGUES DE BASES NUCLEIQUES

Nous avons synthétisé des sila-conjugués de différentes bases nucléiques, tout d'abord des sila-conjugués de bases puriques (adénine, 6-chloropurine et surtout hypoxanthine) puis d'une base pyrimidique (thymine). Les sila-conjugués de ces différentes bases nous ont permis de définir si nous sommes en présence d'un transport de purine aspécifique ou si le transport est spécifique de l'hypoxanthine.

2-2.1.3.1. SYNTHESE DES SILA-CONJUGUES DE PURINES

Nous avons dans un premier temps synthétisé le sila-conjugué saturé de l'hypoxanthine possédant une chaîne carbonée courte (3 carbones) autour de l'atome de silicium. La 6-chloropurine commerciale a été alkylée au moyen du bromure d'allyle, puis soumise à une réaction d'hydrosilylation pour conduire au composé **63**. Ce composé est alors acétoxylé par l'acétate de sodium dans le DMF au niveau de son extrémité chlorométhylsilyle. Puis le composé **64** obtenu subit une méthanolyse permettant l'obtention de la molécule désirée **65** (Figures 35 et 36).

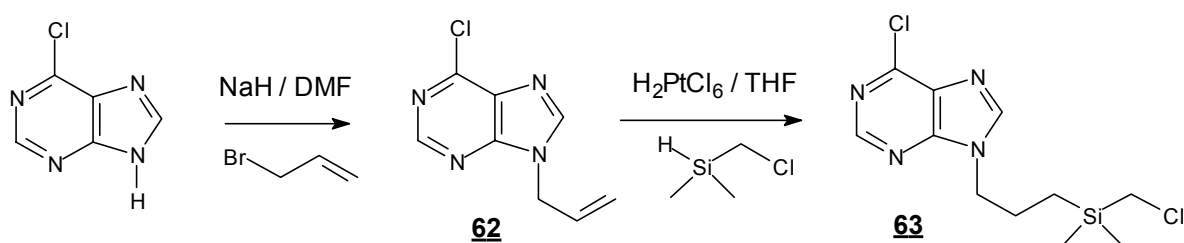


Figure 35 : Obtention de la 6-chloropurine silylée saturée

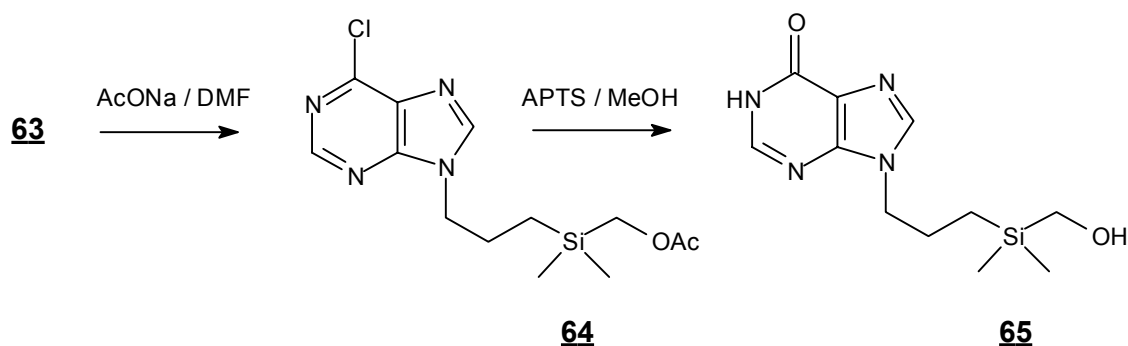


Figure 36 : Obtention de l'hypoxanthine silylée saturée

Au cours de cette méthanolyse catalysée par l'APTS, la fonction acétoxy est transformée en fonction alcool, mais nous assistons aussi à la substitution du chlore du composé **64** par un oxygène. Nous obtenons ainsi directement le sila-conjugué saturé de l'hypoxanthine **65**.

Puis nous avons fait réagir la 6-chloropurine avec les liens organo-siliciés insaturés **42** et **43** au moyen de la réaction de Mitsunobu. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

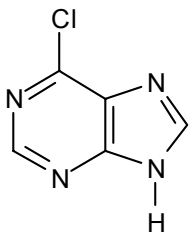
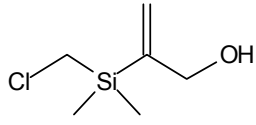
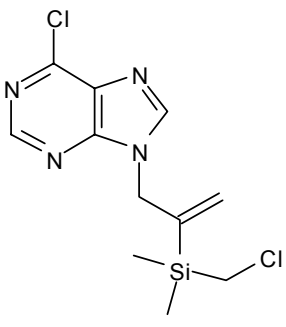
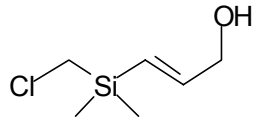
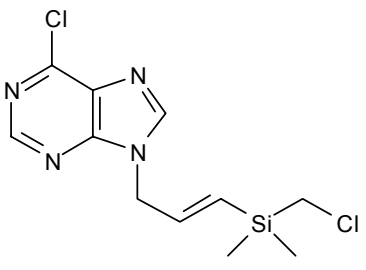
6-Chloropurine	Liens organo-siliciés	Rdt (%)	Sila-conjugués
	 42	90	 66
	 43	26	 67

Tableau 13 : Rendement de la réaction de Mitsunobu avec la 6-chloropurine comme substrat

Si le dérivé **66** est isolé avec un excellent rendement, l'utilisation du dérivé **43** par contre, conduit à l'analogue **67** avec un très faible rendement.

Dans un premier temps la 6-chloropurine modifiée **66** a conduit au dérivé **68** par l'intermédiaire de l'acide trifluoroacétique dans de l'eau. Ceci nous permet d'obtenir le sila-conjugué de l'hypoxanthine **68** avec un rendement de 56% (Figure 37).

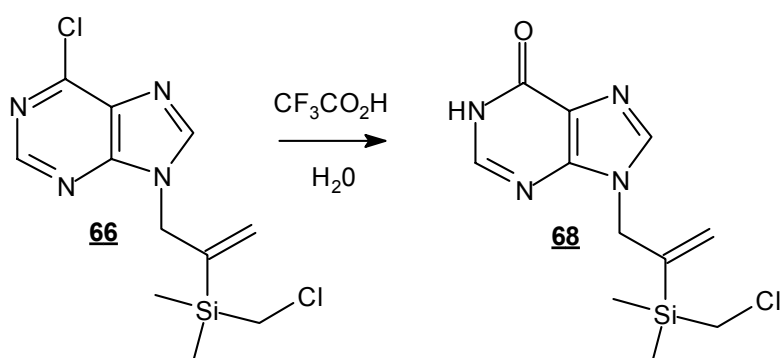


Figure 37 : Transformation du dérivé chloré de la 6-chloropurine en dérivé chloré de l'hypoxanthine

Ce faible rendement nous a incité à mettre à profit l'originalité de la réaction précédente qui consiste, en même temps, à transformer la position 6 de la chloropurine en hypoxanthine et à permettre la méthanolyse de la fonction acétate (Figure 38).

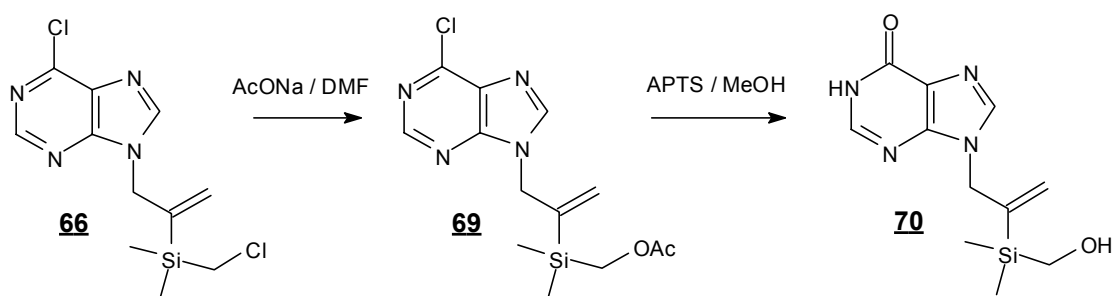


Figure 38 : Obtention du dérivé hypoxanthine hydroxylé

Nous avons donc synthétisé trois dérivés de l'hypoxanthine **66**, **68** et **70** qui vont être engagés dans les différents tests biologiques (Troisième partie).

Mettant à profit la réactivité de la 6-chloropurine nous l'avons ainsi modifié à l'aide de thiourée, pour conduire au composé **71** avec un rendement de 60% [39] (Figure 39).

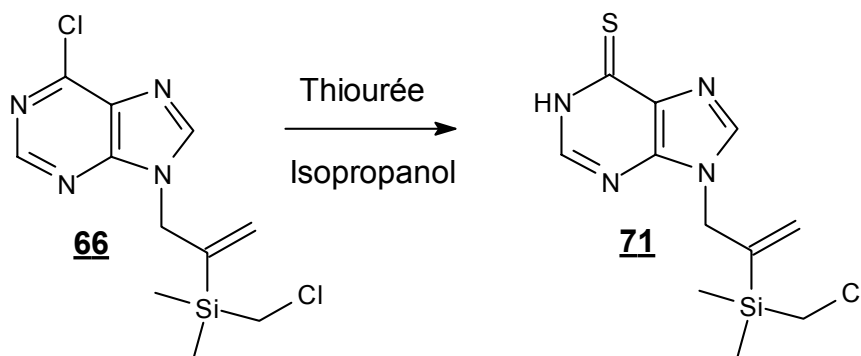


Figure 39 : Obtention d'un analogue soufré de l'hypoxanthine

L'analogue hydroxylé du composé **71** a été synthétisé également à partir de **66** mais en introduisant le soufre plus tardivement dans la synthèse. Nous obtenons ainsi le composé **72** avec 70% de rendement et la molécule **73** avec 45% de rendement (Figure 40).

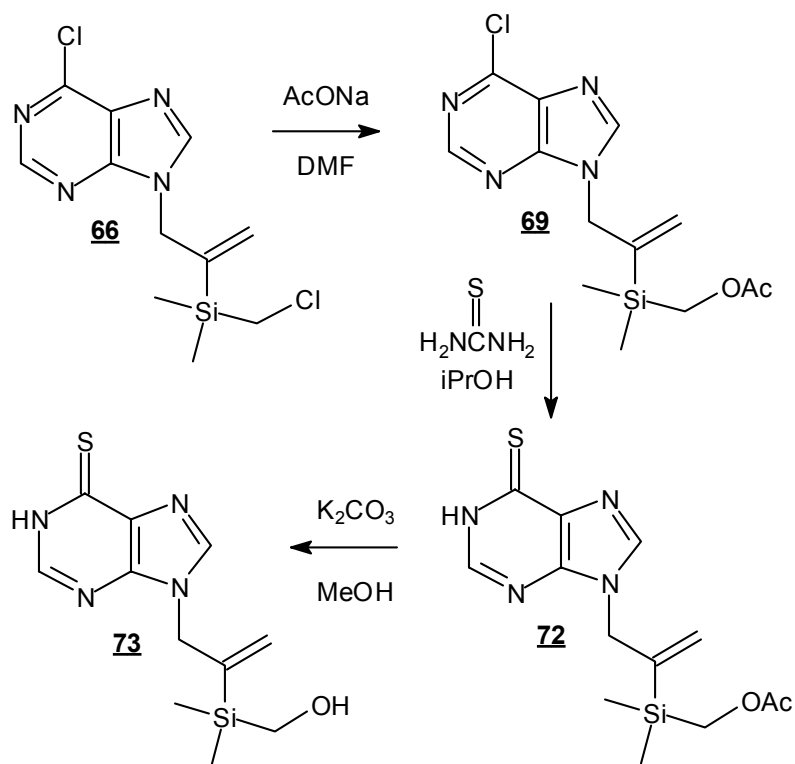


Figure 40 : Obtention du sila-conjugué thiohydroxylé de l'hypoxanthine **72**

L'adénine soumise à la réaction de Mitsunobu avec le lien organo-silicié insaturé **42** a conduit au composé **74** avec un rendement de 51% puis au composé **75** (71%) après acétoxylation et pour finir au composé **76** (78%) après méthanolyse basique (Figure 41).

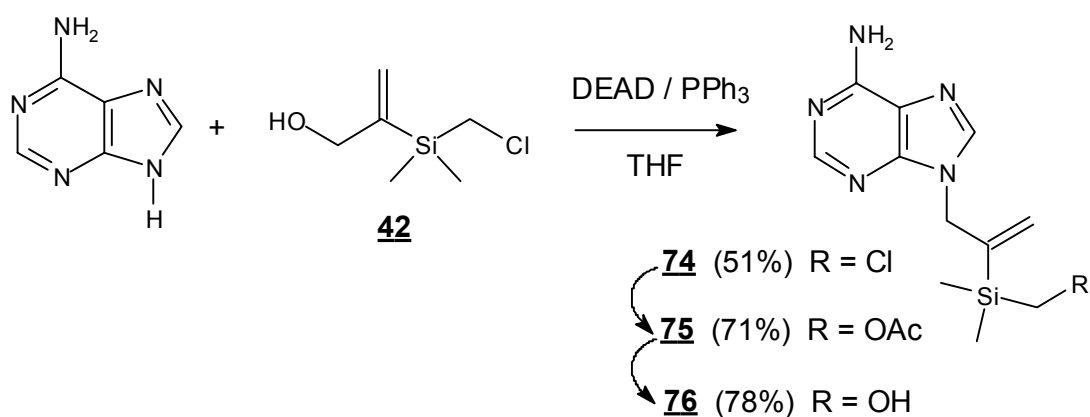


Figure 41 : Obtention d'un sila-conjugué de l'adénine **76**

2-2.1.3.2. SYNTHESE DES SILA-CONJUGUES DE LA THYMINE

Pour réaliser sélectivement l'alkylation en 1 de la thymine [40] nous avons effectué tout d'abord une protection indirecte en effectuant une dibenzoylation suivie d'une débenzoylation sélective. Nous avons obtenu exclusivement le composé monobenzoylé en position N-3 (**77**) avec un rendement de 90% [41] (Figure 42).

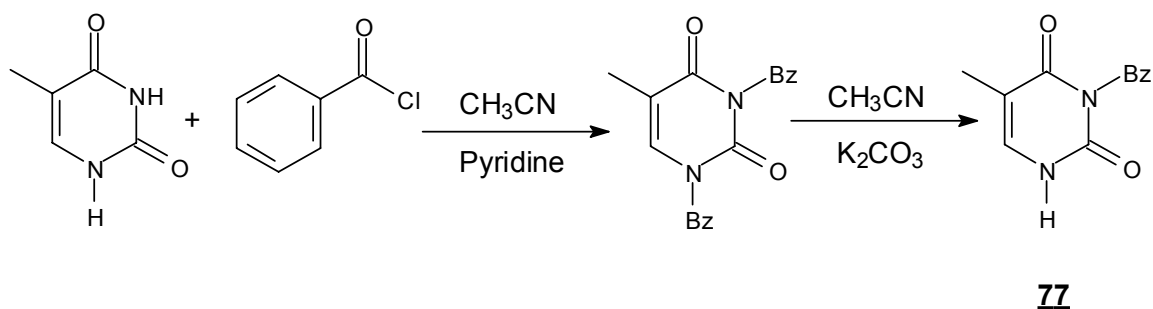


Figure 42 : Protection sélective en position N-3 de la thymine

Ce dérivé a ensuite été engagé dans une réaction de Mitsunobu avec les fragments siliciés insaturés **42** et **43**. Les rendements de couplage de l'isomère E avec la thymine se révèlent plus faibles que ceux obtenus avec **42**, comme observé précédemment avec la 6-chloropurine. (Tableau 15).

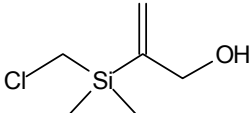
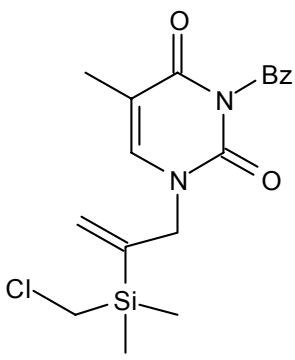
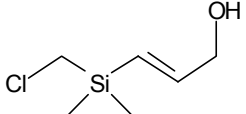
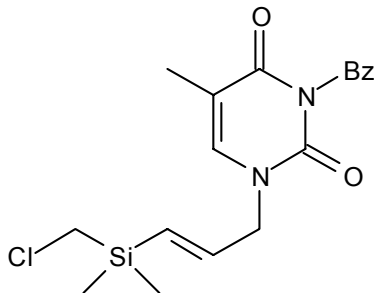
Liens organo-siliciés	Rdt %	Sila-conjugués
 <p style="text-align: center;"><u>42</u></p>	71	 <p style="text-align: right;"><u>78</u></p>
 <p style="text-align: center;"><u>43</u></p>	26	 <p style="text-align: right;"><u>79</u></p>

Tableau 14 : Rendement de la réaction de Mitsunobu avec la thymine comme substrat

Après déprotection du groupement benzoylé (85%), le composé **80** obtenu est ensuite engagé dans une réaction en deux étapes conduisant au dérivé acétylé **81** (70%) par réaction avec l'acétate de sodium dans le DMF, puis au composé hydroxylé **82** (94%) après méthanolyse catalysée par l'acide *p*-toluène sulfonique (Figure 43).

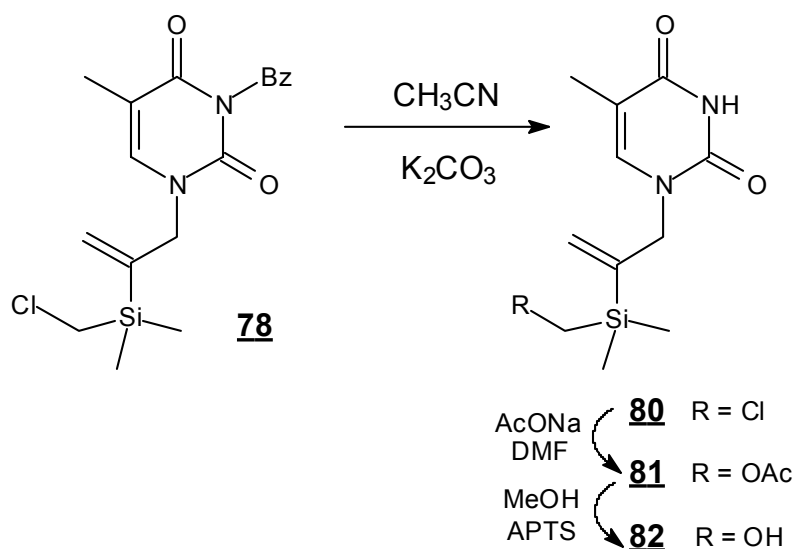


Figure 43 : Synthèse du sila-conjugué **82** de la thymine

La majorité de ces composés, comme ceux de l'acide ascorbique et de l'hypoxanthine, a fait l'objet de tests de cytotoxicité puis de tests plus spécifiques de leur reconnaissance par les systèmes de transport des ostéoprogéniteurs.

2-2.2. LES BRAS ESPACEURS

La molécule cible doit être exposée aux cellules, donc déployée dans un milieu principalement aqueux. La partie du bras espaceur proche de l'analogue devra donc posséder des caractéristiques hydrophiles, favorisant ainsi le dépliement du système dans les fluides biologiques. A partir de travaux déjà décrits dans la littérature [12], nous avons pensé utiliser un lien polyéther. Parallèlement, il est indispensable d'éviter un repliement de cette partie hydrophile porteuse de la cible sur le biomatériau qui est le plus souvent hydrophile. Nous avons donc introduit un segment hydrophobe pour éloigner le bras de la surface du matériau : l'acide caproïque a été choisi pour cette opération [12].

Nous avons doté une des extrémités de ce bras espaceur d'un système acrylique, rendant possible le greffage sur le support par voie radicalaire après irradiation. A l'autre extrémité, une fonction organique réactive permettra de condenser l'analogue de la molécule naturelle considérée.

Nous avons ainsi envisagé la synthèse d'un bras espaceur possédant une vingtaine d'atomes permettant de mieux exposer la molécule cible aux cellules (Figure 44).

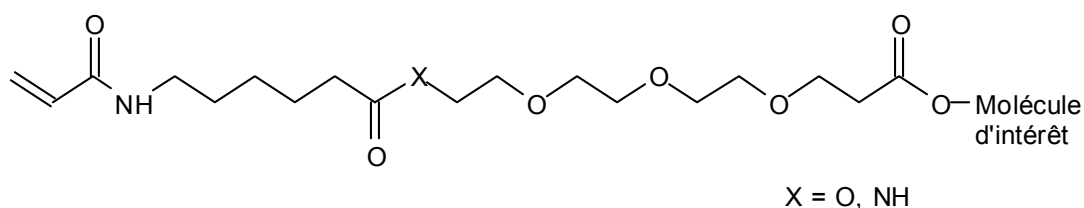


Figure 44 : Schéma du bras espaceur associé à la cible

Nous avons débuté par la synthèse du lien hydrophobe en associant l'acide 6-amino-caproïque avec du chlorure d'acryloyle dans une solution aqueuse d'hydroxide de calcium [42] (Figure 45).

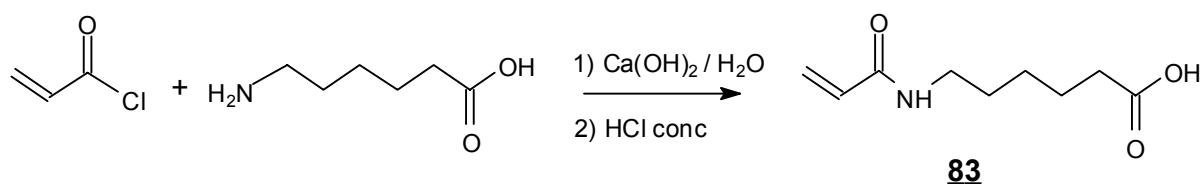


Figure 45 : Synthèse de la partie hydrophobe du bras espaceur

Nous obtenons, le produit **83** avec un rendement de 70%. De plus, il possède une entité acrylique nécessaire à notre stratégie de greffage. Pour la synthèse de la partie hydrophile nous sommes partis de triéthylène glycol. Une réaction de Michaël entre le monoalcoolate du triéthylène glycol en excès et de l'acrylate de tertibutyle (Figure 46), a permis d'obtenir le produit **84** avec 95% de rendement [43].

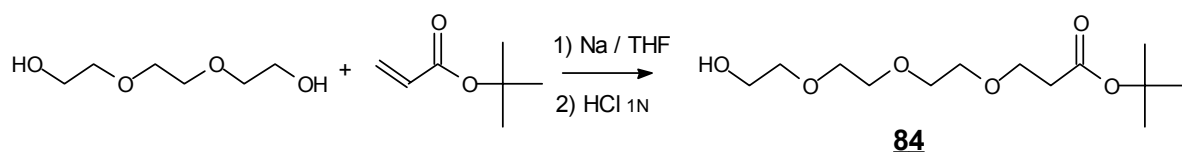


Figure 46 : Synthèse de la partie hydrophile du bras espaceur

Ce composé possède une extrémité acide carboxylique protégée sous forme d'ester de tertibutyle. La condensation des deux fragments hydrophobe (**83**) et hydrophile (**84**) effectuée selon la méthode classique d'estérification par association d'un alcool et d'un acide non activé, n'a donné aucun résultat. Nous avons alors utilisé les modes opératoires pratiqués en synthèse peptidique [44, 45] : activation de la fonction acide du composé (**83**) par le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et couplage avec la fonction alcool (Figure 47).

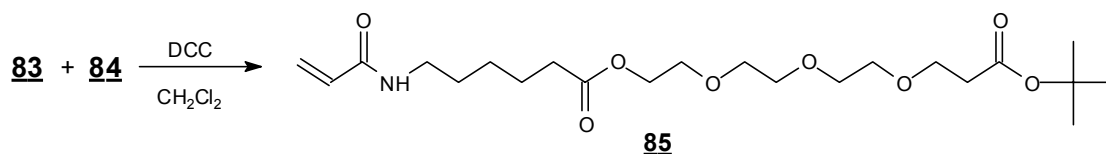


Figure 47 : Couplage par estérification conduisant au bras complet

Nous avons ainsi obtenu le composé **85** avec un rendement de 25%. Par crainte que la liaison ester ne soit trop rapidement dégradée dans le milieu biologique nous avons entrepris la synthèse d'amides (X = NH) dont la liaison est plus énergétique. Il était donc nécessaire d'introduire une fonction amine sur le composé **84**. Nous l'avons réalisé en trois étapes (Figure 48). La première conduit au tosylate **86** avec 70% de rendement [46].

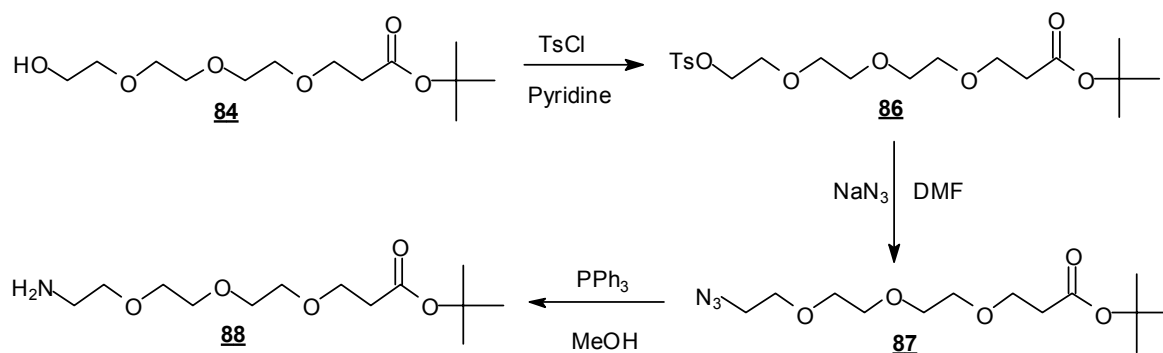


Figure 48 : Obtention d'une amine libre sur la partie hydrophile

Le groupe tosylo a ensuite été substitué au moyen d'azoture de sodium dans le DMF pour donner le composé **87** avec un rendement de 80%. Puis l'azoture réduit à l'aide de triphénylphosphine dans le méthanol. Nous avons ainsi obtenu le composé désiré **88** avec un rendement de 85% [47]. Ce dernier, couplé au composé **87** au moyen de DCC nous a permis d'isoler le composé **89** avec un rendement de 20% (Figure 49).

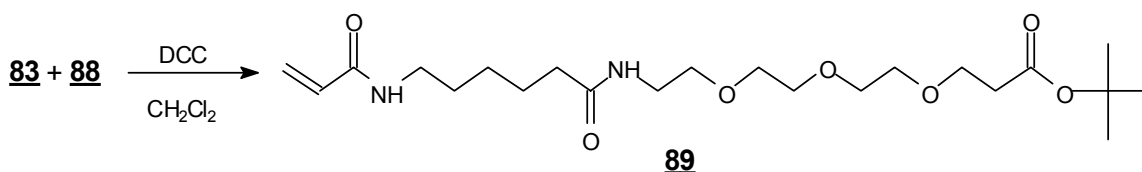


Figure 49 : Couplage par amidification conduisant au bras complet

Les composés **85** et **89** remplissent donc les critères requis. Ils présentent l'alternance de segments hydrophobe et hydrophile ainsi que des extrémités fonctionnalisées permettant le greffage au matériau et la liaison au sila-conjugué.

La dernière étape consiste à fixer le sila-conjugué aux bras espaceurs **85** et **89**. Ceci nécessite de déprotéger les fonctions acides terminales pour permettre ensuite leurs activations par le DCC. Cette étape a été effectuée au moyen d'acide trifluoroacétique dans l'anisole ; elle conduit aux composés **90** et **91** avec des rendements respectifs de 65 et 90% (Figure 50).

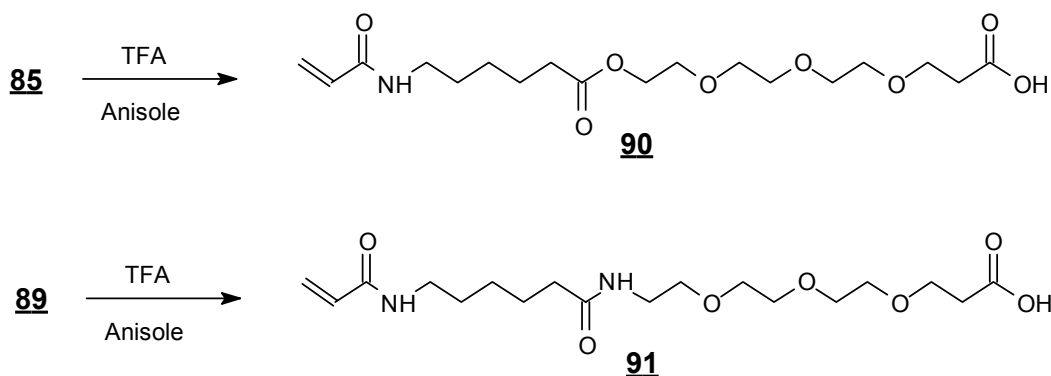


Figure 50 : Déprotection du bras espaceur

Les produits **90** et **91** ont ensuite été engagés dans la réaction de couplage avec la molécule (**70**) sélectionnée à la suite des tests biologiques préliminaires qui sont décrits dans le troisième partie de notre mémoire.

2-2.3. SYNTHESE DU BIO-CONJUGUE

Nous avons effectué le couplage en utilisant ici encore le dicyclohexylcarbodiimide en présence de dichlorométhane (Figure 51).

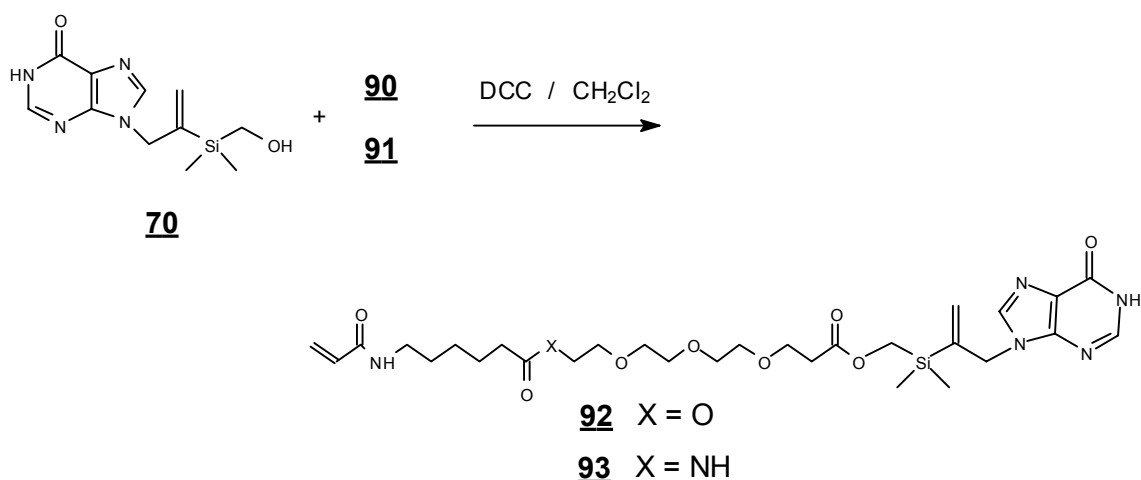


Figure 51 : Fixation de la molécule cible sur le bras espaceur

Les composés finaux **92** et **93** sont obtenus avec des rendements respectifs de 15% et 19%.

2-3. GREFFAGE SUR UN MATERIAU : LE PVDF

L'étape de greffage constitue l'ultime étape dans la préparation du biomatériau modifié biospécifiquement. Nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, comme modèle un matériau connu pour ses propriétés de biocompatibilité : le polyfluorure de vinylidène (PVDF) [48].

2-3.1. LE MATERIAU

L'essor des fluoropolymères date des années 1950 et a été motivé par la nécessité de synthétiser des matériaux de bonne tenue mécanique dans des conditions d'utilisation sévères. De formule brute $(-\text{CH}_2-\text{CF}_2)_n$, le PVDF est un polymère synthétisé par polymérisation radicalaire du 1,1-difluoroéthylène [49]. Il possède cinq formes cristallines dont la plus répandue est la phase α [50] (Schéma 17). Chimiquement inerte grâce à sa forte teneur en fluor, les propriétés mécaniques du PVDF en font un matériau résistant et flexible. Il est résistant aux ultraviolets et aux rayonnements ionisants, mais à partir de certaines doses (supérieures à 100 kGy), il subit des phénomènes de réticulation ou de dégradation. Récemment, le PVDF a trouvé des applications dans le domaine médical [48].

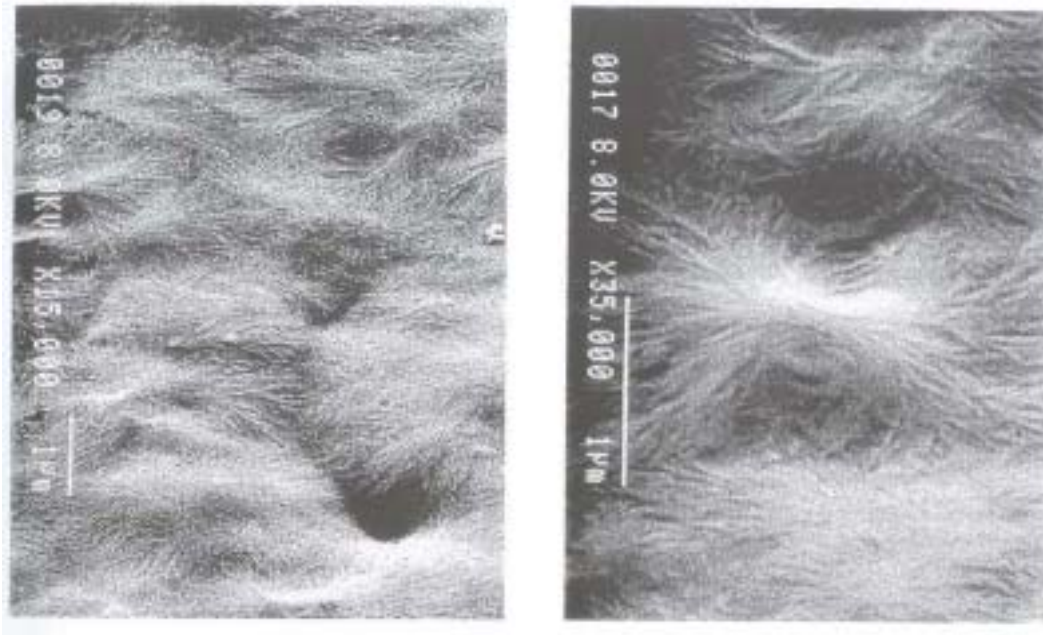


Schéma 15 : Représentation en microscopie électronique à balayage de la phase alpha du PVDF à différents grossissements

Des analyses par spectrométrie infrarouge (IR-TF) [51, 52] et par résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{13}C et du ^{19}F [53, 54] ont montré que la structure n'est pas toujours régulière (défauts d'arrangements monomériques correspondant à environ 5% de la chaîne polymère).

2-3.2. MODIFICATION CHIMIQUE DU PVDF

Nous avons fait subir au PVDF une irradiation par des rayonnements γ , pour créer des espèces actives permettant l'initiation des réactions de greffage du monomère considéré. Le rayonnement γ que nous avons utilisée sur les biomatériaux provient d'une source de ^{137}Cs (demi-vie de 30 ans). L'irradiation de l'échantillon est homogène ; elle atteint une plus grande profondeur que celle atteinte par des particules chargées. Nous avons cherché une technique de caractérisation de ces variations de surface. Nous avons choisi l'infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF) en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR). L'ensemble des spectres infra-rouge présenté ci-dessous ont été réalisés au sein du Laboratoire de Physico-Chimie

Moléculaire (LPCM) CNRS UMR 5803 avec l'aide du Dr Bernard DESBAT. Nous allons brièvement revenir sur cette technique, largement décrite dans la littérature.

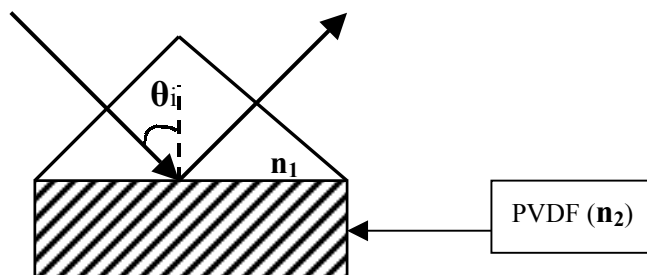


Figure 52 : Parcours du rayonnement dans un cristal ATR

Cette technique résulte de la propagation d'une radiation infra-rouge dans un cristal, d'indice de réfraction n_1 élevé. A l'interface avec un échantillon d'indice plus faible n_2 , cette radiation subit une réflexion totale lorsque l'angle d'incidence θ_i est supérieur à un angle critique θ_c défini par $\theta_c = n_2/n_1$ (Figure 52). Bien qu'il y ait réflexion totale à l'interface, une onde évanescente va se créer dans l'échantillon. L'intensité du champ magnétique de cette onde subit une décroissance exponentielle à partir de l'interface. L'interaction entre le champ électrique et les moments de transition des molécules de l'échantillon vont générer le spectre d'absorption.

2-3.2.1. IRRADIATION DU PVDF

Le PVDF utilisé au cours de cette étude est du PVDF-solef® fourni par la société Solvay. Des études par spectrométries infra-rouges ont permis de caractériser des signaux spécifiques de ce polymère. En effet, dans le domaine $3100 - 2900 \text{ cm}^{-1}$, les bandes caractéristiques des vibrations d'élongation anti-symétriques (3205 cm^{-1}) et symétriques (2985 cm^{-1}) des liaisons CH_2 mettent en évidence la contribution de la partie cristalline (courbe mauve Figure 53).

Le film de PVDF a reçu une dose de 100 kGray, dose pour laquelle nous avons la formation d'un maximum de radicaux libres en surface comme en profondeur sans pour autant dénaturer fortement le biomatériau. Les radicaux CH^\bullet générés, se réarrangent spontanément, en présence d'oxygène, en radicaux CHOO^\bullet . Ces derniers sont relativement stables et permettent une conservation des matériaux plusieurs semaines sans altérer le nombre des sites réactifs de surface. La réaction de greffage nécessite d'être chauffée afin que

la chaleur puisse permettre de dessorber l'oxygène de la surface du matériau et permettre la libération des radicaux CH^\bullet très réactifs. Ces sites potentiellement électrophiles peuvent constituer des cibles pour un système nucléophile comme des insaturations terminales.

Nous avons alors caractérisé l'évolution de la surface de ce support par technique IR-TF (Figure 53). Le spectre de référence du PVDF irradié non greffé est représenté en bleu et celui du PVDF irradié en rouge.

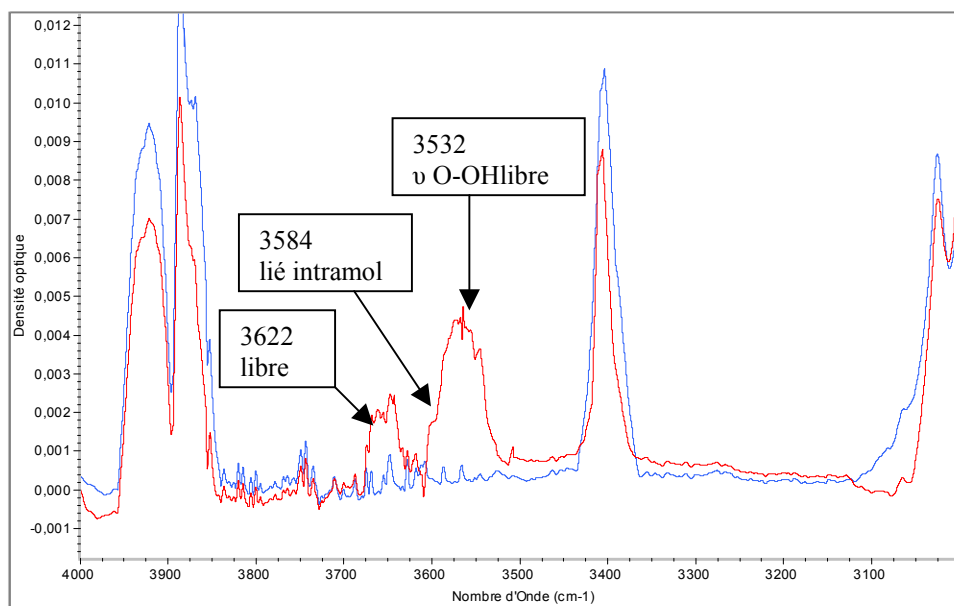


Figure 53 : Caractérisation de la variation de surface du PVDF avant et après irradiation

Les mesures effectuées par technique IR-TF en ATR nous ont permis de caractériser la présence des sites irradiés. En effet, l'irradiation sous air a généré à la surface du polymère des peroxydes (ROOH) qui absorbent ici à 3532 cm^{-1} . Nous pouvons aussi remarquer la présence de produits de dégradation : phénomène de réticulation caractérisé par un pic à 3584 cm^{-1} , et de dégradation caractérisée par un pic à 3622 cm^{-1} ainsi que l'apparition d'alcools secondaires (3580 cm^{-1}).

2-3.2.2. FIXATION DU BIO-CONJUGUE

Nous avons effectué le greffage avec la molécule organique **93** (Figure 54). En effet, nous n'avons pas pu obtenir la molécule **92** en assez grande quantité pour réaliser ces réactions.

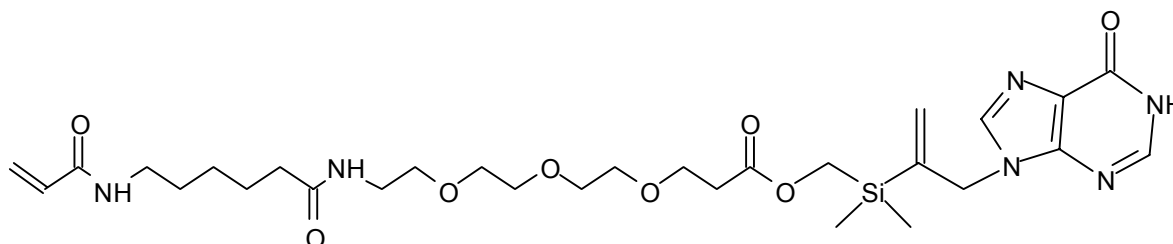


Figure 54 : Bio-conjugué **93**

La réaction de greffage a été réalisée sous atmosphère inerte dans un réacteur contenant les matériaux en PVDF (1 cm²). Nous avons ensuite ajouté une solution du composé organique **93** dilué à 10% dans du toluène anhydre. Après une heure de réaction sous atmosphère inerte à 60°C, les matériaux de PVDF sont récupérés lavés et séchés. La réaction a été réalisée à cette température afin de favoriser l'élimination des radicaux ROO[•] et leur transformation en radicaux R[•]. De plus, la présence du toluène va permettre un gonflement des chaînes de PVDF et optimiser l'accessibilité des points de greffage.

La surface du matériau est alors étudiée par la technique IR-TF en ATR. La Figure 55 montre le spectre de référence du PVDF irradié non greffé (bleu) et celui du PVDF irradié greffé pendant une heure.

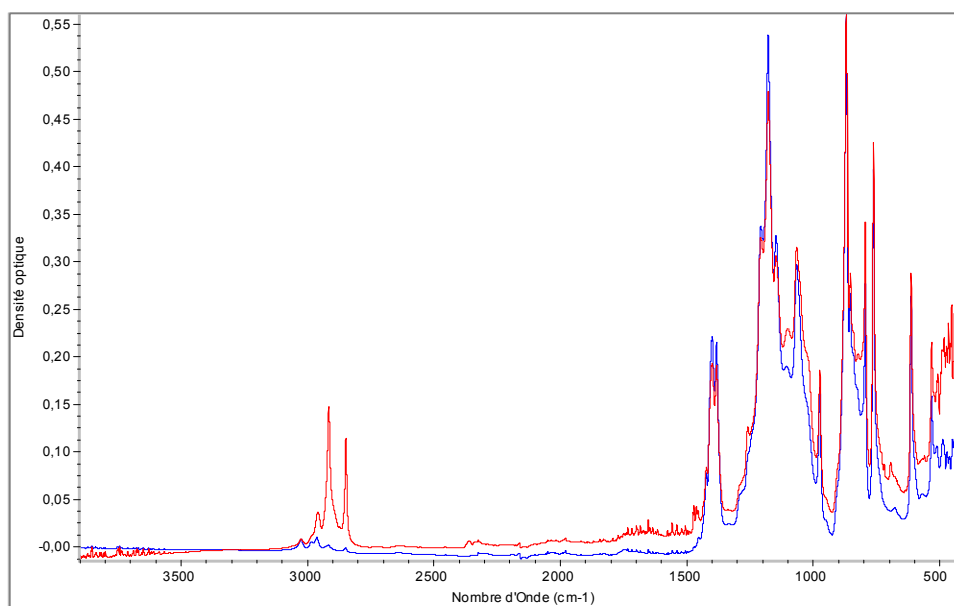


Figure 55 : Spectres ATR du PVDF irradié non greffé (bleu) et greffé (rouge)

Nous avons étudié les deux spectres présentés Figure 55 sur la totalité de la fenêtre spectrale. Les différentes zones caractéristiques sont présentées dans les Figures 56 à 61.

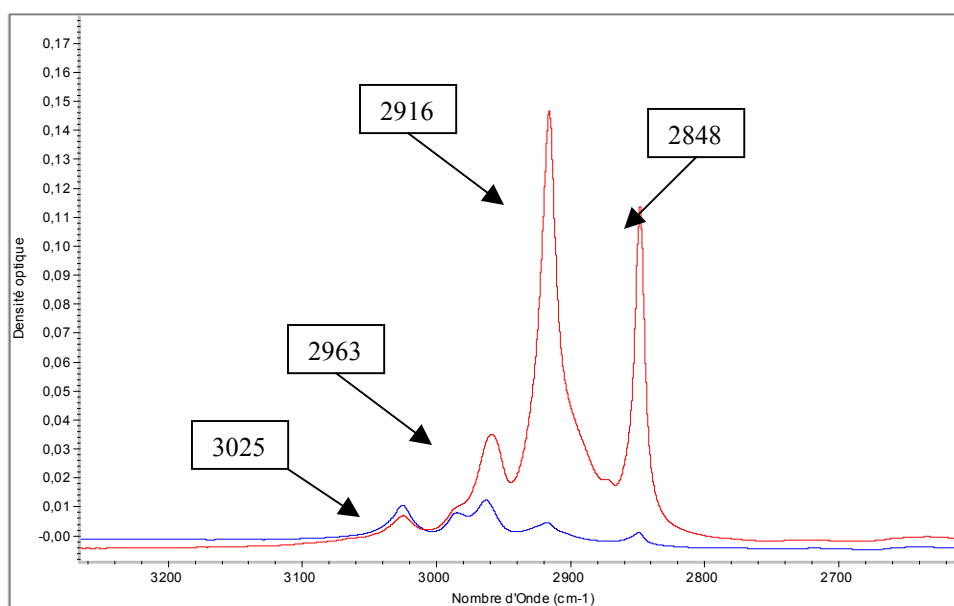


Figure 56 : Fenêtre spectrale de 3200 à 2700 cm^{-1}

Nous remarquons dans la fenêtre spectrale comprise entre 3200 et 2700 cm^{-1} (Figure 56) que les deux spectres présentent des différences notables. En effet, le spectre bleu présente les pics caractéristiques des CH_2 vibration d'élongation asymétrique 2916 cm^{-1} et vibration d'élongation symétrique 2848 cm^{-1} du polyfluorure de vinylidène. Après greffage,

nous remarquons une nette augmentation de la proportion des CH₂ aliphatiques qui proviennent des différents CH₂ présents dans le bras espaceur. Cette augmentation peut aussi être en partie due à la présence dans cette zone des énergies d'élongation des liaisons Si-CH₃ qui sont particulièrement intenses.

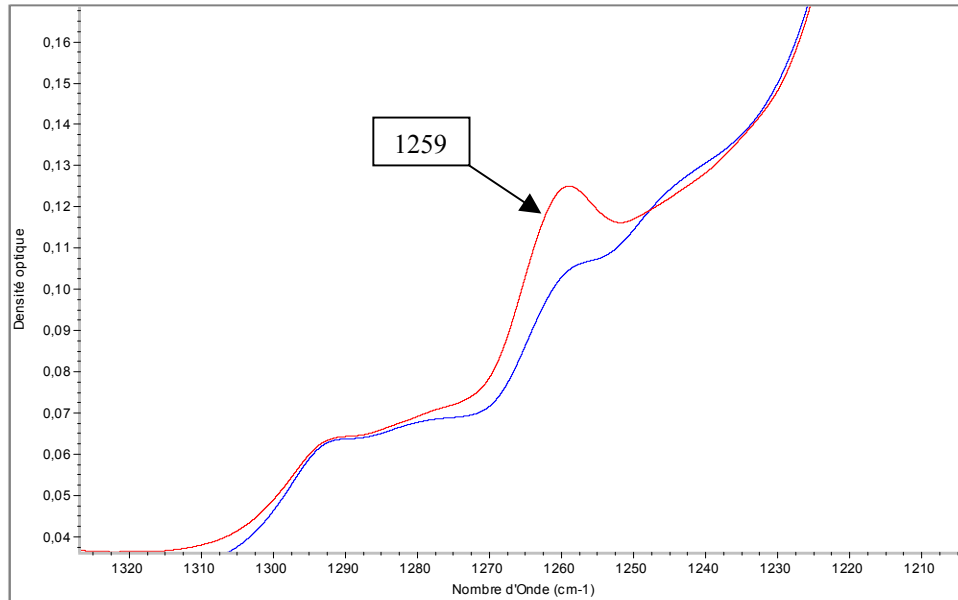


Figure 57 : Fenêtre spectrale de 1320 à 1220 cm⁻¹

Dans la fenêtre spectrale représentée Figure 57 nous observons la présence d'un épaulement nettement marqué dont la localisation à 1259 cm⁻¹ correspond sensiblement à l'énergie vibrationnelle des liaisons Si-C.

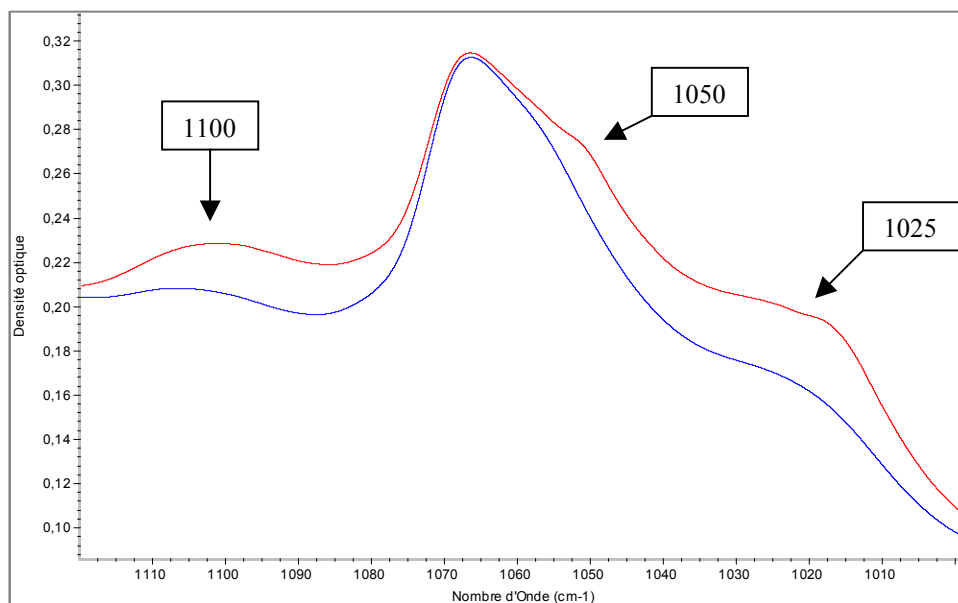


Figure 58 : Fenêtre spectrale de 1120 à 1010 cm⁻¹

En regardant la fenêtre spectrale entre 1120 et 1010 cm^{-1} (Figure 58) nous constatons des variations entre les deux spectres pouvant correspondre notamment aux énergies des liaisons éthers (C-O-C élongation)

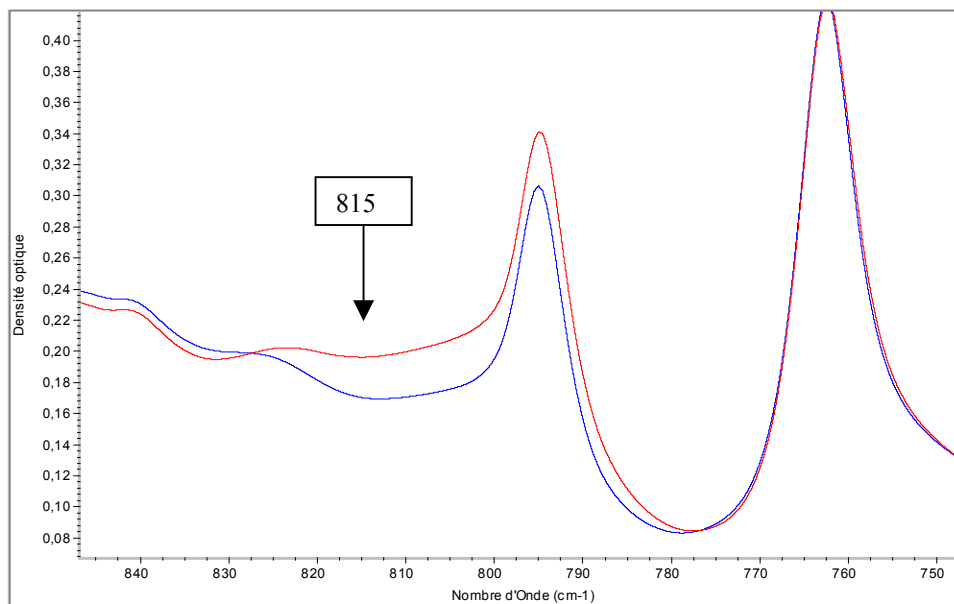


Figure 59 : Fenêtre spectrale de 840 à 750 cm^{-1}

Dans la fenêtre spectrale entre 840 et 750 cm^{-1} (Figure 59), nous pouvons de nouveau constater une différence notable dans la zone située entre les deux courbes vers 815 cm^{-1} pouvant correspondre à l'énergie d'élongation des liaisons Si-C.

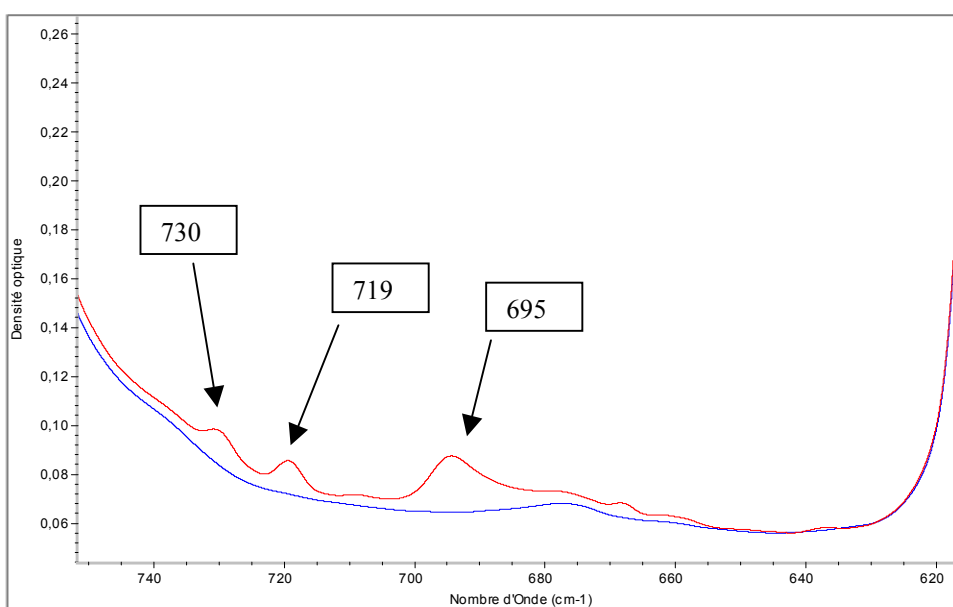


Figure 60 : Fenêtre spectrale de 740 à 620 cm^{-1}

Dans la fenêtre allant de 740 à 620 cm^{-1} Figure 60 nous remarquons que le pic principal, à 695 cm^{-1} est en accord avec un pic caractéristique du spectre de référence de l'hypoxanthine [55]. En ce qui concerne les autres variations (730 et 719 cm^{-1}) elles pourraient correspondre aux rCH_2 (vibration).

Il semble que la réaction de greffage nous a permis de fixer de façon covalente **93** sur le PVDF. Des études doivent être réalisées pour caractériser plus précisément ce greffage.

Pour la suite, il serait particulièrement intéressant de :

- renouveler ces expériences afin de valider la reproductibilité de ce greffage en optimisant le mode opératoire,
- utiliser différents modes de détection afin d'analyser la surface du biomatériau greffé,
- et ainsi définir d'un point de vue qualitatif et quantitatif le greffage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 2

- [1] Qutob A., Dixon S.J., Wilson J.X. : Insulin stimulates Vitamin recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. *Endocrinology* **1998** ; 139 : 51-56.
- [2] Wilson J.X., Dixon S.J. : High affinity sodium dependant uptake of ascorbic acid by rat osteoblasts. *J. Membrane Biol.* **1989** ; 111 : 83-91.
- [3] Kazuo M., Shoichiro O. : Syntheses of novel hybrid vitamin C derivatives : stability and biological activity. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996** ; 69 : 725-734.
- [4] Winkler B.S. : In vitro oxidation of ascorbic acid and its preservation by GSH. *Biochim. Biophysic Acta* **1987** ; 925 : 258-264.
- [5] Ichiro K., Yoshie M., Ji L., Toshio I. : Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation. *Biochimica and Biophysica Acta* **1998** ; 1425 : 209-214.
- [6] Simpson G.L., Ortrwrth B.J. : The non-oxidation degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochimica and Biophysica Acta* **2000** ; 1501 : 12-24.
- [7] Kagawa Y., Mano Y., Shimazono N. : Biodegradation of dehydro-L-ascorbic acid ; 2,3-diketoaldonic acid decarboxylase from rat liver. *Biochimica and Biophysica Acta* **1960** ; 43 : 348-349.
- [8] Kanfer J., Ashwell G., Burns J.J. : Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from L-ascorbic acid in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **1960** ; 235 : 2518-2521.
- [9] Koshiishi I., Mamura Y., Liu J., Imanari T. : Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation. *Biochimica and Biophysica Acta* **1998** ; 1425 : 209-214.
- [10] Osses N., Pearson J.D., Yudilevich D.L., Jarvis S.N. : Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochemical J.* **1996** ; 317 : 843-848.
- [11] Donin B.A., Mahony W.B., Zimmerman T. : Purine nucleobase transport in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **1988** ; 263 : 9276-9284.
- [12] Kantlehner M., Schaffner P., Finsinger D., Kessler H. : Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblasts adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBioChem* **2000** ; 1 : 107-114.
- [13] Tacke R., Linoh H. : The Chemistry of Organic Silicon Compounds. Ed. Patai S., Rappoport Z. **1989** chap 18 : 1143-1206.

- [14] Fessenden R.J., Ahlfors C. : The metabolic fate of some silicon containing carbamates. *J. Med. Chem.* **1968** ; 10 : 810-812.
- [15] Tamao K., Akita M., Kumada M. : Oxidative cleavage of the silicon-carbon bond in alkenylfluorosilanes to carbonyl compounds : synthetic and mechanistic aspects. *J. Organomet. Chem.* **1983** ; 254 : 13-22.
- [16] Au-Yeung B.W., Fleming I. : Allylsilanes in organic synthesis : a synthesis of prostaglandins. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1977** ; 3 : 79-80.
- [17] Iwao O. : The hydrosilylation reaction. *The Chemistry of Organic Silicon Compound* Ed Patai S., Rappoport Z. **1989** ; chap 25 : 1479-1526.
- [18] Kharasch M.S., Jensen E.V., Urry W.H. : Addition of phosphorus trichloride to olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1945** ; 67 : 1864.
- [19] Calas R., Duffaut N., Valade J. : Preparation of alkoxy silanes and their cleavage by acetyl chloride in the presence of zinc chloride. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1955** ; 790.
- [20] Valade J., Calas R. : Preparation and structure of silicon ether. *C.R. Acad. Sci. Paris* **1956** ; 243 : 386.
- [21] Speier J.L., Webster J.A., Barnes G.H. : *J. Am. Chem. Soc.* **1957** ; 79: 974.
- [22] Ponomarenko V.A., Cherkaev V.G., Petrov A.D., Zadorazhnyi N.I. : Chloroplatinic acid as catalyst in the reaction of addition of silane hydrides to unsaturated compounds. *Chem. Avstr.* **1958** ; 52 : 12751.
- [23] Benkeser R.A., Cunico R.F., Dunny S., Jones P.R., Nerlekar P.G. : The formation of 1,6-bis(trichlorosilyl)hexane by the chloroplatinic acid catalysed hydrosilylation of 1-hexyne. *J. Org. Chem.* **1967** ; 32 : 2634.
- [24] Eaborn C. : Organosilicon compounds I Formation of alkyl iodides. *J. Chem. Soc.* **1949** : 2755-2764.
- [25] Nielsen T. : Industrial applications possibilities for lipase. *Fat Sci. Technol.* **1985** ; 87 : 15-19.
- [26] Luyten M., Müller S., Herzog B. : Enzyme-catalysed hydrolysis of some functionalized dimethyl malonate. *Helv. Chim. Acta.* **1987** ; 70 : 1250-1254.
- [27] Fritsche K., Syldatk C., Wagner F., Hengelsberg H., Tacke R. : Enzymatic resolution of *rac*-1,1-dimethyl-1-sila-cyclohexan-2-ol by ester hydrolysis of transesterification using a crude lipase preparation of *Candida cuniculata*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **1989** ; 31 : 107-111.

- [28] De Jeso B., Belair N., Deleuze H., Rasclé M.C., Maillard B. : Enzyme in organic synthesis VI scope and enantioselectivity of enzymatic hydrolyses of organosilyl substituted esters. *Tet. Lett.* **1990** ; 31 : 653-654.
- [29] Mutua L.N., Akoh C.C. : Synthesis of alkyl glycoside acid esters in non-aqueous media by *Candida* spp. lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993** ; 70(1) : 43-46.
- [30] Coulon D., Girardin M., Ghoul M. : Enzymatic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochem.* **1999** ; 34 : 913-918.
- [31] Van Alphen J. : Ether and ester II The formation of ether from alcohol **1930**.
- [32] Bishop C.A., De Puy C.H. Reactivity of tosylates in displacement and elimination reaction. *Chem and Ind (London)* **1959** : 297-298.
- [33] Alder K., Flock F.H. : The preparation of the isomeric cyclopentanones and some compounds of cyclopentene derived from cyclopentadiene. *Chem. Ber.* **1956** ; 89 : 1732-1737.
- [34] Meerwein H., Hing G. : Changes in properties of chemical compounds by complex formation VI ; Methylation of alcohols by diazomethane. *Am. Chem.* **1931** ; 484 : 1-25.
- [35] Mitsunobu O. : The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981** ; 1 : 1-28.
- [36] Hughes D.L. : The Mitsunobu Reaction. *Organic Reactions* **1992** ; 42 : 335-656.
- [37] Falck J.R., Yu J., Cho H-S. : A convenient synthesis of unassymmetric polyfluoroethers. *Tet. Lett.* **1994** ; 35 : 5997-6000.
- [38] Tsunoda T., Nagaku M., Nagino C. : Carbone-carbone bond formation with new Mitsunobu reagents. *Tet. Lett.* **1995** ; 36 : 2531-2534.
- [39] Huryn D.M., Sluboski B.C., Broder S. : Synthesis and anti-HIV activity of isonucleosides. *J. Med. Chem.* **1992** ; 35 : 2347-2354.
- [40] Thibon J., Latxague L., Deleris G. : Synthesis of silicon analogues of acyclonucleotides incorporable in oligonucleotide solid phase synthesis. *J. Org. Chem.* **1997** ; 62 : 4635-4642.
- [41] Cruickshank K.A. : The benzylation of uracile and thymine. *Tet. Lett.* **1984** ; 25 : 681-684.
- [42] Pless D.D., ChuanLee Y., Reseman Schnaar R.L. : Specific Cell adhesion to immobilized glycoproteins demonstrated using new reagents for protein and glycoprotein immobilization. *J. Biol. Chem.* **1983** ; 258 : 2340-2349.

- [43] Seitz O., Kunz R.H.: HYCRON, an allylic anchor for high efficiency solid phase synthesis of protected peptides and glycopeptides. *J. Org. Chem.* **1997** ; 62 : 613-826.
- [44] Sokolovsky M., Wilchek M., Patchornik A. : On the synthesis of Cysteine peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1964** ; 86 : 1202-1206.
- [45] Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F. : The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1964** ; 86 : 1839-1842.
- [46] Willis M.C., Collin B., Zhang T., Janjic N. : Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamer. *Bioconjugate Chem* **1998** ; 9 : 573-582.
- [47] Vaultier R., Knovzi N., Carrié R.: Réduction d'azides en amines primaires par une méthode générale utilisant la réaction de Staudinger. *Tet. Lett.* **1983** ; 24(8) : 763-764.
- [48] Laroche G., Marois Y., Guidoin R., King M.W., Martin L., How T., Douville Y. : Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial : From polymeric raw material to monofilament vascular suture. *J. Biomed. Mat. Research* **1995** ; 29 : 1525-1536.
- [49] Dohany J.E., Robb L.E. : Polyvinylidene fluoride. *Encyclopedia of Chemical Technology*. W. interscience, Editor **1980** ; 64-74.
- [50] Doll W.W., Lando J.B. : Polymorphism of Polyvinylidene Fluoride. III. The crystal Structure of Phase II. *Journal of Macromolecular Science-Physic* **1970** ; B4(2) : 309-329.
- [51] Tournut C. : Conférence donnée à l'école doctorale des hauts polymères à Strasbourg. *Les Polymères Fluorés* **1994**.
- [52] Benedetti E., Catanorchi S., D'Alessio A., Moggi G., Vergamini P., Parcella M., Ciardelli F. : FT-IR-Microspectroscopy and DSC Studies of Polyvinylidene fluoride. *Polymer International* **1996** ; 41 : 35-41.
- [53] Kobayashi M., Tashiro K., Tadokoro H. : Molecular Vibrations of Three Crystal Forms of Polyvinylidene fluoride. *Macromolecules* **1975** ; 8 : 158-171.
- [54] Wilson C.W. : NMR Study of Molecular Chain Structure of Polyvinylidene Fluoride. *Journal of Polymer Science* **1963** ; A , 1 : 1305-1310.
- [55] Spectre de l'hypoxanthine Keller R.J. : The Sigma Library of FT-IR spectra Ed. 1 Vol 2.

TROISIEME PARTIE :

EVALUATION BIOLOGIQUE

DES DERIVES SYNTHETISES

Nous avons soumis l'ensemble des molécules synthétisées à des tests de cytotoxicité. Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec le groupe de l'Unité INSERM 443 animé par le Dr Joëlle AMEDEE. Ils sont de deux types. Le premier test utilise le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) : ce composé est un sel de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit et se transforme en cristaux bleus de formazan par les succinates deshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. L'évaluation de la quantité de formazan généré par les cellules après leur incubation avec le MTT est reliée directement à l'activité des succinates deshydrogénases, elle-même reliée à la viabilité cellulaire [1]. Le deuxième est le test au rouge neutre (RN) qui est un colorant vital pour les cellules. Il se fixe par liaison électrostatique aux sites anioniques des membranes lysosomiales dans les cellules vivantes. Une altération de cette membrane provoque une diminution de la fixation de colorant ; il est alors possible, après quantification de la coloration, d'évaluer le nombre de cellules vivantes après incubation en présence de l'un de nos sila-conjugués [2]. Ces deux méthodes complémentaires d'évaluation de la viabilité cellulaire permettent de déterminer le seuil de cytotoxicité des substances que nous souhaitons tester sur les cellules ostéoprogénitrices humaines en croissance. Ces deux tests ont été réalisés sur l'ensemble des sila-conjugués dont les formules chimiques sont représentées sur la feuille volante ci-jointe. Par souci de clarté, nous n'avons représenté que les résultats des tests au MTT. En effet, les tests au rouge neutre nous ont donné des résultats parfaitement comparables.

Comme nous l'avons déjà abordé, l'ensemble des tests biologiques ont été réalisés avec des cellules ostéoprogénitrices qui proviennent après différenciation de cellules stromales de la moelle osseuse humaine (HBMSC). Ces travaux ont été réalisés par rapport à un contrôle qui correspond à 100% de viabilité cellulaire. Ce contrôle permet d'évaluer le taux de viabilité cellulaire en présence des différents dérivés. Si ce taux est inférieur à 70% du contrôle (barre noire schématisée sur les différents histogrammes), le dérivé testé est alors considéré comme une molécule cytotoxique.

Pour les composés non cytotoxiques les tests ont été poussés plus en avant en réalisant des mises en compétition entre les dérivés synthétisés et les molécules naturelles correspondantes. Les molécules testées, ayant donné des résultats positifs, ont été retenues comme candidat éventuel à la fixation sur le bras espaceur puis sur le support polymère.

3-1. CRIBLAGE DES COMPOSES SYNTHETISES

3-1.1. SILA-CONJUGUES DE L'ACIDE ASCORBIQUE

3-1.1.1. TESTS DE CYTOTOXICITE

Nous avons effectué les tests de cytotoxicité des composés saturés ; les résultats sont présentés dans l'histogramme suivant : (Figure 61)

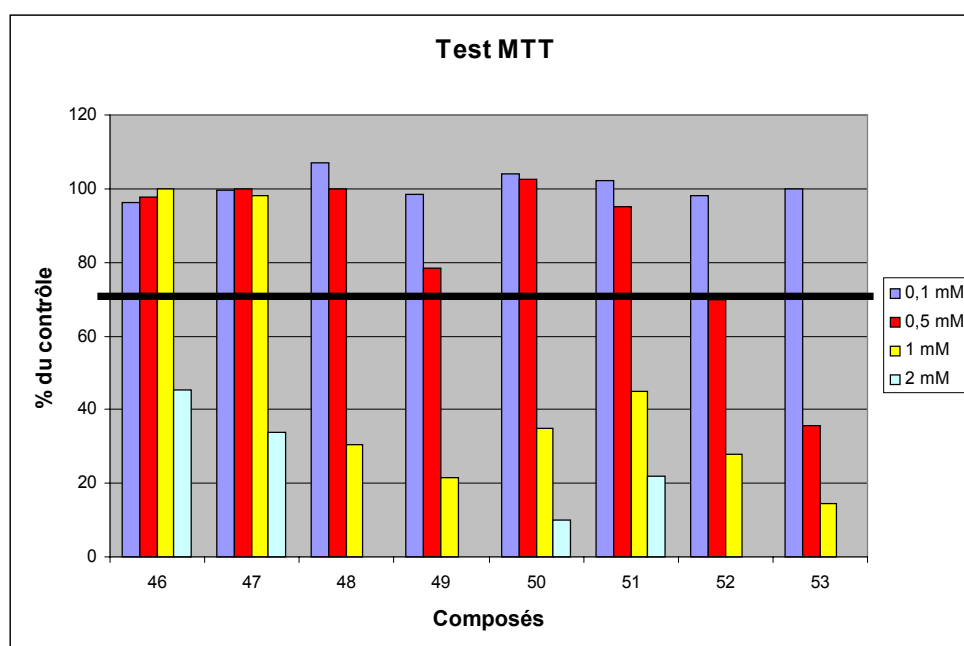


Figure 61 : Tests de cytotoxicité des différents analogues en fonction de leur concentration

Les résultats montrent clairement que lors du passage de trois à six carbones de la chaîne liée au silicium, nous avons apparition d'une cytotoxicité (à partir de cinq carbones **48**

et **49**). De plus, il semble que ce phénomène soit amplifié par la présence sur l'autre partie du fragment chlorobutylsilyle. Les composés **50** et **51** sont cytotoxiques à partir de 1 mM, et dès 0,5 mM pour les composés **52** et **53**.

Nous avons effectué les tests de cytotoxicité des composés insaturés ; les résultats sont présentés dans l'histogramme de la Figure 62.

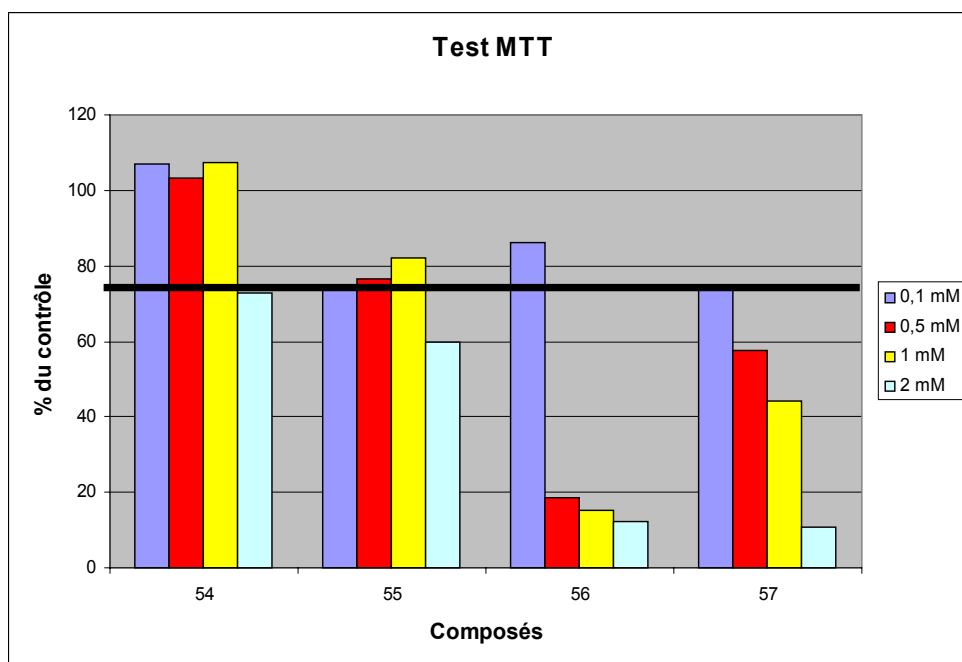


Figure 62 : Tests de cytotoxicité des dérivés siliciés insaturés de l'acide ascorbique

Nous constatons que le composé **54** n'est pas du tout cytotoxique et qu'il faut atteindre des concentrations importantes (2 mM) pour voir apparaître une cytotoxicité cellulaire. En ce qui concerne l'analogue **55** utilisant l'isomère E silicié, nous remarquons que les tests sont très proches de la barre critique des 70% de survie par rapport au contrôle. De plus, pour les dérivés chlorobutylsilyle nous constatons qu'ils sont, tous les deux, très rapidement cytotoxiques à faibles concentrations. L'ensemble des sila-conjugués possédant une extrémité chlorobutyle est donc plus ou moins cytotoxique et ne sera pas retenu pour la suite de nos travaux.

3-1.1.2. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT

Dans cette expérience, nous mettons en présence les cellules ostéoprogénitrices, les sila-conjugués de l'acide ascorbique non cytotoxiques et la molécule marquée (Figure 63).

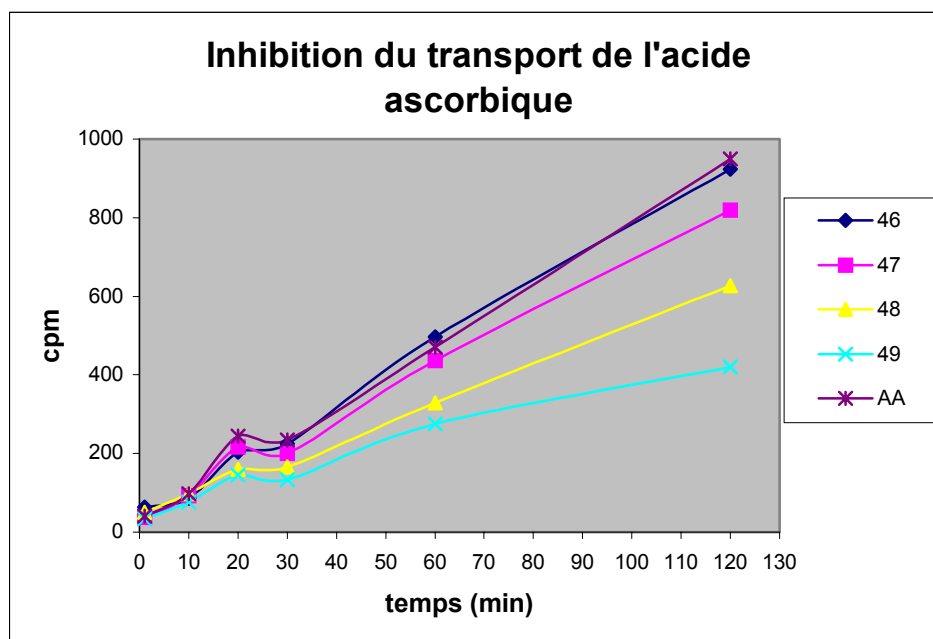


Figure 63 : Inhibition du transport de l'acide ascorbique par les sila-conjugués 46 à 49

L'activité des composés 46 à 49 a été testée à une concentration correspondant à dix fois le K_m ($30 \mu M$) de la molécule naturelle ; cette concentration est choisie dans les expériences de ce type de façon à placer les protéines de transport de la molécule naturelle dans un état de fonctionnement maximal. Si le sila-conjugué inhibe le transport, nous pourrions alors visualiser directement les variations d'incorporation de la molécule naturelle en nous affranchissant du paramètre correspondant à la vitesse du transport. **Nous pouvons constater que le composé 48 inhibe le transport de l'acide ascorbique à hauteur de 30% et le composé 49 à hauteur de 50%.**

Nous avons effectué la même expérience que précédemment mais en utilisant cette fois les dérivés insaturés de l'acide ascorbique (Figure 64).

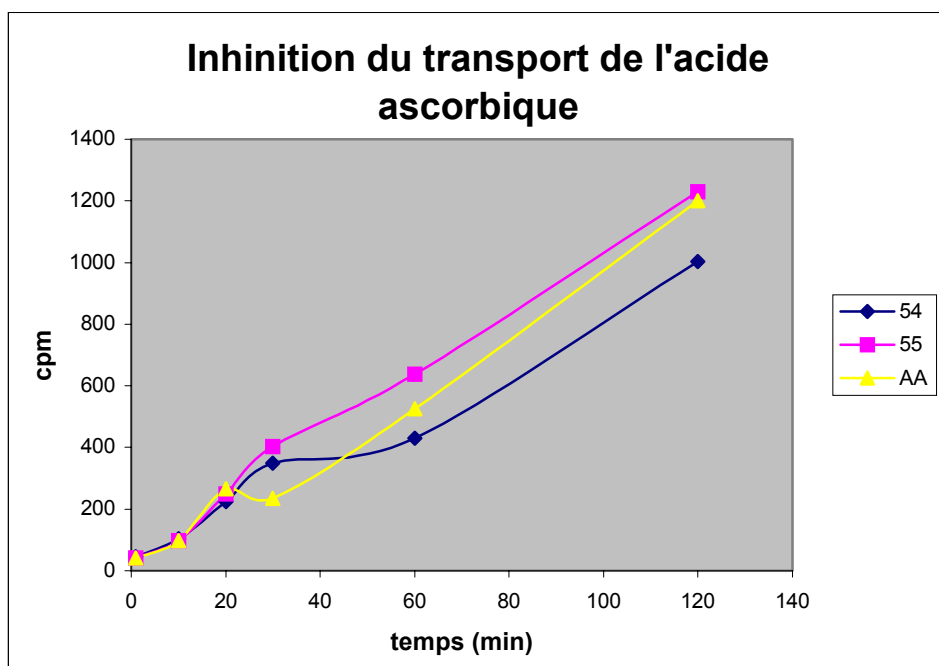


Figure 64 : Inhibition du transport de l'acide ascorbique par les composés 54 et 55

A la vue des résultats nous remarquons qu'il n'y a pas d'inhibition notable du transport d'acide ascorbique par les sila-conjugués 54 et 55.

A la suite des tests sur l'ensemble des sila-conjugués de l'acide ascorbique, nous remarquons une inhibition du transport de la molécule naturelle par les composés 48 et 49. Cette inhibition est à relativiser aux vues des résultats de cytotoxicité de ces deux composés. Ces molécules restent très intéressantes dans le cadre d'un relargage de ces molécules naturelles à proximité de la zone lésée.

3-1.2. SILA-CONJUGUES DES BASES NUCLEIQUES

3-1.2.1. TESTS DE CYTOTOXICITE

Nous avons effectué les tests de cytotoxicité sur le sila-conjugué saturé **65** et sur les sila-conjugués **66**, **68** et **70**, les résultats sont présentés dans l'histogramme suivant : (Figure 65).

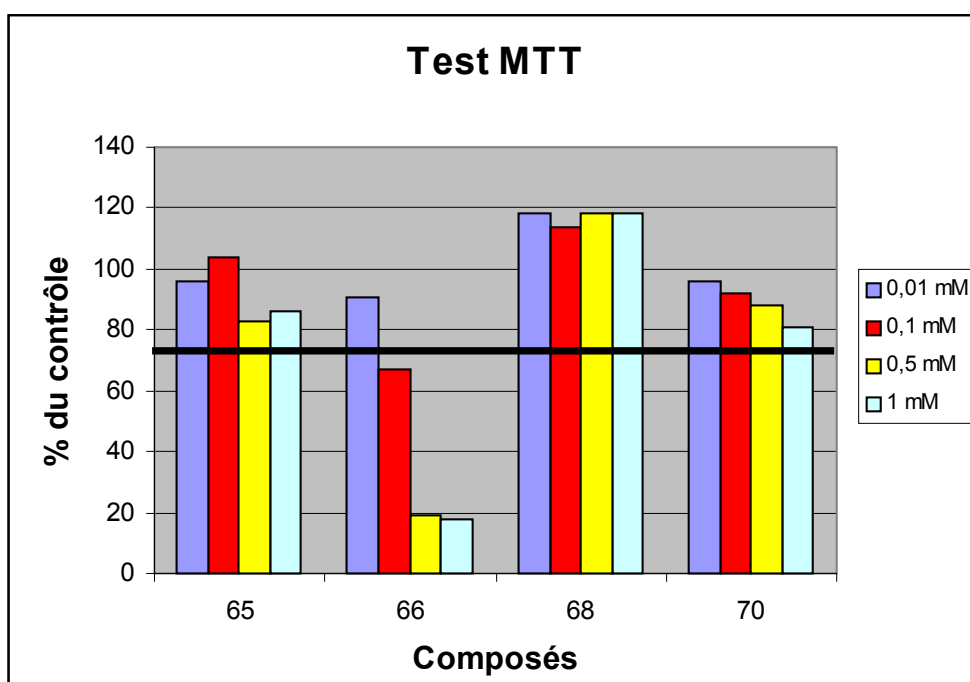


Figure 65 : Tests de cytotoxicité des sila-conjugués de l'hypoxanthine

Il apparaît clairement que les trois composés **65**, **68** et **70** ne sont pas cytotoxiques. Par contre le sila-conjugué (**66**) est particulièrement cytotoxique dès les concentrations de 0,1 mM. Nous n'avons donc pas poursuivi les travaux avec ce composé.

De même, nous avons réalisé ces tests sur les composés synthétisés **71**, **73**, **76**, **80**, et **82** : (Figure 66)

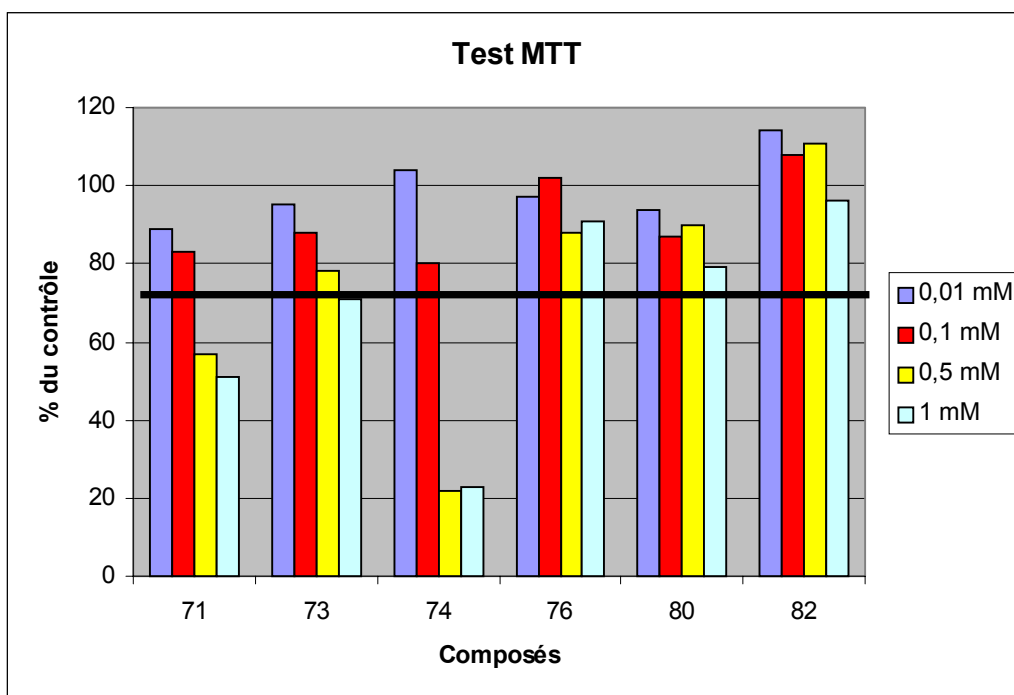


Figure 66 : Tests de cytotoxicité des autres dérivés des bases puriques

L'analyse de ces résultats, nous a permis de sélectionner les dérivés les moins cytotoxiques 73, 76, 80 et 82. En effet 71 et 74 sont trop cytotoxiques par rapport au contrôle. Nous avons donc réalisé les tests d'affinité des dérivés choisis par rapport au transporteur de l'hypoxanthine.

3-1.2.2. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT

Lors de ces tests, nous avons mis en compétition l'hypoxanthine marquée au carbone 14 avec un sila-conjugué non marqué et nous avons alors évalué l'éventuel taux d'inhibition des sila-conjugués synthétisés vis-à-vis du transport de l'hypoxanthine (Figure 67). Nous avons testé le dérivé de la thymine, de l'adénine et de la 6-chloropurine sur le transporteur de l'hypoxanthine, dans le but de voir s'il y avait une réelle spécificité du transporteur pour la molécule naturelle ou si cette protéine était susceptible de faire pénétrer différentes molécules (Figure 67).

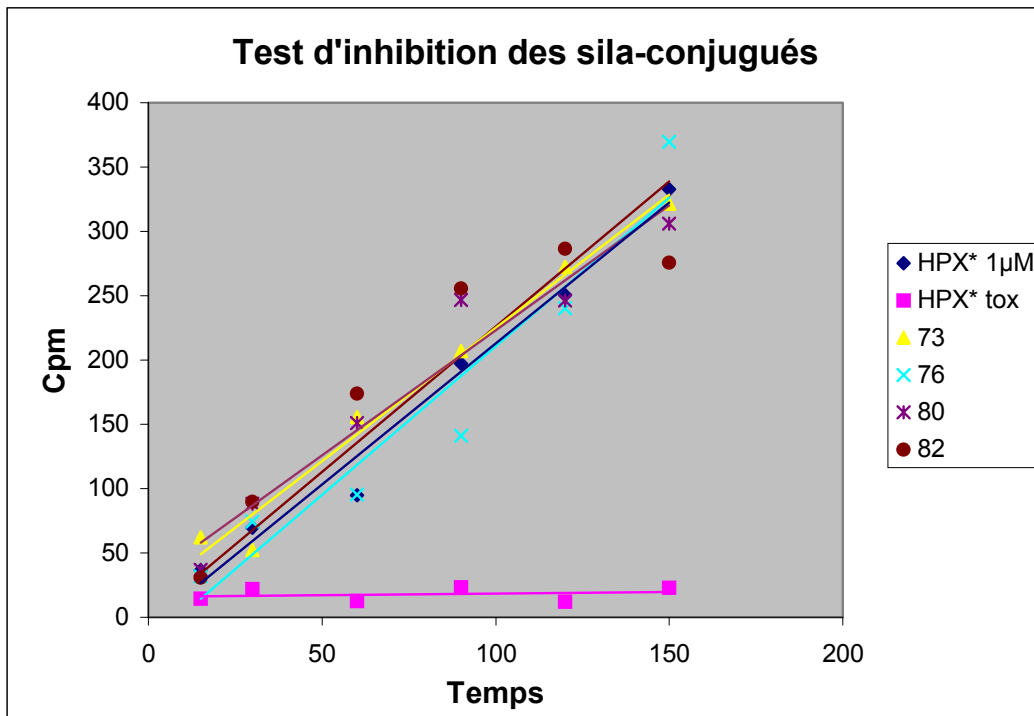


Figure 67 : Tests d'inhibition des sila-conjugués des autres bases nucléiques

Nous n'observons aucune modification du transporteur de l'hypoxanthine quel que soit le sila-conjugué utilisé. De même, en ce qui concerne les sila-conjugués de bases pyrimidiques, il ne semble pas que le transport de la molécule naturelle soit affecté.

Puis nous avons effectué les tests des sila-conjugués de l'hypoxanthine ; les résultats sont présentés Figure 68 :

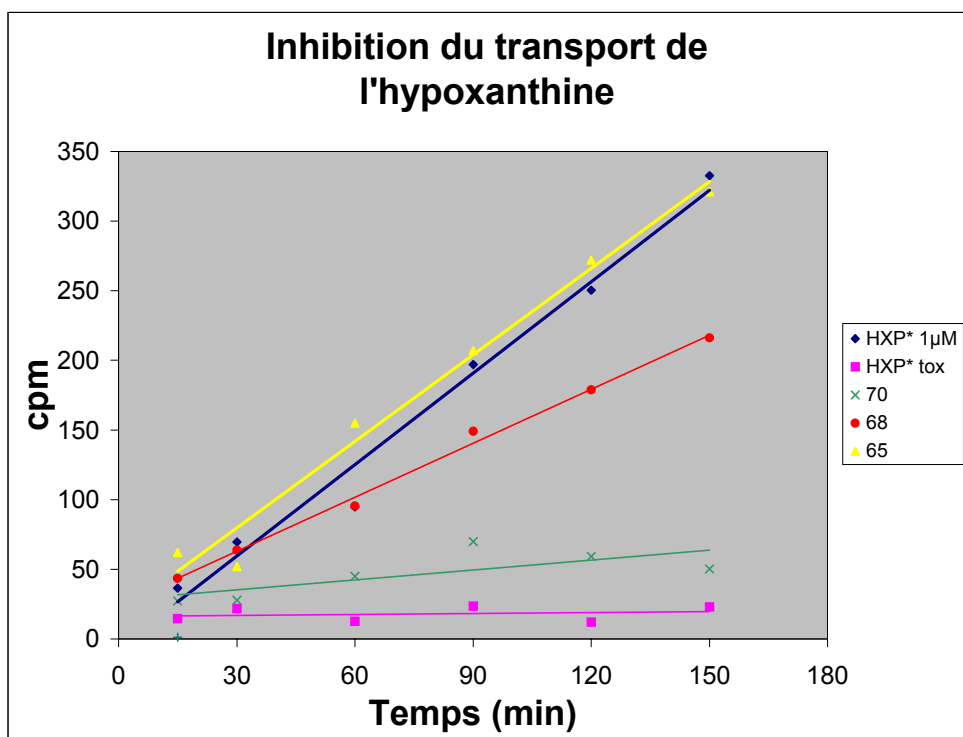


Figure 68 : Transport de l'hypoxanthine marquée en présence des différents analogues.

Les résultats présentés pour les composés 65, 68 et 70 sont associés aux deux témoins, positif (transport de l'hypoxanthine seule \blacklozenge) et négatif (transport de l'hypoxanthine en présence de NaN_3 et de CCCP \blacksquare).

Nous remarquons aisément que la présence du composé 65 n'inhibe pas le transport de la molécule naturelle. En ce qui concerne les sila-conjugués 68 et 70 ils provoquent une forte diminution de l'entrée de la molécule naturelle au cours du temps et donc une inhibition du transport d'hypoxanthine. Les constantes d'inhibition correspondantes de ces deux molécules sont respectivement : IC_{50} (70) = 6,5 μM et IC_{50} (68) = 11,6 μM . Elles sont de l'ordre du K_m de la molécule naturelle. Les sila-conjugués possèdent à peu près la même capacité de fixation sur le transporteur que la molécule naturelle. Nous pouvons donc envisager de faire de ces deux molécules des substrats pour la fonctionnalisation du biomatériau.

La synthèse de l'ensemble de ces sila-conjugués nous a conduits après différents tests biologiques, à sélectionner deux composés (68 et 70), dérivés de l'hypoxanthine, susceptibles d'être reconnus par le transporteur membranaire de cette molécule naturelle.

3-2. TEST D'ADHESION CELLULAIRE SUR LE PVDF GREFFE

L'ensemble de nos travaux présentés précédemment nous a permis d'aboutir à un système composé d'un matériau polymère constitué de polyfluorure de vinylidène sur lequel nous avons greffé un bio-conjugué composé d'un bras espaceur et d'une molécule d'intérêt biologique (non-RGD) elle-même associée à un lien organo-silicié. Cette molécule d'intérêt a été greffée parce qu'elle présentait après sa modification par le lien organo-silicié, une très bonne affinité pour le transporteur de la molécule naturelle. Il était donc particulièrement important pour finaliser notre travail et valider l'hypothèse de départ, de tester notre matériau greffé chimiquement par le bio-conjugué **93** sur des ostéoprogéniteurs.

Comme nous l'avons abordé dans la première partie de ce mémoire (paragraphe 1-2.2.3.3.), de nombreux travaux sont actuellement en cours sur la modification de matériaux de façon à favoriser leurs propriétés ostéoinductrices par rapport aux propriétés ostéoconductrices bien connues maintenant. Ces travaux tournent principalement autour d'un tripeptide (RGD) dont la séquence est retrouvée dans la plupart des protéines de la matrice extracellulaire (la laminine [3], la fibronectine [4], le collagène [5], l'ostéopontine [6]). Ce peptide est reconnu par certains récepteurs membranaires appelés intégrines (protéine transmembranaire) impliquées dans les phénomènes d'adhésion [7, 8]. Ces recherches donnent lieu à de nombreuses publications dont les thèmes suivent deux axes principaux :

- identifier les cibles du tripeptide RGD définissant ses modes d'interaction en tant que séquence pro-adhésive
- tenter de transformer cette séquence en modifiant la structure spatiale (cyclisation du RGD) ou en synthétisant des analogues qui favoriseraient l'adhésion cellulaire, voire la spécificité de cette adhésion.

Dans les deux cas les résultats de ces travaux ont amené d'importantes évolutions concernant l'adhésion des cellules sur les biomatériaux [9]. Nous avons donc essayé de reprendre ici ces études en nous axant cette fois, non plus sur les objectifs et les méthodes

(paragraphe 1-2.2.3.3.) mais sur les résultats en terme d'adhésion cellulaires et ceci d'un point de vue chronologique.

Une des méthodes de modification d'un biomatériau a consisté par exemple à le recouvrir d'un gel de collagène enrichi en peptide RGDS [10], c'est à dire un peptide RGD associé à une sérine. Ces expériences ont permis de montrer que des cellules de mélanomes de souris (K1735M4) adhéraient de façon croissante (en nombre) à la surface du gel en fonction de la concentration du peptide dans le gel. Parallèlement, ces mêmes travaux réalisés avec le peptide RGES (l'acide aspartique est remplacé par l'acide glutamique) n'ont montré aucune modification en terme d'adhésion. La séquence RGD est donc un élément déterminant dans l'adhésion des cellules, de plus sa présence au sein du collagène (22 peptides par monomère de collagène) permet une augmentation de l'adhésion cellulaire d'un facteur 1,5.

Dans le même sens, des travaux sur l'évolution de la minéralisation de la MEC à la surface du biomatériau modifié par du RGD ont été effectués [11]. Ils montrent que cette minéralisation est dépendante de la densité de molécules RGD présentées en surface, et est également spécifique de cette séquence (l'utilisation de la séquence RGE n'entraîne aucun processus de minéralisation).

Parallèlement, des travaux sur la spécificité du peptide proadhésif RGD ont été menés en synthétisant des analogues [12]. Ces derniers possèdent une tyrosine en lieu et place de la glycine ce qui permet une importante fonctionnalisation (*via* le cycle benzénique) et un suivi plus facile (toujours par l'intermédiaire de ce cycle aromatique). Parmi les différents analogues synthétisés, un d'entre eux a été greffé sur un support en polyéthylène téréphtalate (PET). Cette modification de surface permet une augmentation de l'adhésion cellulaire (cellules CaCo₂) d'un facteur 2 par rapport au PET non greffé. Cependant, cette modification n'apporte rien en terme d'adhésion par rapport PET greffé avec du RGDS.

Les travaux les plus récents ont permis de mettre en évidence l'importance de la structure tridimensionnelle du peptide RGD. Des études menées sur le peptide RGD cyclique ont montré leur très forte activité vis-à-vis des processus d'adhésion cellulaire [13, 14].

En effet, l'étude de l'adhésion de cellules ostéoprogénitrices humaines a été réalisée après recouvrement de la surface du matériau titane (Ti₆Al₄V) par des peptides. Ces derniers étaient soit linéaires (GRGDSPC) soit cycliques (c(-DFKRG-)). Les résultats après trois heures d'incubation donnent dans les deux cas un taux de greffage supérieur d'un facteur 2,5 par rapport au matériau non modifié [14].

Puis ces différentes molécules peptidiques ont été fixées de façon covalente sur du poly(méthyl)métacrylate : PMMA [13]. Après greffage chimique des tests d'adhésion et de prolifération cellulaire ont été menés sur une période de 22 jours avec des ostéoblastes de souris MC3T3-H1. Les résultats ne montrent aucune évolution entre 0 et 5 jours cependant à partir du cinquième jour nous observons une forte prolifération cellulaire sur le PMMA greffé par rapport au PMMA non greffé, ceci pour aboutir au 22^{ème} jour à une différence d'adhésion d'un facteur 10.

Pour finir, nous allons aborder les matériaux de comblement vasculaires [15]. Le matériau utilisé est de la silice sur laquelle est greffé de façon covalente un système organique permettant l'exposition du peptide RGDC aux cellules. Les résultats de l'adhésion des cellules endothéliales humaines sur des matériaux greffés sont 2,3 fois plus important qu'en présence d'un matériau non greffé.

En ce qui concerne notre travail, nous avons effectué des tests d'adhésion avec des cellules ostéoprogénitrices humaines sur le support PVDF. Nous avons donc cultivé les ostéoprogéniteurs, en présence de différents matériaux témoins ou modifiés, puis déterminé qu'elle était l'influence du bio-conjugué sur l'attachement de ces cellules. Ceci a été effectué par l'intermédiaire d'un système de révélation biochimique [16, 17]. Le nombre de cellules à la surface des biomatériaux a pu être quantifié par dosage de l'activité de l'enzyme lysosomiale, la N-acétyl- β -D-hexosaminidase. Ceci est possible par l'addition au contact des cellules du substrat de cette enzyme le p-nitrophényl N-acétyl- β -D-glucosaminide. Le substrat est ainsi laissé au contact des cellules pendant plusieurs heures. La réaction est alors bloquée par l'ajout d'un mélange de glycine et d'EDTA. En fonction du taux d'hydrolyse du substrat nous visualisons l'apparition d'une couleur plus ou moins jaune dans les puits. Ces variations de couleur sont quantifiées par une lecture au spectrophotomètre à 405 nm et permettent une corrélation avec le nombre de cellules adhérentes à la surface du biomatériau. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion par rapport au plastique des boîtes de culture, considéré comme la valeur contrôle correspondante au 100% d'adhésion. Les résultats de ce test sont présentés Figure 69.

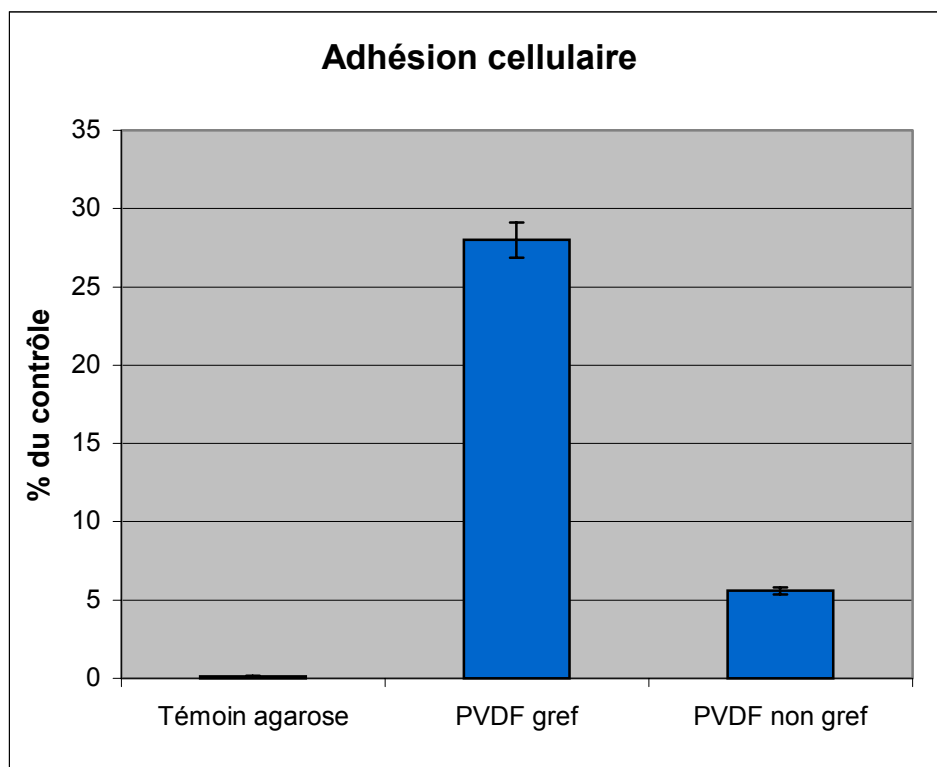


Figure 69 : Test de l'adhésion des ostéoblastes sur PVDF greffé et non greffé

Le 100% du contrôle correspond à l'attachement des ostéoblastes sur le plastique.

Le témoin d'agarose constitue le support sur lequel nous avons déposé nos différents matériaux pendant l'incubation. Ce support correspond à un témoin de non-adhésion cellulaire. **Il apparaît, après ces premiers résultats, que le PVDF greffé avec le bio-conjugué 93 favorise l'attachement des ostéoblastes en surface d'un facteur 5 par rapport au matériau non greffé.**

Nous avons détaillé dans ce chapitre l'ensemble des modifications des matériaux qui permettaient de favoriser l'adhésion cellulaire. Il reste particulièrement difficile d'interpréter nos résultats en les comparant à ceux exposés ci-dessus. En effet, nous n'utilisons pas les mêmes types cellulaires, les matériaux support sont la plupart du temps, différents et pour finir, les modes opératoires diffèrent en tout point. Les résultats préliminaires de notre travail constituent un point de départ pour poursuivre les recherches dans cette voie en multipliant les matériaux greffés et les caractérisations des étapes de greffage et d'adhésion.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 3

- [1] Moshmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **1983** ; 65 : 55-63.
- [2] Parish C.R., Mullbacher A. : Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **1983** ; 58 : 225-227.
- [3] Grant D.S., Tashiro K., Kleinman H.K. : Two different laminin mediaite the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *Cell* **1989** ; 58 : 933-943.
- [4] Pytela R., Pierschbacher M.D. Ruoslahti E. : Platelet membrane glycoprotein IIb / IIIa : member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptor. *Science* **1986** ; 231 : 1559-1562.
- [5] Dedhar S. : Signal transduction *via* the Béta-1 integrins in a required intermediate in interleukin-béta-1 induction of alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma cells. *Exp. Cell. Res.* **1989** ; 183 : 27-34.
- [6] Miyouchi A., Alvarez J., Greenfield E.M., Hruska K.A. : Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha V beta III stimulate cell signals in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **1991** ; 266 : 20369-20374.
- [7] Cheresch D.A., Mecham R.P. : Integrins, molecular and biological responses to extracellular matrix. London : *Academic Press* **1994**.
- [8] Clark E.A., Brugge J.S. : Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science* **1995** ; 268 : 233-239.
- [9] Vuola J., Göransson H., Böhling T., Asko-Seljavaara S. : Bone marrow induce osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* **1996** ; 9(2) : 1761-1766.
- [10] Myles J.L., Burgess B.T., Dickinson R.B. : Modification of the adhesive properties of collagen by covalent grafting with RGD peptides. *J. Biomat. Sci. Polymer Edn.* **2000** ; 11 : 69-86.
- [11] Rezanian A, Healy K.E. : The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *J. Biomed. Mat. Res.* **2000** ; 52 : 595-600.
- [12] Marchand-Brynaert J., Detrait E., Remacle C. : Biological evaluation of RGD peptidomimetics, designed for the covalent derivatization of cell culture substrata, as potential promoters of cellular adhesion. *Biomaterials* **1999** ; 20 : 1773-1782.

- [13] Kantlehner M., Schaffner P., Finsinger D., Kessler H. : Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblasts adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBioChem* **2000** ; 1 : 107-114.
- [14] Verrier S., Pallu S., Bareille R., Jonczyk A., Meyer J., Dard M., Amédée J. : Fonction of linear an cyclic RGD-containing peptide in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* **2002** ; 23 : 585-596.
- [15] Porté-Durrieu M.C., Labrugère C., Villars F., Lefèbvre F., Dutoya S., Guette A., Bordenave L., Baquey C. : Development of RGD peptides grafted silica surface : XPS characterization and human endothelial cells interaction. *J. Biomed. Mat. Res.* **1999** ; 46 : 368-375.
- [16] Landegren U. : Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surfaces antigens. *J. Immunol. Meth.* **1984** ; 67 : 379-388.
- [17] Majeska R.J., Port M., Einhorn T.A. : Attachment to extracellular matrix molecules by cells differing in the expression of the osteoblastic traits. *J. Bone Miner. Res.* **1993** ; 8 : 177-289.

CONCLUSION

L'étude présentée dans ce mémoire visait principalement à modifier chimiquement un matériau polymère dans le but d'augmenter son potentiel ostéoinducteur. Nous y sommes parvenus en plusieurs étapes :

- ◆ Tout d'abord nous avons identifié des molécules d'intérêt peu ou pas néo-synthétisées par les cellules ostéoprogénitrices, afin de mettre à profit l'étape de reconnaissance de la molécule lors de son transport membranaire. Nous avons isolé deux composés ou familles de composés : l'acide ascorbique et la famille des bases nucléiques (principalement les purines).
- ◆ Puis nous avons synthétisé un bras espaceur permettant, après greffage à un matériau biocompatible, l'exposition des molécules d'intérêt au milieu biologique. Le bioconjugué se compose ainsi d'un bras organique, d'un lien organo-silicié et de la molécule d'intérêt.
- ◆ Ensuite, nous avons entrepris le greffage de l'ensemble du bio-conjugué sur un matériau choisi pour ses caractéristiques de biocompatibilité, de résistance vis-à-vis des contraintes mécaniques et de radiations et à sa bonne inertie chimique.

Tout au long de nos travaux, nous avons réalisé différents tests biologiques. Nous avons évalué la cytotoxicité de l'ensemble de nos sila-conjugués. Puis nous avons réalisé des tests d'inhibition du transport de la molécule naturelle. Ceci nous a conduit à sélectionner deux sila-conjugués très intéressants en tant qu'inhibiteur du transport de l'hypoxanthine. Après l'étape de greffage nous avons effectué les tests d'adhésion des cellules ostéoblastiques qui se sont avérés positifs.

A l'issue de ces travaux nous avons obtenu un système organique possédant une activité biologique *via* son extrémité hypoxanthine. Le bio-conjugué a été greffé sur le PVDF de façon covalente, et le système complet semble favoriser l'adhésion des cellules ostéoprogénitrices.

Nous avons donc bien atteint l'objectif que nous nous étions fixé : Conception et évaluation de modifications biospécifiques de matériaux.

De plus, au cours de nos travaux, nous avons pu caractériser différents phénomènes biologiques et chimique non décrits :

- **Transport actif de l'hypoxanthine** au sein des cellules ostéoprogénitrices humaines.
- **Décarboxylation spontanée de l'acide ascorbique** au sein de ces mêmes cellules.
- **Utilisation d'une réaction enzymatique d'hydrolyse** afin de séparer deux régio-isomères.
- **Synthèse de molécules originales** par une adaptation du mode opératoire de la réaction de Mitsunobu

Il reste néanmoins de nombreux travaux à réaliser ; notamment d'un point de vue chimique, il est envisageable de rechercher et de synthétiser de nouveaux sila-conjugués présentant une bonne spécificité pour un type cellulaire donné. Il serait aussi très intéressant de développer de nouveaux bio-conjugués susceptibles d'être coupé au niveau du bras espaceur par des protéines spécifiques (MMP). Ceci pourrait nous conduire à des systèmes de délivrance contrôlée de substances biologiquement actives.

D'un point de vue biologique il serait important de réaliser des tests complémentaires afin de définir le plus précisément possible les mécanismes d'adhésion des cellules ostéoprogénitrices sur les biomatériaux.

Enfin, des études physico-chimiques pourraient permettre de caractériser quantitativement et qualitativement le greffage de nos bioconjugués sur le PVDF, voire sur d'autres matériaux.

PARTIE

EXPERIMENTALE

LA PARTIE EXPERIMENTALE

Cette partie expérimentale est divisée en trois sous parties :

La première correspond à la chimie et décrit le mode d'obtention des différents composés ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques.

La seconde traite des tests biologiques réalisés au cours de ce travail et du détail de leurs protocoles.

Pour finir la troisième partie décrit le mode opératoire mis en place lors de la réalisation des expériences de greffage du biomatériau et l'analyse de sa surface.

4-1. CHIMIE

4-1.1. TECHNIQUES GENERALES ET CARACTERISATION DES PRODUITS OBTENUS

Analyses élémentaires : les microanalyses de certains composés ont été effectuées par le service central de microanalyse du CNRS (BP 22 – 69390 VERNAISON France).

Spectrographie infrarouge : pour l'ensemble des analyses moléculaires nous avons utilisé un spectrographe IFS-25 (Bruker) de 4000 à 400 cm^{-1} et effectué 16 "scans". Les spectres des liquides ont été réalisés en film liquide pur entre deux plaques de NaBr, ceux des solides sous forme de pastilles dans KBr. En ce qui concerne les spectres IR-TF en ATR réalisés sur le biomatériau, nous avons utilisé un spectrographe Nexus 870 (Thermo-Optek) avec comme paramétrage un zéro filling de 2, une résolution de 4 et nous avons effectué 100 "scans". En ce qui concerne l'ATR, nous avons utilisé un « golden gate » (Specac) avec un cristal diamant et un angle de 45°.

Points de fusion : les points de fusion ont été déterminés sur banc Kofler.

Chromatographie sur couche mince (CCM) : nous avons utilisé des plaques Merk de gel de silice (60 F 254, épaisseur 0,25 mm). Comme révélateur, nous avons utilisé les rayons ultraviolets ($\lambda = 365 \text{ nm}$) ou une solution de KMnO_4 diluée à 1% dans l'eau.

Chromatographie sur colonne : les séparations ont été réalisées sur gel de silice 60 Merk de granulométrie 70/200 mesh. Les pourcentages des différents solvants sont donnés en volumes.

Spectroscopie de masse : les études par spectroscopie de masse ont été réalisées sur un spectromètre Finnigan Mat TSQ 70 triple quadripôle en mode de bombardement atomique (température d'ionisation : 150°C, pression d'ionisation : 20 mT, énergie électronique : 70eV, émission courante : 2mA).

Spectroscopie RMN : les spectres RMN, ^1H , et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 200 (^1H : 200,13 MHz ; ^{13}C : 50,32 MHz). Les déplacements chimiques

sont donnés en ppm à champ faible du TMS et les constantes de couplage en Hertz (Hz). Le tétraméthylsilane est pris comme référence. Nous emploierons pour décrire les spectres les abréviations suivantes : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet (massif complexe).

Cristallographie : les paramètres des mailles cristallines et les intensités diffractées ont été mesurés sur un diffractomètre automatique d'Enraf-Nonius CAD4 avec une radiation au cuivre ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$, monochromateur en graphite). Les dimensions des réseaux ont été affinées par moindres carrés à partir des valeurs de θ de 25 réflexions de l'espace. Parmi les réflexions indépendantes collectées, seules celles satisfaisant à l'inégalité $I > 2\sigma(I)$ ont été conservées pour les affinements. Les structures ont été établies par des méthodes classiques de Fourier. Tous les hydrogènes ont été positionnés par différence à partir des cartes de Fourier. Pour l'alignement de ces structures, les atomes d'hydrogène ont été affectés des paramètres β_i d'agitation thermique isotrope tandis que tous les autres atomes étaient affectés des paramètres β_{ij} d'agitation thermique anisotrope.

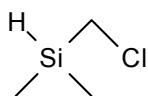
Produits commerciaux et matières premières : nous avons séché puis distillé les solvants de qualité technique (éther, THF...). Nous avons stocké tous les solvants qui devaient être anhydres sur des tamis moléculaires préalablement activés dans une étuve à vide chauffée à 300°C pendant 5 heures. La triéthylamine comme la pyridine ont été stockées sur des pastilles de potasse.

Appareillage : La majorité des réactions a été conduite en milieu dégazé puis sous atmosphère inerte d'azote ou d'argon, par l'intermédiaire d'une rampe à vide. L'homogénéité du milieu a été assurée par agitation magnétique.

4-1.2. SYNTHESES DES COMPOSES ET CARACTERISTIQUES PHYSICO -CHIMIQUES

3 : Chlorométhyl diméthylsilane

4 : Chlorobutyl diméthylsilane



3



4



A une solution de 30 ml (0,30 mole) de chlorométhyl diméthylchlorosilane 1 ou de chlorobutyl diméthylchlorosilane 2 (0,30 mole) commercial, dans 150 ml d'éther anhydre, nous ajoutons 5,55g (0,15 mole) d'aluminohydru de lithium sur une période de 4 heures à 0°C. Le mélange est laissé sous agitation 1 heure à 0°C puis 12 heures à température ambiante. Nous rajoutons alors à l'aide d'une ampoule de coulée 15 ml d'HCl aqueux (1N). Le mélange est ensuite filtré sur verre fritté de porosité 3 et rincé à l'éther. Le produit est isolé par distillation du filtrat sous pression atmosphérique. Nous récupérons 16,11g (65%) du composé 3 et 24,1g (70%) du composé 4.

3

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,20 (d, 6H, J=3,2Hz (CH₃)₂) ; 2,85 (d, J=2,3Hz 2H, CH₂) ; 4,05 (m, 1H, SiH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,6 ((CH₃)₂) ; 31,1 (CH₂Cl)

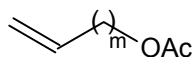
4

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,25 (d, 6H, J=3,2Hz (CH₃)₂) ; 0,6 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,5 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 3,5 (d, 2H, J=6,3Hz CH₂Cl) ; 3,9 (m, 1H, SiH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,6 ((CH₃)₂) ; 13,7 (SiCH₂) ; 21,6 (SiCH₂CH₂) ; 35,7 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl).

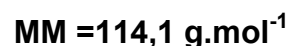
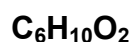
Composés de 6 à 8

Méthode générale de synthèse :



A une solution agitée d'alcool insaturé dans la pyridine et 15 ml d'éther, est ajouté goutte à goutte pendant 1h30 au reflux de l'éther le chlorure d'acétyle suivi de 15 ml d'éther. La solution est laissée au reflux 1h, filtrée sur fritté 3 et le distillat est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé désiré.

6 : Ethanoate de but-3-ényle (m = 2)



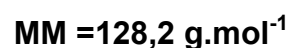
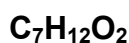
3-Butèn-1-ol (commercial) : 5,00g (69 mmoles) ;
Pyridine : 5,47g (69 mmoles) ;
Chlorure d'acétyle : 5,43g (69 mmoles).
6,75g (85%) de composé 6 sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,80 (s, 3H, CH₃C=O) ; 2,15 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 3,88 (t, 2H J= 6,9Hz, CH₂OAc) ; 4,85 (m, 2H, CH=CH₂) ; 5,53 (m, 1H, CH=CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 20,46 (CH₃C=O) ; 32,82 (CH₂CH₂OAc) ; 63,11 (CH₂OAc) ; 116,78 (CH₂=CH) ; 133,8 (CH=CH₂) ; 170,44 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1640 (C=C).

7 : Ethanoate de pent-4-ényle (m = 3)



4-Pentèn-1-ol (commercial) : 5,00g (58 mmoles) ;
Pyridine : 4,59g (58 mmoles) ;
Chlorure d'acétyle : 4,54g (58 mmoles).
6,89g (92%) de composé 7 sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,58 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,89 (s, 3H, CH₃C=O) ; 1,98 (m, 2H, =CH-CH₂) ; 3,93 (t, 2H J=6,5Hz, CH₂OAc) ; 4,85 (m, 2H, CH=CH₂) ; 5,53 (m, 1H, CH=CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 20,46 (CH₃C=O) ; 27,46 (CH₂CH₂OAc) ; 29,69 (CH₂CH=) ; 63,43 (CH₂OAc) ; 114,85 (CH₂=CH) ; 137,08 (CH=CH₂) ; 170,44 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1640 (C=C) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

8 : Ethanoate de hex-5-ényle (m = 4)

C₈H₁₄O₂

MM =142,2 g.mol⁻¹

5-Hexèn-1-ol (commercial) : 5,00g (50 mmoles) ;
Pyridine : 3,95g (50 mmoles) ;
Chlorure d'acétyle : 3,90g (50 mmoles).
6,98g (98%) de composé **8** sont recueillis.

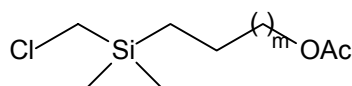
RMN 1H (CDCl₃) δ ppm : 1,26 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂OAc) ; 1,46 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,84 (s, 3H, CH₃C=O) ; 1,89 (m, 2H, =CH-CH₂) ; 3,87 (t, 2H J=6,8Hz, CH₂OAc) ; 4,80 (m, 2H, CH=CH₂) ; 5,65 (m, 1H, CH=CH₂).

RMN 13C (CDCl₃) δ ppm : 19,90 (CH₃C=O) ; 24,32 (CH₂CH₂OAc) ; 27,18 (CH₂=CH-CH₂-CH₂) ; 32,42 (CH₂=CH-CH₂) ; 63,38 (CH₂OAc) ; 113,35 (CH₂=CH) ; 137,35 (CH=CH₂) ; 170,44 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1640 (C=C) ; 842 (SiC).

Composés de 9 à 12

Méthode générale de synthèse :



A une solution d'acétate insaturé dans 10 ml de THF sont ajoutés le chlorométhyldiméthylsilane **3** ainsi que 0,15 ml d'une solution 0,1N d'H₂PtCl₆ dans l'isopropanol. La solution est chauffée à 60°C pendant 15 heures. La solution est noyée dans l'eau. Après extraction de la phase aqueuse, lavage au dichlorométhane, séchage sur MgSO₄ et récupération de la phase organique, les solvants sont évaporés sous pression réduite et le composé est isolé après distillation.

9 : Ethanoate de 3-(chlorométhyldiméthylsilanyl)propyle (m = 1)



Acétate d'allyle (**5**) : 3,68g (36 mmoles) ;
Chlorométhyldiméthylsilane (**3**) : 4,00g (36 mmoles).
5,09g (66%) de composé **9** (Eb_{0,9} = 85°C) sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,59 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,58 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,97 (s, 3H, CH₃CO) ; 2,72 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,95 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 ((CH₃)₂Si) ; 9,57 (SiCH₂) ; 20,83 (CH₃COO) ; 22,79 (SiCH₂CH₂) ; 29,85 (CH₂Cl) ; 66,60 (CH₂OAc) ; 170,9 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1252 (CH₃Si) ; 1742 (C=O) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

10 : Ethanoate de 4-(chlorométhyldiméthylsilanyl)butyle (m = 2)



Ethanoate de but-3-ényle (**6**) : 3,75g (32 mmoles) ;
Chlorométhyldiméthylsilane (**3**) : 4,00g (36 mmoles).
On recueille 5,09g (65%) de composé **10** (Eb_{0,9} = 98°C).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,61 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,35 (m, 2H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,61 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,99 (s, 3H, CH₃C=O) ; 2,73 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,01 (t, 2H J=7,4Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,18 ((CH₃)₂Si) ; 13,28 (SiCH₂) ; 19,93 (SiCH₂CH₂) ; 19,98 (CH₃C=O) ; 30,10 (CH₂Cl) ; 32,09 (CH₂CH₂OAc) ; 63,09 (CH₂OAc) ; 171,11 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1730 (C=O) ; 1256 (CH₃Si) ; 846 (Si-C).

11 : Ethanoate de 5-(chlorométhyldiméthylsilanyl)pentyle (m = 3)



Ethanoate de pent-4-ényle (**7**) : 4,50g (35 mmoles) ;
Chlorométhyldiméthylsilane(**3**) : 3,80g (35 mmoles).
6,00g (72%) de composé **11** (Eb_{0,9} = 108°C) sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,61 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,33 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂OAc) ; 1,60 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,01 (s, 3H, CH₃C=O) ; 2,74 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,02 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,65 ((CH₃)₂Si) ; 13,53 (SiCH₂) ; 20,96 (CH₃C=O) ; 23,18 (SiCH₂CH₂) ; 28,19 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 29,61 (CH₂Cl) ; 30,25 (CH₂CH₂OAc) ; 64,45 (CH₂OAc) ; 171,25 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1256 (CH₃Si) ; 846 (Si-C).

12 : Ethanoate de 6-(chlorométhyldiméthylsilanyl)hexényle (m = 4)

C₁₁H₂₃ClO₂Si

MM =250,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de hex-5-ényle (**8**) : 1,14g (8 mmoles) ;
Chlorométhyldiméthylsilane (**3**) : 0,87g (8 mmoles).
1,09g (54%) de composé **12** (Eb_{0,9} = 125°C) est recueilli.

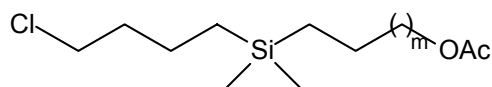
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,61 (m, 2H, SiCH₂) ;
1,30 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂OAc) ; 1,54 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,00 (s, 3H, CH₃C=O) ;
2,73 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,00 (t, 2H J=7,3Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,63 ((CH₃)₂Si) ; 13,55 (SiCH₂) ; 20,92 (CH₃C=O) ; 23,39 (SiCH₂CH₂) ; 25,51 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 28,48 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂) ;
30,33 (CH₂Cl) ; 33,0 (CH₂CH₂OAc) ; 64,56 (CH₂OAc) ; 170,5 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1738 (C=O) ; 1248 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

Composés de 13 à 16

Méthode générale de synthèse :



A une solution d'acétate insaturé dilué dans 10 ml de THF sont ajoutés le chlorobutyldiméthylsilane **4** puis 0,15 ml d'une solution 0,1N d'H₂PtCl₆ dans l'isopropanol. La solution est chauffée à 60°C pendant 15 heures. La solution est noyée dans l'eau. Après extraction de la phase aqueuse, lavage au dichlorométhane, séchage sur MgSO₄ et récupération de la phase organique, les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le composé est isolé après distillation.

13 : Ethanoate de 3-(chlorobutyldiméthylsilanyl)propyle (m = 1)



$$\text{MM} = 250,8 \text{ g.mol}^{-1}$$

Acétate d'allyle (**5**) : 2,65g (26 mmoles) ;
Chlorobutyldiméthylsilane (**4**) : 4,00g (26 mmoles).
5,14g (77%) de composé **13** sont recueillis. (Eb = 115°C)

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,55 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,38 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,56 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,7 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 1,97 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,95 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,50 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃CO) ; 21,0 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 36,1 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 67,0 (CH₂OAc) ; 171 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

14 : Ethanoate de 4-(chlorobutyldiméthylsilanyl)butyle (m = 2)



$$\text{MM} = 264,8 \text{ g.mol}^{-1}$$

Ethanoate de but-3-ényle (**6**) : 3,75g (32 mmoles) ;
Chlorométhylsilane (**4**) : 4,95g (36 mmoles).
5,09g (60%) de composé **14** sont recueillis. (Eb = 130°C)

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,52 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,3 (m, 4H, Si(CH₂CH₂)₂) ; 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,75 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 1,91 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,54 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,9 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,5 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃CO) ; 21,1 (SiCH₂CH₂) ; 25,8 (SiCH₂CH₂) ; 35,5 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 36,3 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 67,0 (CH₂OAc) ; 171 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

15 : Ethanoate de 5-(chlorobutyldiméthylsilanyl)pentyle (m = 3)



$$\text{MM} = 278,8 \text{ g.mol}^{-1}$$

Ethanoate de pent-4-ényle (**7**) : 4,50g (35 mmoles) ;
Chlorobutyldiméthylsilane (**4**) : 5,27g (35 mmoles).
4,4g (45%) de composé **15** sont recueillis. (Eb = 145°C)

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,04 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,6 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,32 (m, 6H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂) ; 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,76 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 2,02 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,49 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,95 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,4 ((CH₃)₂Si) ; 10,2 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃CO) ; 21,2 (SiCH₂CH₂) ; 25,6 (SiCH₂CH₂) ; 32,5 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 35,5 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,1 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 67,1 (CH₂OAc) ; 171 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1742 (C=O) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

16 : Ethanoate de 6-(chlorobutyldiméthylsilanyl)hexenyle (m = 4)

C₁₄H₂₉ClO₂Si

MM =292,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de hex-5-ényle (**8**) : 1,42g (10 mmoles);

Chlorobutyldiméthylsilane (**5**) : 1,5g (10 mmoles).

1,2g (41%) de composé **16** sont recueillis. (Eb = 160°C)

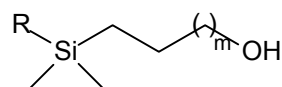
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,45 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,31 (m, 8H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂CH₂) ; 1,57 (m, 2H, CH₂CH₂OAc) ; 1,69 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 1,94 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,54 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 4,01 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,6 ((CH₃)₂Si) ; 10,0 (SiCH₂) ; 14,1 (SiCH₂) ; 20,9 (CH₃CO) ; 21,2 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 28,8 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 32,6 (Si(CH₂)₄CH₂) ; 35,3 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,3 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 67,0 (CH₂OAc) ; 171,2 (C=O).

IR cm⁻¹ : 1738 (C=O) ; 1248 (CH₃Si) ; 844 (Si-C).

Composés de 17 à 24

Méthode générale de synthèse :



m = 1, 2, 3, 4

R = CH₂Cl **17 à 20**

R = (CH₂)₄Cl **21 à 24**

A une solution d'éthanoate de (chlorométhyldiméthylsilanyl)alkyle ou d'éthanoate de (chlorobutyldiméthylsilanyl)alkyle dans 200 ml de méthanol de l'acide para toluène sulfonique (APTS) déshydraté est ajouté. La solution est agitée sous azote, à température ambiante. Après 24 heures de réaction le solvant est évaporé sous pression réduite, le produit est extrait au dichlorométhane et séché sur MgSO₄. Le solvant est de nouveau évaporé et les composés sont utilisés par la suite sans autre purification.

17 : 3-(Chlorométhyldiméthylsilanyl)propan-1-ol (m = 1, R=CH₂Cl)



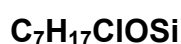
Ethanoate de 3-(chlorométhyldiméthylsilanyl)propyle (**9**) : 2,86g (13 mmoles) ;
APTS : 0,47g (2,75 mmoles).
1,96g (86%) de composé **17** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,63 (m, 2H, CH₂Si) ;
1,57 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,78 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,58 (t, 2H J= 7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,2 ((CH₃)₂Si) ; 14,1 (SiCH₂) ; 21,5
(SiCH₂CH₂) ; 29,5 (CH₂Cl) ; 60,3 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3351 (OH) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

18 : 4-(Chlorométhyldiméthylsilanyl)butan-1-ol (m = 2, R=CH₂Cl)



Ethanoate de 4-(chlorométhyldiméthylsilanyl)butyle (**10**) : 2,13g (9,6 mmoles) ;
APTS : 0,33g (1,9 mmoles).
1,24g (71%) de composé **18** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,61 (m, 2H, CH₂Si) ;
1,33 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,59 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 2,8 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,6 (t, 2H
J= 7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,1 ((CH₃)₂Si) ; 14,3 (SiCH₂) ; 21,5
(SiCH₂CH₂) ; 29,4 (CH₂Cl) ; 36,2 (CH₂CH₂OH) ; 60,2 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3341 (OH) ; 1256 (CH₃Si) ; 846 (Si-C).

19 : 5-(Chlorométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (m = 3, R=CH₂Cl)

C₈H₁₉ClOSi

MM =194,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de 5-(chlorométhylidiméthylsilanyl)pentyle (**11**) : 2,86g (13 mmoles);

APTS : 0,15g (2,7 mmoles).

1,96g (95%) de composé **19** est recueilli

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,06 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,63 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,30 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,5 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 2,77 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,58 (t, 2H J= 7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,2 ((CH₃)₂Si) ; 13,6 (SiCH₂) ; 21,6 (SiCH₂CH₂) ; 29,5 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 30,3 (CH₂Cl) ; 36,3 (CH₂CH₂OH) ; 62,6 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3346 (OH) ; 1256 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

20 : 6-(Chlorométhylidiméthylsilanyl)hexan-1-ol (m = 4, R=CH₂Cl)

C₉H₂₁ClOSi

MM =208,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de 6-(chlorométhylidiméthylsilanyl)hexyle (**12**) : 1,09g (4,4 mmoles) ;

APTS : 0,15g (8,7 mmoles).

1,00g (88%) de composé **20** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,6 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,31 (m, 6H, SiCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 1,54 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 2,8 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,6 (t, 2H J= 7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,6 ((CH₃)₂Si) ; 13,5 (SiCH₂) ; 21,5 (SiCH₂CH₂) ; 29,5 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 30,3 (CH₂Cl) ; 32,3 (CH₂CH₂CH₂OH) ; 36,2 (CH₂CH₂OH) ; 62,7 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3329 (OH) ; 1252 (CH₃Si) ; 849 (Si-C).

21 : 3-(chlorobutyldiméthylsilanyl)propan-1-ol (m = 1, R=C₄H₈Cl)

C₉H₂₁ClOSi

MM = 208,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de 3-(chlorobutyldiméthylsilanyl)propyle (**13**) : 2,5g (10 mmoles) ;

APTS : 0,3g (1,75 mmoles).

2g (97%) de composé **21** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,02 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,41 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,43 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,5 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 1,72 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,51 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,84 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,5 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 21,1 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 36,1 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 65,0 (CH₂OH)

IR cm⁻¹ : 3334 (OH) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

22 : 4-(chlorobutyldiméthylsilanyl)butan-1-ol (m = 2, R=C₄H₈Cl)

C₁₀H₂₃ClOSi

MM =222,8 g.mol⁻¹

Ethanoate de 4-(chlorobutyldiméthylsilanyl)butyle (**14**): 2,5g (9,45 mmoles) ;
APTS : 0,18g (1,05 mmoles).
2,1g (98%) de composé **22** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,61 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,4 (m, 4H, Si(CH₂CH₂)₂) ; 1,62 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,8 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,5 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 20,9 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 35,5 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,2 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 44,8 (CH₂Cl) ; 63,5 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3338 (OH) ; 1246 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

23 : 5-(chlorobutyldiméthylsilanyl)pentan-1-ol (m = 3, R=C₄H₈Cl)

C₁₁H₂₅ClOSi

MM =236,71 g.mol⁻¹

Ethanoate de 5-(chlorobutyldiméthylsilanyl)pentyle (**15**) : 1,2g (4,3 mmoles) ;
APTS : 0,15g (0,86 mmole).
1g (96%) de composé **23** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,51 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,32 (m, 6H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂) ; 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,51 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,92 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,5 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 21,1 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 32,6 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 35,8 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 35,9 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 44,3 (CH₂Cl) ; 62,2 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3334 (OH) ; 1244 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

24 : 6-(chlorobutyldiméthylsilanyl)hexan-1-ol (m = 4, R=C₄H₈Cl)

C₁₂H₂₇ClOSi

MM =250,7 g.mol⁻¹

Ethanoate de 3-(chlorobutyldiméthylsilanyl)hexenyle (**16**) : 1g (3,41 mmoles) ;

APTS : 0,12g (1,75 mmoles).

1g (97%) de composé **24** est recueilli.

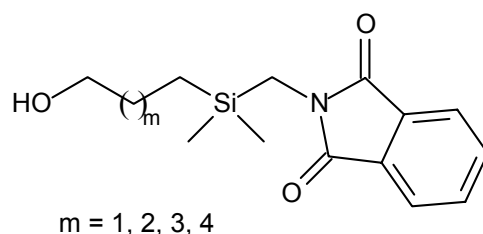
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,04 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,49 (m, 4H, (CH₂SiCH₂)) ; 1,41 (m, 8H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂CH₂) ; 1,58 (m, 2H, CH₂CH₂OH) ; 1,66 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,51 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,8 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,4 ((CH₃)₂Si) ; 10,0 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃COO) ; 21,3 (SiCH₂CH₂) ; 28,8 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,6 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 35,5 (Si(CH₂)₄CH₂) ; 36,3 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 67,5 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3325 (OH) ; 1258 (CH₃Si) ; 1239 (CH₃Si) ; 840 (Si-C).

Composés de 25 à 28

Méthode générale de synthèse :



Le mélange des alcools silylés (**17** à **20**), de phthalimide de potassium, de DMF anhydre et de quelques milligrammes d'éther couronne (18-C-6) est mis à agiter au reflux à 120°C et sous N₂ pendant 24 heures. Le mélange est alors filtré et le DMF est évaporé sous pression réduite. Le mélange résiduel est alors noyé dans l'eau et extrait au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau, isolée et séchée sur MgSO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite, puis le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un mélange d'hexane / acétate d'éthyle 60/40.

25 : 3-(Phtalimidométhylidiméthylsilanyl)propan-1-ol (m=1)



Phtalimide de potassium : 2,22g (12 mmoles) ;
3-(Chlorométhylidiméthylsilanyl)propan-1-ol (**17**) : 2g (12 mmoles).
1,26g (37%) de composé **25** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,55-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,50-1,65 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,94 (large s, 1H, OH) ; 3,16 (s, 2H, CH₂N) ; 3,56 (t, 2H J=6,5Hz, CH₂OH) ; 7,61-7,78 (m, 5H, Pht.).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,7 ((CH₃)₂Si) ; 10,37 (SiCH₂) ; 26,7 (SiCH₂CH₂) ; 28,0 (CH₂N) ; 65,3 (CH₂O) ; 122,9 (CH Pht.) ; 132,2 (Pht. Cquat.) ; 133,6 (CH Pht.) ; 168,5 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3366 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1694 (C=C) ; 1254 (CH₃Si) ;
842 (Si-C).

26 : 4-(Phtalimidométhylidiméthylsilanyl)butan-1-ol (m=2)



Phtalimide de potassium : 3g (16,2 mmoles) ;
4-(Chlorométhylidiméthylsilanyl)butan-1-ol (**18**) : 3g (16 mmoles).
3,53g (75%) de composé **26** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,57-0,65 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,34-1,65 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 3,18 (s, 2H, CH₂N) ; 3,56 (t, 2H J=6,5Hz, CH₂OH) ; 7,63-7,80 (m, 5H, Pht.).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,7 ((CH₃)₂Si) ; 14,2 (SiCH₂) ; 19,5 (SiCH₂CH₂) ; 27,9 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,2 (CH₂N) ; 62,3 (CH₂O) ; 122,8 (CH Pht.) ; 132,7 (Pht. Cquat.) ; 133,6 (CH Pht.) ; 168,5 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1750 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ;
842 (Si-C).

27 : 5-(Phtalimidométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (m=3)



Phtalimide de potassium : 2,27g (12,2 mmoles) ;
5-(Chlorométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (**19**) : 2,4g (12,2 mmoles).
2,85g (76%) de composé **27** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,57-0,65 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,29-1,37 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,52 (m, 2H, Si(CH₂)₃CH₂) ; 3,18 (s, 2H, CH₂N) ; 3,58 (t, 2H J=6,4Hz, CH₂OH) ; 7,59-7,83 (m, 5H, Pht.).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,59 ((CH₃)₂Si) ; 14,66 (SiCH₂) ; 23,27 (SiCH₂CH₂) ; 28,06 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 29,46 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 32,2 (CH₂N) ; 62,75 (CH₂O) ; 122,88 (CH Pht.) ; 132,17 (Pht. quat. C) ; 133,64 (CH Pht.) ; 168,50 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

28 : 6-(Phtalimidométhyldiméthylsilanyl)hexan-1-ol (m=4)

C₁₇H₂₅NO₃Si

MM = 319,4 g.mol⁻¹

Phtalimide de potassium : 2,4g (13 mmoles) ;
6-(Chlorométhyldiméthylsilanyl)hexan-1-ol (**20**) : 2,5g (12 mmoles).
2,94g (76%) de composé **28** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,57-0,65 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,30-1,41 (m, 6H, SiCH₂(CH₂)₃) ; 1,52 (m, 2H, Si(CH₂)₄CH₂) ; 3,14 (s, 2H, CH₂N) ; 3,57 (t, J=6,5Hz, 2H, CH₂OH) ; 7,68-7,80 (m, 4H, Pht.).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,7 (CH₃)₂Si) ; 14,4 (SiCH₂) ; 23,7 (SiCH₂CH₂) ; 27,8 (CH₂N) ; 28,6 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,4 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 33,5 (Si(CH₂)₄CH₂) ; 62,7 (CH₂O) ; 122,6 (CH Pht.) ; 132,7 (Pht. Cquat.) ; 131,6 (CH Pht.) ; 168,5 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

Des cristaux du composé **28** ont pu être isolés et étudiés par cristallographie Figure 70. Le cristal étudié nous a permis d'accéder à l'ensemble des paramètres cristallins qui sont présentés dans le Tableau 16. Ce dernier contient de même les modes d'enregistrement et de traitement des données. Les coordonnées atomiques sont détaillées dans le Tableau 17, alors que les longueurs et les angles de liaison sont regroupés dans le Tableau 18.

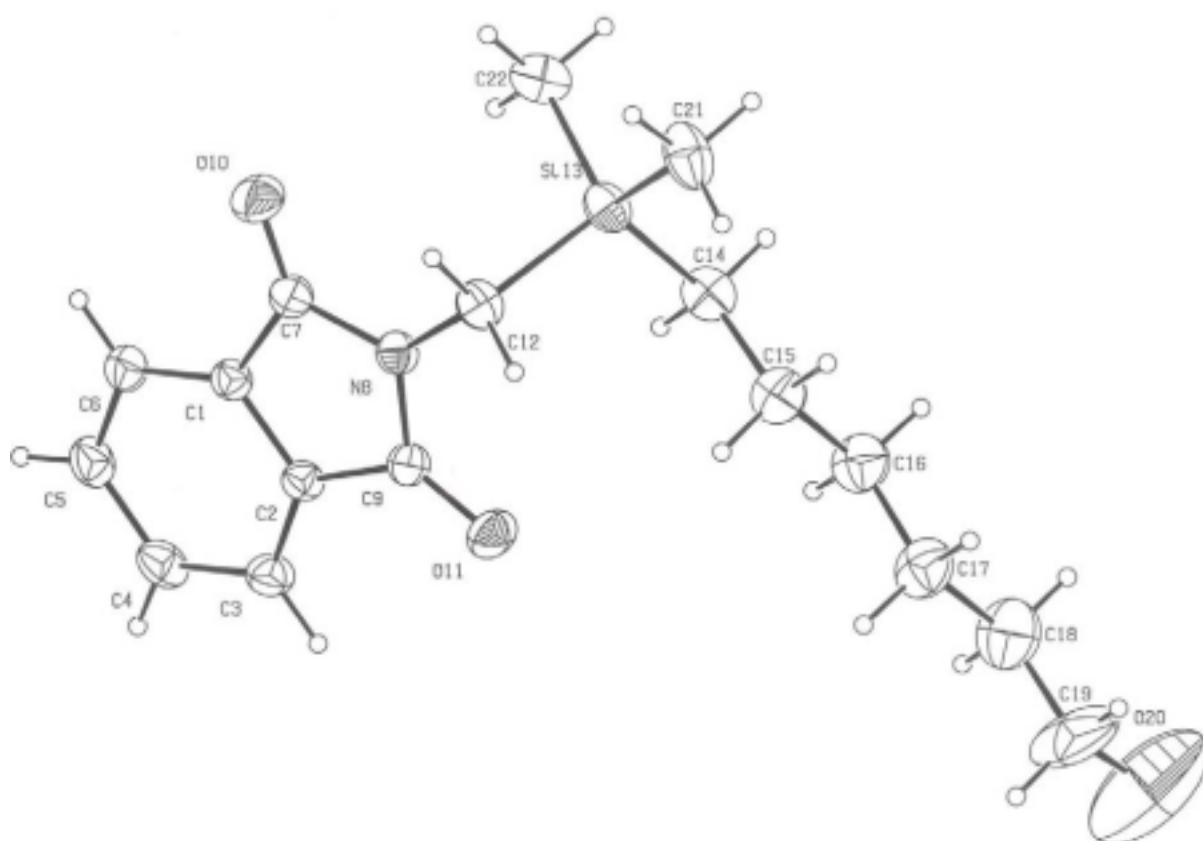


Figure 70 : Représentation cristallographique du 6-(Phtalimidométhyl diméthylsilanyl)hexan-1-ol

Code d'identification	28
Formule	$C_{17}H_{25}NO_3Si$
Masse Molaire	319.47
Température	296(2) K
Longueur Liaison	1.54178 Å
Système cristallin	triclinic, $P\bar{1}$
Paramètres de maille (Cukα)	a = 7.807 (8) Å b = 10.145 (4) Å c = 11.886 (4) Å $\alpha = 93.53^\circ$ (3) $\beta = 105.84^\circ$ (4) $\gamma = 89.77^\circ$ (5)
Volume	903.8 (10) Å ³
Densité	2, 1.174 Mg/m ³
Coefficient d'absorption	1.239 mm ⁻¹
F (000)	344
Taille du cristal	0.50 x 0.35 x 0.30 mm
θ	3.87° ; 64.91°
hkl	-9 ≤ h ≤ 8, -11 ≤ k ≤ 11, 0 ≤ l ≤ 13
Réflexions collectées / unique	3033 / 3033 [R(int) = 0.0000]
Transmission max. et min.	0.7075 ; 0.5762
Affinement	Moindres carrés
Facteur de fiabilité	R1 = 0.0657, wR2 = 0.1902 R1 = 0.0719, wR2 = 0.1980
Extinction coefficient	0.030 (4)
$\Delta\rho$ max. ; $\Delta\rho$ min.	0.504 ; -0.370 e. Å ⁻³

Tableau 15 : Données expérimentales de la structure cristalline du 6-(Phtalimidométhyl diméthylsilanyl)hexan-1-ol

	x	y	z	U(eq)
C (1)	11716 (3)	1225 (2)	1168 (2)	52 (1)
C (2)	10567 (3)	478 (2)	1578 (2)	51 (1)
C (3)	10968 (4)	-792 (3)	1898 (3)	65 (1)
O (4)	12579 (4)	-1290 (3)	1787 (3)	73 (1)
C (5)	13729 (4)	-536 (3)	1382 (3)	71 (1)
C (6)	13313 (4)	735 (3)	1068 (3)	65 (1)
C (7)	10896 (4)	2528 (3)	900 (2)	58 (1)
N (8)	9275 (3)	2496 (2)	1176 (2)	55 (1)
C (9)	8981 (3)	1288 (3)	1569 (2)	56 (1)
O (10)	11455 (3)	3460 (2)	509 (2)	87 (1)
O (11)	7646 (3)	987 (2)	1840 (2)	82 (1)
C (12)	7974 (4)	3561 (3)	960 (2)	64 (1)
Si (13)	8157 (1)	4846 (1)	2208 (1)	67 (1)
C (14)	7795 (5)	4098 (3)	3512 (3)	80 (1)
C (15)	5960 (5)	3544 (4)	3383 (3)	87 (1)
C (16)	5711 (6)	2952 (4)	4464 (3)	98 (1)
C (17)	3940 (6)	2329 (5)	4322 (3)	102 (1)
C (18)	3666 (8)	1771 (6)	5401 (4)	140 (2)
C (19)	1862 (12)	1189 (8)	5256 (6)	209 (4)
O (20)	1679 (12)	777 (17)	6217 (9)	367 (6)
C (21)	6423 (6)	6075 (4)	1627 (3)	97 (1)
C (22)	10419 (5)	5604 (4)	2584 (4)	92 (1)

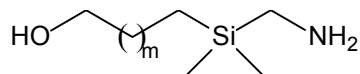
Tableau 16 : Coordonnées (en fraction de maille) et facteurs isotropes d'agitation thermique du 6-(Phtalimidométhyl diméthylsilanyl)hexan-1-ol

C (1) - C (6)	1.372 (4)
C (1) - C (2)	1.380 (4)
C (1) - C (7)	1.481 (4)
C (2) - C (3)	1.377 (4)
C (2) - C (9)	1.482 (4)
C (3) - C (4)	1.390 (4)
C (4) - C (5)	1.382 (5)
C (5) - C (6)	1.377 (4)
C (7) - C (10)	1.212 (3)
C (7) - N (8)	1.393 (4)
N (8) - C (9)	1.379 (3)
N (8) - C (12)	1.466 (3)
C (9) - O (11)	1.217 (3)
C (12) - Si (13)	1.889 (3)
Si (13) - C (14)	1.855 (3)
Si (13) - C (21)	1.857 (3)
Si (13) - C (22)	1.856 (4)
C (14) - C (15)	1.506 (5)
C (15) - C (16)	1.511 (5)
C (16) - C (17)	1.485 (6)
C (17) - C (18)	1.500 (6)
C (18) - C (19)	1.492 (8)
C (19) - O (20)	1.283 (8)
C (6) - C (1) - C (2)	121.4 (3)
C (6) - C (1) - C (7)	130.6 (2)
C (2) - C (1) - C (7)	108.0 (2)
C (3) - C (2) - C (1)	121.5 (2)
C (3) - C (2) - C (9)	130.8 (2)
C (1) - C (2) - C (9)	107.7 (2)
C (2) - C (3) - C (4)	117.0 (3)
C (5) - C (4) - C (3)	121.3 (3)
C (6) - C (5) - C (4)	121.1 (3)
C (1) - C (6) - C (5)	117.7 (3)
O(10) - C (7) - N (8)	124.7 (3)
O (10) - C (7) - C (1)	129.1 (3)
N (8) - C (7) - C (1)	106.2 (2)
C (9) - N(8) - C (7)	111.3 (2)
C (9) - N(8) - C (12)	124.5 (2)
C (7) - N (8) - C (12)	124.0 (2)
O (11) - C (9) - N (8)	124.7 (2)
O (11) - C (9) - C (2)	128.5 (3)
N (8) - C (9) - C (2)	106.7 (2)
N (8) - C (12) - Si (13)	116.17 (18)
C (14) - Si (13) - C (21)	111.52 (17)
C (14) - Si (13) - C (22)	109.70 (18)
C (21) - Si (13) - C (22)	111.1 (2)
C (14) - Si (13) - C (12)	111.18 (15)
C (21) - Si (13) - C (12)	105.18 (15)

Tableau 17 : Longueurs (σ) et angles (θ) de liaisons du 6-(Phtalimidométhyl diméthylsilanyl)hexan-1-ol

Composés de 29 à 32

Méthode générale de synthèse :



$$m = 1, 2, 3, 4$$

Au composé silylé (25 à 28) obtenu précédemment, est ajouté de l'hydrazine dans l'éthanol absolu. La solution est agitée pendant 24 heures au reflux sous azote. Après filtration de la solution et évaporation du solvant le résidu est lavé avec du dichlorométhane et de nouveau filtré sur verre fritté de porosité 3. Le produit obtenu est utilisé dans la réaction suivante sans plus de purification.

29 : 3-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)propan-1-ol (m=1)



Hydrazine : 0,8ml (25 mmoles) ;

3-(Phthalimidométhyl)diméthylsilanyl)propan-1-ol (25) : 1,72g (6,2 mmoles).

0,68g (75%) de composé 29 est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,55-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,50-1,65 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,19 (s, 2H, CH₂N) ; 2,60 (large s, 3H, OH, NH₂) ; 3,56 (t, 2H J=6,2Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,7 ((CH₃)₂Si) ; 9,5 (SiCH₂) ; 26,8 (SiCH₂CH₂) ; 30,3 (CH₂N) ; 64,7 (CH₂O).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

30 : 4-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)butan-1-ol (m=2)

C₇H₁₉NOSi

MM = 161,3 g.mol⁻¹

Hydrazine : 1,3ml (27,4 mmoles);

4-(Phthalimidométhyl)diméthylsilanyl)butan-1-ol (**26**) : 2g (6,8 mmoles).

1,05g (94%) de composé **30** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,51-0,59 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,27-1,33 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂) ; 1,43-1,53 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,16 (s, 2H, CH₂N) ; 3,12 (large s, 3H, OH, NH₂) ; 3,56 (t, 2H J=6,4 Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,9 ((CH₃)₂Si) ; 13,8 (SiCH₂) ; 23,4 (SiCH₂CH₂) ; 29,6 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,4 (CH₂NH₂) ; 61,5 (CH₂O).

IR cm⁻¹ : 3346 (OH) ; 1750 (C=O) ; 1697 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 848 (Si-C).

31 : 5-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)pentan-1-ol (m=3)

C₈H₂₁NOSi

MM = 175,3 g.mol⁻¹

Hydrazine : 1,0ml (20 mmoles) ;

5-(Phthalimidométhyl)diméthylsilanyl)pentan-1-ol (**27**) : 1,55g (5 mmoles).

0,8g (91%) de composé **31** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,57-0,65 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,29-1,37 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,52 (m, 2H, Si(CH₂)₃CH₂) ; 2,60 (large s, 3H, OH, NH₂) ; 3,15 (s, 2H, CH₂N) ; 3,58 (t, 2H J=6,4Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,6 ((CH₃)₂Si) ; 14,7 (SiCH₂) ; 23,7 (SiCH₂CH₂) ; 28,1 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 29,46 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 32,2 (CH₂N) ; 62,75 (CH₂O).

IR cm⁻¹ : 3350 (OH) ; 1750 (C=O) ; 1698 (C=C) ; 1259 (CH₃Si) ; 838 (Si-C).

32 : 6-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)hexan-1-ol (m=4)

C₉H₂₃NOSi

MM = 189,3 g.mol⁻¹

Hydrazine : 1,6ml (34 mmoles) ;

6-(Phthalimidométhyl)diméthylsilanyl)hexan-1-ol (**28**) : 2,73g (8,5 mmoles).

1,48g (91%) de composé **32** est recueilli.

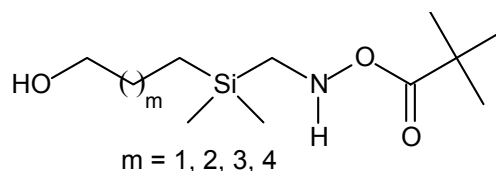
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,07 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,57-0,65 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,28-1,35 (m, 6H, SiCH₂(CH₂)₃) ; 1,45-1,52 (m, 2H, Si(CH₂)₄CH₂) ; 2,14 (s, 2H, CH₂N) ; 2,60 (large s, 3H, OH, NH₂) ; 3,54 (t, 2H J=6,5Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -3,7 ((CH₃)₂Si) ; 13,6 (SiCH₂) ; 25,3 (SiCH₂CH₂) ; 29,9 (CH₂N) ; 28,4 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,8 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 33,5 (Si(CH₂)₄CH₂) ; 62,1 (CH₂OH).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

Composés de 33 à 36

Méthode générale de synthèse :



A une solution d'un des (aminométhyl)diméthylsilanyl alcools (29 à 32) et de triéthylamine dans le dichlorométhane ou le chloroforme, nous ajoutons du (BOC)₂O sous atmosphère inerte. Après 24 heures d'agitation à température ambiante la solution est lavée avec une solution aqueuse acide (NaHSO₄, 3x30 ml, pH=3), puis à l'eau distillée. La phase organique est alors isolée et séchée sur MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 95/5.

33 : 3-(tertobutylamidométhyl)diméthylsilanyl)propan-1-ol (m=1)

C₁₁H₂₅NO₃Si

MM = 247,4 g.mol⁻¹

(BOC)₂O : 0,87g (4 mmoles) ;
Triéthylamine : 0,4g (4 mmoles) ;
3-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)propan-1-ol (29) : 0,6g (4 mmoles).
0,5g (50%) de composé 33 est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,53-0,61 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,52-1,63 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,60 (s, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,56 (t, 2H J=6,2Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 9,6 (SiCH₂) ; 26,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 30,30 (CH₂N) ; 65,2 (CH₂O) ; 79,1 (C(CH₃)₃) ; 156,9 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3344 (OH) ; 1760 (C=O) ; 1685 (C=C) ; 1245 (CH₃Si) ; 839 (Si-C).

34 : 4-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)butan-1-ol (m=2)

C₁₂H₂₇NO₃Si

MM = 261,4 g.mol⁻¹

(BOC)₂O : 1,35g (6,2 mmoles) ;
Triéthylamine : 0,62g (6,2 mmoles) ;
4-(Aminométhylidiméthylsilanyl)butan-1-ol (**30**) : 1g (6,2 mmoles).
0,74g (45%) de composé **34** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,53-0,61 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,46-1,63 (m, 4H, SiCH₂(CH₂)₂) ; 2,60 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,56 (t, 2H J=6,2Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 9,6 (SiCH₂) ; 26,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 29,2 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,30 (CH₂N) ; 62,2 (CH₂O) ; 79,1 (C(CH₃)₃) ; 158,9 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3365 (OH) ; 1754 (C=O) ; 1683 (C=C) ; 1244 (CH₃Si) ; 848 (Si-C).

35 : 5-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (m=3)

C₁₃H₂₉NO₃Si

MM = 275,4 g.mol⁻¹

(BOC)₂O : 1g (4,6 mmoles) ;
Triéthylamine : 0,46g (4,6 mmoles) ;
5-(Aminométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (**31**) : 0,8g (4,6 mmoles).
0,9g (75%) de composé **35** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,54-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,29-1,38 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,46-1,65 (m, 2H, Si(CH₂)₃CH₂) ; 2,66 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,63 (t, 2H J=6,2Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 9,6 (SiCH₂) ; 26,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 29,2 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,3 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 36,3 (CH₂N) ; 62,7 (CH₂O) ; 79,1 (C(CH₃)₃) ; 157,7 (C=O).

IR cm⁻¹ : 3350 (OH) ; 1750 (C=O) ; 1697 (C=C) ; 1258 (CH₃Si) ; 841 (Si-C).

36 : 6-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)hexan-1-ol (m=4)

C₁₄H₃₁NO₃Si

MM = 289,4 g.mol⁻¹

(BOC)₂O : 3,9g (18 mmoles) ;
Triéthylamine : 1,82g (18 mmoles) ;
6-(Aminométhyl)diméthylsilanyl)hexan-1-ol (**32**) : 3,5g (18 mmoles).
4,16g (79%) de composé **36** sont récupérés.

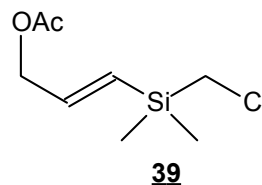
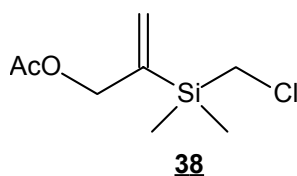
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,53-0,61 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,27-1,37 (m, 6H, SiCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,46-1,61 (m, 2H, Si(CH₂)₄CH₂) ; 2,58 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,6 (t, 2H J=6,2Hz, CH₂OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 9,6 (SiCH₂) ; 26,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 29,2 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,5 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 33,1 (Si(CH₂)₄CH₂) ; 36,3 (CH₂N) ; 62,7 (CH₂O) ; 78,9 (C(CH₃)₃) ; 159,7 (C=O).

IR cm⁻¹ : 335_ (OH) ; 1756 (C=O) ; 1694 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ;
842 (Si-C).

38 : Acétate de 2-(chlorométhyl)diméthylsilyl) prop-2-ène

39 : (E) Acétate de 3-(chlorométhyl)diméthylsilyl) prop-2-ène



C₈H₁₅ClO₂Si

MM = 206.7 g.mol⁻¹

A une solution de 5g (0,05 mole) d'acétate de propargyle dans 10 ml de THF et 0,25 ml de H₂PtCl₆, ajoutés 5,75g (0,05 mole) du composé **3**. La solution est chauffée à 60°C pendant 15 heures. La solution est noyée dans l'eau puis extraite au dichlorométhane, la phase organique est récupérée, séchée et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le brut de réaction est distillé à 0,9 mmHg. Les composés **38** et **39** distillent à 65°C. 7,09g (70%) du mélange des composés **38** et **39** sont récupérés.

38

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,25 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,07 (s, 3H, CH₃) ;
2,85 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,7 (s, 2H, CH₂OAc) ; 5,46 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,85 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 ((CH₃)₂Si) ; 20,83 (CH₃CO) ; 29,5 (CH₂Cl) ; 66,30 (CH₂OAc) ; 125,5 (CH₂=) ; 148,1 (CH₂=C) ; 170,9 (C=O).

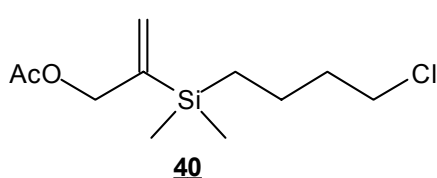
39

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,20 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,08 (s, 3H, CH₃) ; 2,79 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,6 (d, 2H J=4,6Hz, CH₂OAc) ; 6,12 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,22 (dt, 1H J=19,1Hz et J=4,6Hz, =CH-CH₂).

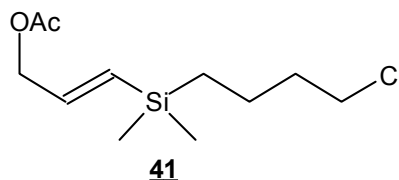
RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 ((CH₃)₂Si) ; 20,83 (CH₃CO) ; 30,2 (CH₂Cl) ; 65 (CH₂OAc) ; 124,5 (=CHCH₂) ; 147,6 (=CHSi) ; 171,3 (C=O).

40 : Acétate de 2-(chlorobutyldiméthylsilyl) prop-2-ène

41 : (E) Acétate de 3-(chlorobutyldiméthylsilyl) prop-2-ène



C₁₁H₂₁ClO₂Si



MM = 248,8 g mol⁻¹

A une solution de 4,45g (0,046 mole) d'acétate de propargyle dans 10 ml de THF et 0,3 ml de H₂PtCl₆, est ajouté 7g (0,046 mole) du composé **4**. La solution est chauffée à 60°C pendant 15 heures. La solution est noyée dans l'eau, la phase organique est alors extraite au dichlorométhane et séchée sur MgSO₄. Les solvants sont évaporés sous

pression réduite et le brut de réaction est distillé à 0,9 mmHg. Les composés **40** et **41** distillent à 115°C. 10,4g (90%) du mélange des composés **40** et **41** sont récupérés.

40

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,5 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,38 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 2,07 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,95 (t, 2H J=7,5Hz, CH₂OAc) ; 5,49 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,9 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃CO) ; 21,0 (SiCH₂CH₂) ; 35,5 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 66,3 (CH₂OAc) ; 125,5 (CH₂=) ; 148,1 (CH₂=C) ; 170,9 (C=O).

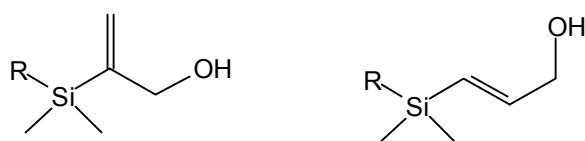
41

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,52 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,4 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,72 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 2,14 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,55 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 4,69 (d, 2H J=4,6Hz, CH₂OAc) ; 6,1 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,2 (dt, 1H J=19,1Hz et J=4,6Hz, =CH-CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,8 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃CO) ; 21,0 (SiCH₂CH₂) ; 35,7 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 65 (CH₂OAc) ; 124,5 (=CHCH₂) ; 147,6 (=CHSi) ; 171,3 (C=O).

Composés **42** à **45**

Méthode générale de synthèse :



R = CH₂Cl **42** et **43**

R = (CH₂)₄Cl **44** et **45**

A une solution d'éthanoate de (chlorométhyldiméthylsilanyl)alkényle ou d'éthanoate de (chlorobutyldiméthylsilanyl)alkényle dans 200 ml de méthanol, de l'APTS déshydraté est ajouté. La solution est agitée sous azote, à température ambiante. Après 24 heures de réaction le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu est noyé dans l'eau extrait puis lavé au dichlorométhane. La phase organique est alors séchée (MgSO₄) et le produit est récupéré ; les composés sont utilisés par la suite sans autre purification.

42 : 2-(Chlorométhylidiméthylsilyl) prop-2-ène-1-ol (R=CH₂Cl)

C₆H₁₃ClOSi

MM = 164.7 g mol⁻¹

Acétate de 2-(chlorométhylidiméthylsilyl) prop-2-ène (**38**) : 10,7g (55 mmoles) ;
APTS : 1g (6 mmoles).
8g (90%) de composé **42** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,20 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,82 (s, 2H, CH₂Cl) ;
4,21 (s, 2H; CH₂OH) ; 5,48 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,82 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,92 ((CH₃)₂Si) ; 29,54 (CH₂Cl) ; 66,30
(CH₂OH) ; 125,53 (CH₂=) ; 148,09 (C=CH₂).

43 : (E) 3-(Chlorométhylidiméthylsilyl) prop-2-ène-1-ol (R=CH₂Cl)

C₆H₁₃ClOSi

MM = 164,7 g mol⁻¹

(E) Acétate de 3-(chlorométhylidiméthylsilyl) prop-2-ène (**39**) 8g (39 mmoles) ;
APTS : 0,75g (4,3 mmoles).
5,75g (90%) de composé **43** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,20 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,80 (s, 2H, CH₂Cl) ;
4,20 (d, 2H J=4,6Hz, CH₂OH) ; 5,95 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,24 (dt, 1H J=19,1Hz et
J=4,6Hz, =CH-CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,96 ((CH₃)₂Si) ; 30,26 (CH₂Cl) ; 64,95
(CH₂OH) ; 124,46 (=CH-CH₂) ; 147,67 (=CH-Si).

44 : 2-(Chlorobutylidiméthylsilyl) prop-2-ène-1-ol (R=C₄H₈Cl)

C₉H₁₉ClOSi

MM = 206,7 g mol⁻¹

Acétate de 2-(chlorobutylidiméthylsilyl) prop-2-ène (**40**) 10,7g (55 mmoles) ;
APTS : 1g (6 mmoles).
8g (90%) de composé **44** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,5 (m, 2H, CH₂Si) ;
1,38 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 4,21 (s,
2H, CH₂OH) ; 5,52 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,89 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 21,0
(SiCH₂CH₂) ; 35,5 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 62,30 (CH₂OH) ; 125,5 (CH₂=) ; 148,1
(CH₂=C).

45 : (E) 3-(Chlorobutyldiméthylsilyl) prop-2-ène-1-ol (R=C₄H₈Cl)

C₉H₁₉ClOSi

MM = 206,7 g mol⁻¹

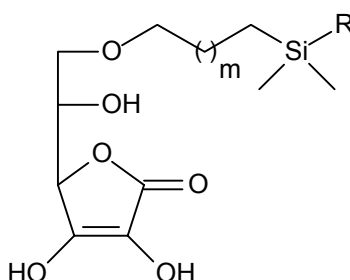
(E) Acétate de 3-(chlorobutyldiméthylsilyl) prop-2-ène (**41**) : 8g (39 mmoles) ;
APTS : 0,75g (4,3 mmoles).
5,75g (90%) de composé **45** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm : 0,05 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,5 (m, 2H, CH₂Si) ;
1,38 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 4.6 (d,
2H J=4,6Hz, CH₂OH) ; 5,99 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,21 (dt, 1H J=19,1Hz et
J=4,6Hz, =CH-CH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,80 (CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 21,0
(SiCH₂CH₂) ; 35,5 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 61,8 (CH₂OH) ; 124,5 (=CHCH₂) ; 147,6
(=CHSi).

Composés de 46 à 53

Méthode générale de synthèse :



L'acide L-ascorbique est introduit dans un réacteur à double enveloppe avec la triphenylphosphine (PPh₃) et le tétrahydrofur anhydre. Après avoir amené la solution à -10°C à l'aide d'un système externe de refroidissement avec régulateur thermique, l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) est ajouté goutte à goutte. Puis nous additionnons le silyl-alcool (**22** à **33**). La solution est agitée à température ambiante

pendant 48 heures. Après avoir filtré la solution sur un fritté 3, le tétrahydrofurane est évaporé sous pression réduite et le résidu correspondant à l'alcool utilisé est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/hexane (80/20).

46 : Ether 6-(3-(chlorométhyl)diméthylsilanyl)propyle) de l'acide ascorbique (m=1, R=CH₂Cl)



$$\text{MM} = 324,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 2,10g (12 mmoles) ;
DEAD : 2,09g (12 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3,14g (12 mmoles) ;
3-(Chlorométhyl)diméthylsilanylpropan-1-ol (**17**) : 1,60g (9,6 mmoles).
0,60g (20%) de composé **46** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,1 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,66 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,74 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,78 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,78 (m, 2H, OCH₂) ; 3,95 (m, 1H, H₅) ; 4,45 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 9,11 (SiCH₂) ; 23,9 (SiCH₂CH₂) ; 29,9 (CH₂Cl) ; 63,4 (CH₂O) ; 70,0 (C₅) ; 74,4 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,2 (C₂) ; 151,2 (C₃) ; 172,0 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ; 842 (Si-C).

47: Ether 6-(4-(chlorométhyl)diméthylsilanyl)butyle) de l'acide ascorbique (m=2, R=CH₂Cl)



$$\text{MM} = 338,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 2,28g (13 mmoles) ;
DEAD : 1,51g (13 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 2,26g (13 mmoles) ;
4-(Chlorométhyl)diméthylsilanylbutan-1-ol (**18**) : 1,25g (6,9 mmoles).
0,75g (30%) de composé **47** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,64 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,42 (m, 2H, OCH₂CH₂) ; 1,73 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,75 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,77 (m, 2H, OCH₂) ; 3,95 (m, 1H, H₅) ; 4,48 (m, 2H, H₆) ; 4,68 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,6 ((CH₃)₂Si) ; 13,3 (SiCH₂) ; 19,6 (SiCH₂CH₂) ; 30,2 (CH₂Cl) ; 35,9 (OCH₂CH₂) ; 63,4 (OCH₂) ; 70,0 (C₅) ; 71,7 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,8 (C₂) ; 141,2 (C₃) ; 171,3 (C₁).

IR cm^{-1} : 3360(OH) ; 1756 (C=O) ; 1693 (C=C) ; 1249 (CH_3Si) ; 839 (Si-C).

48 : Ether 6-(5-(chlorométhyl)diméthylsilanyl)pentyle) de l'acide ascorbique
($m=3$, $\text{R}=\text{CH}_2\text{Cl}$)

$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{ClO}_6\text{Si}$

$\text{MM}=352,9 \text{ g.mol}^{-1}$

Acide L-ascorbique : 1,70g (9,6 mmoles) ;
DEAD : 1,68g (9,6 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 2,52g (9,6 mmoles) ;
5-(Chlorométhyl)diméthylsilanyl)pentan-1-ol (**19**) : 1,50g (7,8 mmoles).
0,70g (28%) de composé **48** est recueilli.

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 0,09 (s, 6H, (CH_3)₂Si) ; 0,62 (m, 2H, SiCH₂) ;
1,34 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,69 (m, 2H, CH₂CH₂O) ; 2,75 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,73 (m,
2H, OCH₂) ; 3,99 (m, 1H, H₅) ; 4,44 (m, 2H, H₆) ; 4,62 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm : -4,6 ((CH_3)₂Si) ; 13,6 (SiCH₂) ; 23,5
(SiCH₂CH₂) ; 25,1 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 29,2 (CH₂Cl) ; 30,3 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 63,4 (CH₂O) ;
70,0 (C₅) ; 72,2 (C₆) ; 76,3 (C₄) ; 118,7 (C₂) ; 147,9 (C₃) ; 172,6 (C₁).

IR cm^{-1} : 3351 (OH) ; 1746 (C=O) ; 1694 (C=C) ; 1251 (CH_3Si) ; 837 (Si-C).

49 : Ether 6-(6-(chlorométhyl)diméthylsilanyl)hexyle) de l'acide ascorbique
($m=4$, $\text{R}=\text{CH}_2\text{Cl}$)

$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{ClO}_6\text{Si}$

$\text{MM}=366,9 \text{ g.mol}^{-1}$

Acide L-ascorbique : 0,84g (4,8 mmoles) ;
DEAD : 0,82g (4,8 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,25g (4,8 mmoles) ;
6-(Chlorométhyl)diméthylsilanyl)hexan-1-ol (**20**) : 0,80g (3,8 mmoles).
0,70g (28%) du composé **49** est recueilli.

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 0,08 (s, 6H, (CH_3)₂Si) ; 0,63 (m, 2H, SiCH₂) ;
1,34 (m, 6H, SiCH₂CH₂CH₂CH₂) ; 1,69 (m, 2H, OCH₂CH₂) ; 2,75 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,77
(m, 2H, OCH₂CH₂) ; 3,94 (m, 1H, H₅) ; 4,44 (m, 2H, H₆) ; 4,63 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm : -4,6 ((CH_3)₂Si) ; 13,5 (SiCH₂) ; 23,3
(SiCH₂CH₂) ; 25,1 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 29,5 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 30,3 (CH₂Cl) ; 33,03 (OCH₂CH₂)
; 63,4 (OCH₂) ; 70,6 (C₅) ; 72,1 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,81 (C₂) ; 150,9 (C₃) ; 170,0 (C₁).

IR cm^{-1} : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1256 (CH_3Si) ; 848 (Si-C).

50 : Ether 6-(3-(chlorobutyldiméthylsilanyl)propyle) de l'acide ascorbique
(m=1, R=C₄H₈Cl)

C₁₅H₂₇ClO₆Si

MM = 366,9 g.mol⁻¹

Acide L-ascorbique : 0,63g (3,57 mmoles) ;
DEAD : 1,04g (6 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3,14g (6 mmoles) ;
3-(Chlorobutyldiméthylsilanyl)propan-1-ol (**21**) : 1,60g (2,41 mmoles).
0,27g (30%) de composé **50** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,1 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,66 (m, 4H, CH₂SiCH₂) ; 1,38 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,56 (m, 2H, CH₂CH₂O) ; 1,70 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,5 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,78 (m, 2H, OCH₂) ; 3,95 (m, 1H, H₅) ; 4,45 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 9,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 23,8 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 36,1 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 63,4 (CH₂O) ; 70,4 (C₅) ; 74,4 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,2 (C₂) ; 151,2 (C₃) ; 172,2 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3362 (OH) ; 1752 (C=O) ; 1694 (C=C) ; 1252 (CH₃Si) ;
842 (Si-C).

51: Ether 6-(4-(chlorobutyldiméthylsilanyl)butyle) de l'acide ascorbique
(m=2, R=C₄H₈Cl)

C₁₆H₂₉ClO₆Si

MM = 380,8 g.mol⁻¹

Acide L-ascorbique : 0,95g (5,3 mmoles) ;
DEAD : 0,92g (5,3 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,4g (5,3 mmoles) ;
3-(Chlorobutyldiméthylsilanyl)butan-1-ol (**22**) : 1g (4,2 mmoles).
0,35g (20%) de composé **51** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,12 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,69 (m, 4H, CH₂SiCH₂) ; 1,4 (m, 4H, Si(CH₂CH₂)₂) ; 1,62 (m, 2H, CH₂CH₂O) ; 1,72 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ; 3,52 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,8 (m, 2H, OCH₂) ; 3,91 (m, 1H, H₅) ; 4,49 (m, 2H, H₆) ; 4,66 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 (CH₃)₂Si) ; 9,2 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ; 23,9 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 35,5 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 36,1 (CH₂CH₂Cl) ; 44,7 (CH₂Cl) ; 63,5 (CH₂O) ; 70,4 (C₅) ; 74,4 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,2 (C₂) ; 151,20 (C₃) ; 172,2 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3359 (OH) ; 1750 (C=O) ; 1691 (C=C) ; 1248 (CH₃Si) ;
846(Si-C).

52 : Ether 6-(5-(chlorobutyldiméthylsilanyl)pentyle) de l'acide ascorbique
(m=3, R=C₄H₈Cl)

C₁₇H₃₁ClO₆Si

MM=394,83 g.mol⁻¹

Acide L-ascorbique : 0,92g (5,25 mmoles) ;
DEAD : 0,9g (5,25 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,3g (5,25 mmoles) ;
3-(Chlorobutyldiméthylsilanyl)pentan-1-ol (**23**) : 1g (4,2 mmoles).
0,4g (25%) de composé **52** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,08 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,7 (m, 4H, CH₂SiCH₂) ;
1,36 (m, 6H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂) ; 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂O) ; 1,69 (m, 2H, CH₂CH₂Cl) ;
3,46 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,81 (m, 2H, OCH₂) ; 4,05 (m, 1H, H₅) ; 4,41 (m, 2H, H₆) ;
4,61 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 9,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ;
23,8 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 32,4 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 35,5 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,1
(CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 63,4 (CH₂O) ; 70,4 (C₅) ; 74,4 (C₆) ; 76,6 (C₄) ; 118,2 (C₂) ;
151,2 (C₃) ; 172,4 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1688 (C=C) ; 1247 (CH₃Si) ;
842 (Si-C).

53 : Ether 6-(6-(chlorobutyldiméthylsilanyl)hexyle) de l'acide ascorbique
(m=4, R=C₄H₈Cl)

C₁₈H₃₃ClO₆Si

M = 408,83 g.mol⁻¹

Acide L-ascorbique : 0,9g (5 mmoles) ;
DEAD : 0,87g (5 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,3g (5 mmoles) ;
3-(Chlorobutyldiméthylsilanyl)hexan-1-ol (**24**) : 1g (4 mmoles).
0,32g (20%) de composé **53** est recueilli.

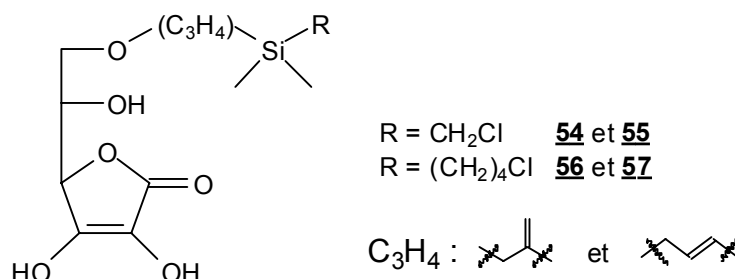
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,12 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,71 (m, 4H,
CH₂SiCH₂) ; 1,41 (m, 8H, Si(CH₂CH₂)₂CH₂CH₂) ; 1,62 (m, 2H, CH₂CH₂O) ; 1,70 (m, 2H,
CH₂CH₂Cl) ; 3,52 (t, 2H J=6,3Hz, CH₂Cl) ; 3,76 (m, 2H, OCH₂) ; 3,96 (m, 1H, H₅) ; 4,42
(m, 2H, H₆) ; 4,68 (d, 1H J=2Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 (CH₃)₂Si) ; 9,1 (SiCH₂) ; 14,2 (SiCH₂) ;
23,85 (SiCH₂CH₂) ; 25,5 (SiCH₂CH₂) ; 28,8 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 32,4 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 35,5
(Si(CH₂)₄CH₂) ; 36,1 (CH₂CH₂Cl) ; 44,6 (CH₂Cl) ; 63,51 (CH₂O) ; 70,1 (C₅) ; 74,2 (C₆) ;
76,3 (C₄) ; 118,2 (C₂) ; 151,3 (C₃) ; 172,4 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3362 (OH) ; 1751 (C=O) ; 1686 (C=C) ; 1248 (CH₃Si) ;
846 (Si-C).

Composés 54 à 57

Méthode générale de synthèse :



L'acide L-ascorbique est introduit dans un réacteur avec la triphénylphosphine (PPh₃) et le tétrahydrofurane sec. Après avoir amené la solution à -10°C à l'aide d'un système externe de refroidissement avec régulateur thermique, l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) est ajouté goutte à goutte. Puis nous ajoutons le silyl-alcool (**42** à **45**). La solution est agitée à cette température pendant 48 heures. Après avoir filtré la solution sur un verre fritté de porosité 3, le tétrahydrofurane est évaporé sous pression réduite et le résidu correspondant à l'alcool utilisé est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/hexane (80/20).

54 : Ether 6-(2-(chlorométhyl)diméthylsilyl) prop-2-ène de l'acide ascorbique



Acide L-ascorbique : 1,60g (6,1 mmoles);
DEAD : 1,55g (9,1 mmoles);
Triphénylphosphine : 2,35g (9,1 mmoles);
2-(chlorométhyl)diméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**42**) : 1g (6,1 mmoles).
0,50g (26%) de composé **54** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,22 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,83 (s, 2H, CH₂Cl) ; 3,72 (m, 2H, H₆) ; 3,93 (m, 1H, H₅) ; 4,67 (s, 1H, H₄) ; 5,09 (m, 2H, CH₂C=CH₂) ; 5,59 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,96 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) .

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,82 ((CH₃)₂Si) ; 29,70 (SiCH₂) ; 63,20 (OCH₂C=CH₂) ; 69,90 (C₅) ; 74,90 (C₆) ; 76,45 (C₄) ; 119,45 (C₂) ; 128,50 (C=CH₂) ; 143 (C=C₃) ; 150,20 (C₃) ; 172,05 (C₁).

55 : Ether 6-((E) 3-(chlorométhyl)diméthylsilyl) prop-2-ènyle) de l'acide ascorbique



$$M = 322,9 \text{ g.mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 2g (11,3 mmoles) ;
DEAD : 2g (11,35 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3g (11,35 mmoles) ;
(E) 3-(chlorométhyl)diméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**43**) : 1,5g (9,1 mmoles).
0,80g (27%) de composé **55** est récupéré.

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 0,26 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 2,8 (s, 2H, CH_2Cl) ; 3,77 (m, 2H, H_6) ; 3,91 (m, 1H, H_5) ; 4,6 (s, 1H, H_4) ; 5,1 (d, 2H $J=4,6\text{Hz}$, CH_2O) ; 6,04 (d, 1H $J=19,1\text{Hz}$, $=\text{CHSi}$) ; 6,18 (dt, 1H $J=19,1\text{Hz}$ et $J=4,6\text{Hz}$, $=\text{CH-CH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm : -4,8 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 29,7 (SiCH_2) ; 63,2 ($\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}_2$) ; 69,9 (C_5) ; 74,9 (C_6) ; 76,4 (C_4) ; 119,4 (C_2) ; 124,4 ($=\text{CH-CH}_2$) ; 147,6 ($=\text{CH-Si}$) ; 150,2 (C_3) ; 172,0 (C_1).

IR cm^{-1} : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH_3Si) ; 842 (Si-C).

56 : Ether 6-(2-(chlorobutyl)diméthylsilyl) prop-2-ènyle) de l'acide ascorbique



$$MM = 364,9 \text{ g.mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 2,2g (12 mmoles) ;
DEAD : 2,1g (12 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3,15g (12 mmoles) ;
2-(chlorobutyl)diméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**44**) : 2g (9,7 mmoles).
0,80g (22%) de composé **56** est recueilli.

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 0,2 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 0,71 (m, 2H, SiCH_2) ; 1,4 (m, 2H, SiCH_2CH_2) ; 1,71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,54 (t, 2H $J=6,3\text{Hz}$, CH_2Cl) ; 3,79 (m, 2H, H_6) ; 3,81 (m, 2H, OCH_2) ; 3,98 (m, 1H, H_5) ; 4,61 (s, 1H, H_4) ; 5,49 (d, 1H $J^{\text{gem}}=1,2\text{Hz}$, $\text{CH}_2=$) ; 5,92 (d, 1H $J^{\text{gem}}=1,2\text{Hz}$, $\text{CH}_2=$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm : -4,8 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 9,1 (SiCH_2) ; 23,8 (SiCH_2CH_2) ; 36,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 44,6 (CH_2Cl) ; 63,2 ($\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}_2$) ; 69,9 (C_5) ; 74,9 (C_6) ; 76,45 (C_4) ; 119,4 (C_2) ; 128,5 ($\text{C}=\text{CH}_2$) ; 143 ($\text{C}=\text{CH}_2$) ; 150,2 (C_3) ; 172,5 (C_1).

IR cm^{-1} : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH_3Si) ; 842 (Si-C).

57 : Ether 6-((E) 3-(chlorobutyldiméthylsilyl) prop-2-ènyle) de l'acide ascorbique



Acide L-ascorbique : 2g (11,3 mmoles) ;
DEAD : 2g (11,35 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3g (11,35 mmoles) ;
(E) 3-(chlorobutyldiméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**45**) : 1,5g (9,1 mmoles).
0,80g (23%) de composé **57** est recueilli.

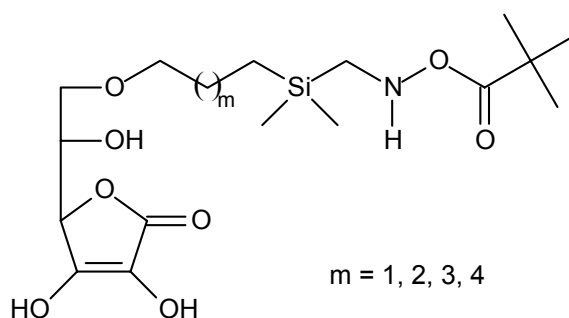
RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 0,2 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 0,72 (m, 2H, SiCH_2) ; 1,38 (m, 2H, SiCH_2CH_2) ; 1,74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,5 (t, 2H $J=6,3\text{Hz}$, CH_2Cl) ; 3,81 (m, 2H, H_6) ; 3,86 (m, 2H, OCH_2) ; 4,09 (m, 1H, H_5) ; 4,62 (s, 1H, H_4) ; 5,89 (d, 1H $J=19,1\text{Hz}$, $=\text{CHSi}$) ; 6,19 (dt, 1H $J=19,1\text{Hz}$ et $J=4,6\text{Hz}$, $=\text{CH-CH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm : -4,82 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$) ; 9,11 (SiCH_2) ; 23,85 (SiCH_2CH_2) ; 36,1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 44,6 (CH_2Cl) ; 63,20 (OCH_2) ; 69,90 (C_5) ; 74,90 (C_6) ; 76,45 (C_4) ; 119,45 (C_2) ; 124,46 ($=\text{CH-CH}_2$) ; 147,67 ($=\text{CH-Si}$) ; 150,20 (C_3) ; 172,05 (C_1).

IR cm^{-1} : 3356 (OH) ; 1756 (C=O) ; 1690 (C=C) ; 1252 (CH_3Si) ; 842 (Si-C).

Composés de 58 à 61

Méthode générale de synthèse :



A une solution de triphénylphosphine dans du THF anhydre à -15°C , le DEAD est ajouté goutte à goutte sur une période de 15 min, puis l'acide ascorbique et pour finir,

une solution d'un des alcools de tertibutylamidométhylidiméthylsilyle (**33** à **36**). Le mélange est agité à cette température pendant 24 heures. La solution de couleur brune est filtrée sur verre fritté de porosité 3 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 97/3.

58 : Ether 6-(3-(tertibutylamidométhylidiméthylsilyl)propyl) de l'acide ascorbique (m=1)



$$\text{MM} = 405,5 \text{ g.mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 0,44g (2,5 mmoles) ;
 DEAD : 0,43g (2,5 mmoles) ;
 Triphénylphosphine : 0,65g (2,5 mmoles) ;
 3-(tertibutylamidométhylidiméthylsilyl)propan-1-ol (**33**) : 0,5g (2 mmoles).
 0,23g (28%) de composé **58** est récupéré.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,02 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,53-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,52-1,63 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,60 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,7 (m, 2H, OCH₂) ; 3,9 (m, 1H, H₅) ; 4,4 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=1,3Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 9,6 (SiCH₂) ; 27,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 36,30 (CH₂N) ; 62,7 (CH₂O) ; 70,14 (C₅) ; 74,24 (C₆) ; 76,36 (C₄) ; 78,9 (C(CH₃)₃) ; 118,20 (C₂) ; 151,20 (C₃) ; 160,2 (C=O) ; 172 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3352 (NH, OH) ; 1756 (C=O) ; 1684 (C=C) ; 1256 (Si-C def.) ; 1164 (COO) ; 844 (Si-C stretch.).

59 : Ether 6-(4-(tertibutylamidométhylidiméthylsilyl)butyl) de l'acide ascorbique (m=2)



$$\text{MM} = 419,5 \text{ g.mol}^{-1}$$

Acide L-ascorbique : 0,8g (4,5 mmoles) ;
 DEAD : 0,78g (4,5 mmoles) ;
 Triphénylphosphine : 1,2g (4,5 mmoles) ;
 4-(tertibutylamidométhylidiméthylsilyl)butan-1-ol (**34**) : 0,95g (3,6 mmoles).
 0,62g (41%) de composé **59** est récupéré.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,03 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,55-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,42-1,49 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,52-1,63 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂) ; 2,60 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,7 (m, 2H, OCH₂) ; 3,9 (m, 1H, H₅) ; 4,4 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=1,3Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,4 ((CH₃)₂Si) ; 11,6 (SiCH₂) ; 22,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 29,2 (Si(CH₂)₂CH₂) ; 36,30 (CH₂N) ; 63,7 (CH₂O) ; 70,1 (C₅) ; 74,24 (C₆) ; 76,36 (C₄) ; 79,9 (C(CH₃)₃) ; 118,20 (C₂) ; 151,20 (C₃) ; 159,2 (C=O) ; 172 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3343 (NH, OH) ; 1735 (C=O) ; 1678 (C=C) ; 1249 (Si-C def.) ; 1159 (COO) ; 846 (Si-C strech.).

60 : Ether 6-(5-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)pentyl) de l'acide ascorbique (m=3)

C₁₉H₃₄NO₈Si

MM = 433,5 g.mol⁻¹

Acide L-ascorbique : 0,74g (4,2 mmoles) ;
DEAD : 0,73g (4,2 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,1g (4,2 mmoles) ;
5-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)pentan-1-ol (**35**) : 0,9g (3,4 mmoles).
0,9g (42%) de composé **60** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,01 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,55-0,63 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,28-1,37 (m, 4H, SiCH₂CH₂CH₂) ; 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,42-1,49 (m, 2H, Si(CH₂)₃CH₂) ; 2,60 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,7 (m, 2H, OCH₂) ; 3,9 (m, 1H, H₅) ; 4,4 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=1,3Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((CH₃)₂Si) ; 11,6 (SiCH₂) ; 22,1 (SiCH₂CH₂) ; 28,4 (C(CH₃)₃) ; 29,2 (SiCH₂CH₂CH₂) ; 36,5 (CH₂N) ; 32,9 (Si(CH₂)₃CH₂) ; 63,7 (CH₂O) ; 70,1 (C₅) ; 74,24 (C₆) ; 76,36 (C₄) ; 79,9 (C(CH₃)₃) ; 118,20 (C₂) ; 151,20 (C₃) ; 159,2 (C=O) ; 172 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3356 (NH, OH) ; 1756 (C=O) ; 1684 (C=C) ; 1256 (Si-C def.) ; 1164 (COO) ; 844 (Si-C strech.).

61 : Ether 6-(6-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)hexenyl) de l'acide ascorbique (m=4)

C₂₀H₃₆NO₈Si

MM = 447,5 g.mol⁻¹

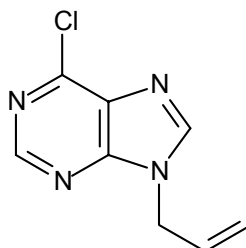
Acide L-ascorbique : 0,88g (5 mmoles) ;
DEAD : 0,87g (5 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,31g (5 mmoles) ;
6-(tertiobutylamidométhylidiméthylsilanyl)hexan-1-ol (**36**) : 0,9g (3,4 mmoles).
0,83g (46%) de composé **61** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,01 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,50-0,58 (m, 2H, SiCH₂) ; 1,28-1,37 (m, 6H, SiCH₂(CH₂)₃) ; 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,49-1,55 (m, 2H, Si(CH₂)₄CH₂) ; 2,60 (d, 2H J=5,7Hz, CH₂N) ; 3,78 (m, 2H, OCH₂) ; 3,9 (m, 1H, H₅) ; 4,4 (m, 2H, H₆) ; 4,64 (d, 1H J=1,3Hz, H₄).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,5 ((C_H3)₂Si) ; 11,6 (SiC_H2) ; 22,1 (SiCH₂C_H2) ; 28,4 (C(C_H3)₃) ; 29,2 (Si(CH₂)₂C_H2) ; 33,2 (Si(CH₂)₃C_H2) ; 35,4 (Si(CH₂)₄C_H2) ; 36,5 (C_H2N) ; 63,7 (C_H2O) ; 70,1 (C₅) ; 74,24 (C₆) ; 76,36 (C₄) ; 79,9 (C(CH₃)₃) ; 118,20 (C₂) ; 151,20 (C₃) ; 159,2 (C=O) ; 172 (C₁).

IR cm⁻¹ : 3356 (NH, OH) ; 1756 (C=O) ; 1684 (C=C) ; 1256 (Si-C def.) ; 1164 (COO) ; 844 (Si-C strech.).

62 : 6-Chloro-9-N-(3-propényl)purine.



C₈H₇ClN₄

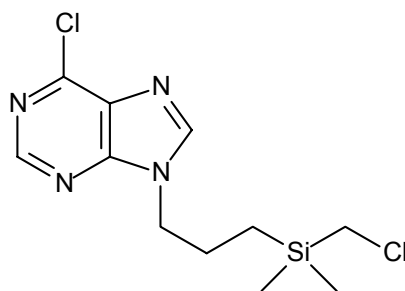
MM = 194,6 g mol⁻¹

A 25 ml de diméthylformamide (DMF) anhydre est ajouté 2,5g (16 mmoles) de 6-chloropurine (commerciale), le tout sous atmosphère d'azote. Puis 1,1g (28,5 mmoles) d'hydrure de sodium (NaH en suspension à 60% dans de l'huile) préalablement lavé dans du pentane est introduit dans la solution précédente. La solution est laissée sous forte agitation et à température ambiante pendant 2 heures. Puis 3,5g (28,5 mmoles) de bromure d'allyle est ajouté dans la solution et le tout est alors porté au reflux du DMF pendant 3 heures. Le solvant est coévaporé sous pression réduite avec du toluène, puis le résidu est filtré et lavé avec du dichlorométhane et ce dernier est évaporé toujours sous pression réduite. Le produit (5,5g) est conservé à l'état brut pour la réaction suivante.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 4,41 (d, 2H J=7Hz, C_H2N) ; 5,1-5,22 (m, 2H, C_H2=) ; 5,8-6,0 (m, 1H, C_H=) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 48,3 (C_H2-N) ; 120,26 (C_H2=) ; 128,9 (C_H=CH₂) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 156,4 (C₄).

63 : 6-Chloro-9-N-[(chlorométhyl)diméthylsilyl]-3-propyl]purine.



C₁₁H₁₆Cl₂N₄Si

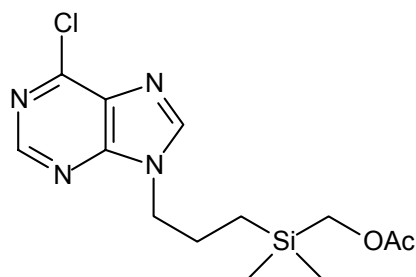
MM = 303,3 g mol⁻¹

Dans une solution de THF anhydre 1g (5 mmoles) du composé **62** est dissout, puis 2,15g (19 mmoles) de chlorométhyl)diméthylchlorosilane (**3**) est ajouté. La solution est portée au reflux du THF puis 0,3 ml d'une solution 0,1N d'H₂PtCl₆ dans l'isopropanol est introduit. La solution est agitée sous atmosphère d'azote et chauffée à 80°C pendant 12 heures. Du noir végétal (environ 2g) est ajouté dans la solution et laissé au reflux du THF pendant une heure. Le tout est filtré sur verre fritté de porosité 4 rincé au dichlorométhane et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit **63** est récupéré, 1,1g (72%).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,4-0,5 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,85-2,01 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 2,79 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,31 (t, 2H, J=7Hz, CH₂N) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 8,1 (SiCH₂) ; 22,8 (CH₂CH₂CH₂) ; 29,2 (CH₂Cl) ; 47,3 (CH₂-N) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 156,4 (C₄).

64 : 6-Chloro-9-N-[(acétoxydiméthylsilyl)-3-propyl]purine.



C₁₃H₁₉ClN₄O₂Si

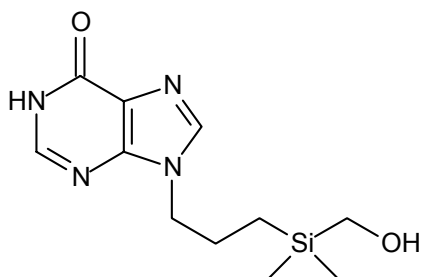
MM = 326,9 g mol⁻¹

A 25 ml de DMF anhydre sont successivement ajoutés 0,42g (1,4 mmoles) du composé **63** puis 0,51g (6,2 mmoles) d'acétate de sodium fraîchement déshydraté. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et chauffé au reflux du DMF pendant 15 heures. Le solvant est alors coévaporé sous pression réduite avec du toluène et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 95/5, v/v. 0,26g (55%) du produit **64** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,4-0,5 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,7-1,8 (m, 2H, SiCH₂CH₂) ; 1,9 (s, 3H, CH₃) ; 4,20 (t, 2H, J=7Hz, CH₂N) ; 4,8 (s, 2H, CH₂OAc) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 10,1 (SiCH₂) ; 20,8 (CH₃COO) ; 22,8 (SiCH₂CH₂) ; 47,3 (CH₂-N) ; 55,1 (CH₂OAc) ; 131,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 150,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 156,4 (C₄) ; 174,6 (C=O).

65 : 6-Oxo-9-N-[(hydroxyméthyl)diméthylsilyl]-3-propyl]purine.



C₁₁H₁₈N₄O₂Si

MM = 266,4 g mol⁻¹

Le composé **64** (0,11g (0,3 mmoles)) est placé dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N (6 ml), et porté au reflux pendant une heure. La solution est alors neutralisée avec de la soude 1N. L'eau est coévaporée avec de l'isopropanol sous pression réduite ; les sels filtrés sur verre fritté de porosité 3 sont lavés à l'isopropanol qui est de nouveau évaporé sous pression réduite. 0,09g (97%) du produit **65** est récupéré.

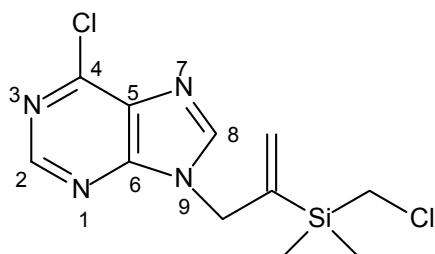
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 0,4-0,5 (m, 2H, CH₂Si) ; 1,85-2,01 (m, 2H, CH₂CH₂Si) ; 4,15 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,31 (t, 2H, J=7Hz, CH₂N) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 8,1 (SiCH₂) ; 22,8 (SiCH₂CH₂) ; 47,3 (CH₂-N) ; 51,2 (CH₂OH) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 165,4 (C₄).

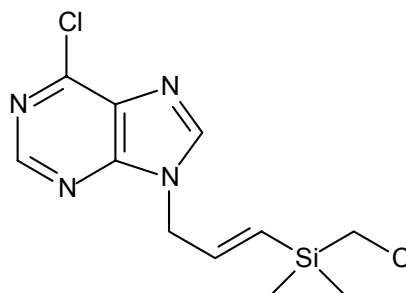
HRMS calc. 267,1277, trouvé 267,1276.

66 : 6-Chloro-9-N-[2-(chlorométhyl)diméthylsilyl]-2-propényl]purine.

67 : (E) 6-Chloro-9-N-[3-(chlorométhyl)diméthylsilyl]-2-propényl]purine.



C₁₁H₁₄Cl₂N₄Si



MM = 301,3 g mol⁻¹

A un mélange à -15°C de triphénylphosphine dans du THF anhydre, est ajouté goutte à goutte le DEAD sur une période de 15 minutes, puis la 6-chloropurine ; pour finir, une solution d'un des silyl-alcools (**42** et **43**) est introduite dans la solution. Le mélange est agité à cette température pendant 24 heures. La solution est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 95/5.

66

6-chloropurine : 2,21g (14,3 mmoles) ;
DEAD : 2,5g (14,3 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3,75g (14,3 mmoles) ;
2-(chlorométhyl)diméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**42**) : 2,5g (15,1 mmoles).
4g (90%) de composé **66** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,76 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,8 (s, 2H, CH₂N) ; 5,49 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,92 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 29,15 (CH₂Cl) ; 48,3 (CH₂-N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,26 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 156,4 (C₄).

IR cm⁻¹ : 1740 (C=O) ; 1660 (N-CO) ; 1250 (Si(CH₃)₂) ; 830 (Si(CH₃)₂).

HRMS calc 301,0443, trouvé 301,0440

67

6-chloropurine : 0,56g (2,5 mmoles) ;
DEAD : 1g (6 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 1,6g (6 mmoles) ;
(E) 3-(chlorométhyldiméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**43**) : 0,4g (2,5 mmoles).
0,24g (26%) de composé **67** est recueilli.

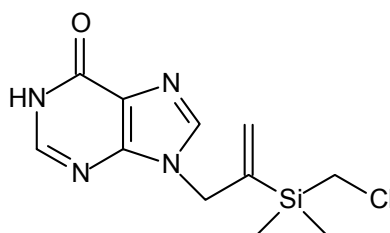
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,76 (s, 2H, CH₂Cl) ;
4,41 (d, 2H J=4,6Hz, CH₂N) ; 5,96 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,28 (dt, 1H J=19,1Hz et
J=4,6Hz, =CH-CH₂) ; 8,1 (s, 1H, H₂) ; 8,7 (s, 1H, H₈).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 29,15 (CH₂Cl) ; 48,3 (CH₂-
N) ; 124,46 (=CH-CH₂) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 147,67 (=CH-Si) ; 151,7 (C₆) ; 152,2
(C₂) ; 156,4 (C₄).

IR cm⁻¹ : 1740 (C=O) ; 1660 (N-CO) ; 1250 (Si(CH₃)₂) ; 830 (Si(CH₃)₂).

HRMS calcd 301.0443, found 301.0440.

68 : 6-Oxo-9-N-[2-(chlorométhyldiméthylsilyl)-2-propényl]purine.



C₁₁H₁₅ClN₄O

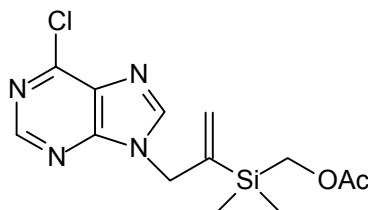
MM = 282,9 g mol⁻¹

A 8 ml d'une solution d'acide tri-fluoro acétique dans l'eau (3/1), maintenue à 0°C, est ajouté 0,25g (0,8 mmoles) du composé **66**. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et à température ambiante pendant 24 heures. Après évaporation des solvants sous pression réduite l'huile obtenue est neutralisée avec un mélange méthanol / hydroxyde d'ammoniaque (3/2). Après une nouvelle évaporation sous pression réduite 0,2g (88%) de composé **68** est obtenu.

RMN ¹H (MeOD) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 3,01(s, 2H, CH₂Cl) ;
4,81 (s, 2H, CH₂N) ; 5,52 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,91 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ;
8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (MeOD) δ ppm : -4,90 ((CH₃)₂Si) ; 29,4 (CH₂Cl) ; 51,3 (CH₂-N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,2 (CH₂=) ; 142,2 (C5) ; 145,6 (C8) ; 151,7 (C6) ; 152,2 (C2) ; 172,8 (C4).

69 : 6-Chloro-9-N-[2-(acétoxyméthylidiméthylsilyl)-2-propényl]purine.



C₁₃H₁₇ClN₄O₂Si

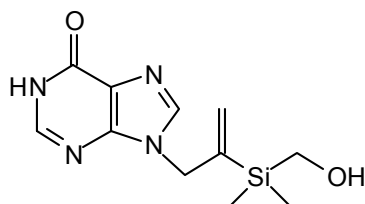
MM = 324,8 g mol⁻¹

A une solution de DMF anhydre (15 ml) est ajouté 0,77g (2,5 mmoles) du composé **66**. Puis il est introduit 0,63g (7,6 mmoles) d'acétate de sodium fraîchement déshydraté. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et chauffé au reflux du DMF pendant 12 heures. Le solvant est alors coévaporé sous pression réduite avec du toluène et le produit purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange d'hexane / acétate d'éthyle, 10/90. 0,35g (42%) de produit **69** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,12 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,95 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,76 (s, 2H, CH₂OAc) ; 4,91 (s, 2H, CH₂N) ; 5,49 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,89 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,1 (s, 1H, H8) ; 8,7 (s, 1H, H2).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -5,3 ((CH₃)₂Si) ; 20,7 (CH₃CO) ; 48,3 (CH₂N) ; 57,3 (CH₂OAc) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,2 (CH₂=) ; 142,2 (C5) ; 145,6 (C8) ; 151,7 (C6) ; 152,2 (C2) ; 156,4 (C4) ; 172,5 (CH₃CO).

70 : 6-Oxo-9-N-[2-(hydroxyméthyl)diméthylsilyl]-2-propényl]purine.



C₁₁H₁₆N₄O₂Si

MM = 264,4 g mol⁻¹

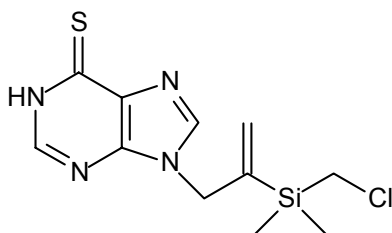
A une solution de méthanol anhydre (25 ml) est ajouté 0,35g (1,110⁻³ mole) du composé **69**. Puis il est introduit 0,1g (0,510⁻³ mole) d'acide para-toluène sulfonique (APTS). Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote au reflux du méthanol pendant 6 heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 95/5. 0,24g (94%) du produit **70** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,2 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 3,6 (s, 2H, CH₂OH) ; 5,10 (s, 2H, CH₂N) ; 5,47 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,9 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,13 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 43,3 (CH₂OH) ; 51,3 (CH₂N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,2 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 174,5 (C₄).

HRMS calc 265.1121, found 265.1126.

71 : 6-Thio-9-N-[2-(chlorométhyl)diméthylsilyl]-2-propényl]purine.



C₁₁H₁₅ClN₄SSi

MM = 298,1 g mol⁻¹

A une solution d'isopropanol anhydre (25 ml) est ajouté 0,2g (0,67 mmoles) du composé **66**. Puis il est introduit 0,06g (0,8 mmoles) de thiourée. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote pendant trois heures. Le précipité blanc formé est filtré et lavé avec de l'isopropanol. Un solide blanc, le composé **71** pesant 0,11g (58%) est récupéré.

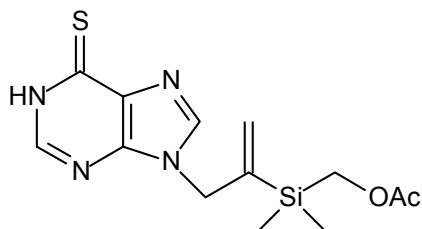
RMN ¹H (DMSO-d₆) δ ppm : 0,21 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,99 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,61 (s, 2H, CH₂N) ; 5,54 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,98 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,14 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ ppm : -4,9 ((CH₃)₂Si) ; 26,4 (CH₂Cl) ; 51,3 (CH₂N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,2 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 174,5 (C₄).

MS 299 (M⁺)

ANAL. calc for C₁₁H₁₅ClN₄SSi (298) : C : 44,29 ; H : 5,07 ; N, 18,79.
Trouvé : C : 43,18 ; H : 4,99 ; N : 18,79.

72 : 6-Thio-9-N-[2-(acetoxymethyldimethylsilyl)-2-propenyl]purine



C₁₃H₁₈N₄O₂SSi

MM = 322,5 g mol⁻¹

A une solution d'isopropanol anhydre (25 ml) est ajouté 0,55g (1,7 mmoles) du composé **69**. Puis il est introduit 0,15g (2 mmoles) de thiourée. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et au reflux pendant trois heures. Le précipité blanc formé est filtré et lavé avec de l'isopropanol. Un solide blanc, le composé **72** pesant 0,38g (70%) est récupéré.

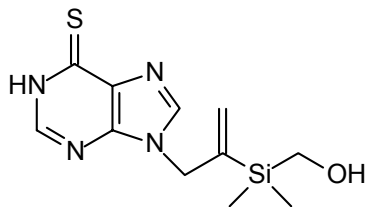
RMN ¹H (MeOD) δ ppm : 0,26 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,95 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,86 (s, 2H, CH₂OAc) ; 4,58 (s, 2H, CH₂N) ; 5,42 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,87 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (MeOD) δ ppm : -4,1 ((CH₃)₂Si) ; 20,7 (CH₃CO) ; 48,3 (CH₂N) ; 51,3 (CH₂-N) ; 57,3 (CH₂OAc) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,3 (CH₂=) ; 142,5 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 172,5 (CH₃CO) ; 174,5 (C₄).

IR : 1738 (C=O) ; 1600 (C=S).

MS : 323 (M⁺)

73 : 6-Thio-9-N-[2-(hydroxyméthyl)diméthylsilyl]-2-propényl]purine.



C₁₁H₁₆N₄OSSi

MM = 280,4 g mol⁻¹

A une solution de méthanol anhydre (15 ml) est ajouté 0,2g (1,11 mmoles) du composé **73**. Puis il est introduit 0,13g (0,9 mmoles) de carbonate de potassium (K₂CO₃). Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote au reflux du méthanol pendant 6 heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite, puis nous ajoutons 4ml d'eau. 0,08g (45%) du produit **73** est récupéré par recristallisation dans le méthanol.

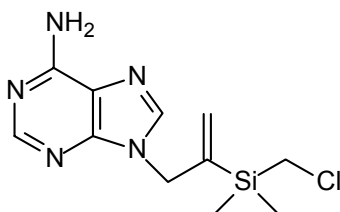
RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 3,6 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,63 (s, 2H, CH₂N) ; 5,47 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,96 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 8,07 (s, 1H, H₈) ; 8,5 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -5,1 ((CH₃)₂Si) ; 45,3 (CH₂OH) ; 51,3 (CH₂N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,3 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 174,5 (C₄).

ANAL. calc pour C₁₁H₁₆N₄OSSi (280) : C : 46,13 ; H : 5,76 ; N : 20,3

Trouvé : C : 46,21 ; H : 5,61 ; N : 20,58.

74 : 9-N-[2-(chlorométhyldiméthylsilyl)-2-propényl]adénine.



C₁₁H₁₆ClN₅Si

MM = 281,3 g mol⁻¹

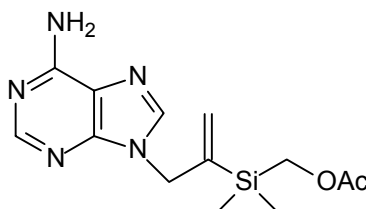
A un mélange de 2g (7,5 mmoles) de triphénylphosphine dans du THF anhydre (20 ml) à -15°C, le DEAD est ajouté goutte à goutte (1,3g (7,5 mmoles)) sur une période de 15 minutes, puis 0,4g (3 mmoles) d'adénine commerciale et pour finir 0,5g (3 mmoles) du chlorosilyl-alcool (**42**) sont introduits. Le mélange est agité à cette température pendant 24 heures. La solution est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux 0,43g (51%) du composé **74** est purifié par chromatographie sur gel de colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 98/2.

RMN ¹H (DMSOd⁶) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,75 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,66 (s, 2H, CH₂N) ; 5,51 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,93 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,90 (large s, 2H, NH₂) ; 8,11 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (DMSOd⁶) δ ppm : -3,9 ((CH₃)₂Si) ; 20,3 (CH₂Cl) ; 51,3 (CH₂N) ; 125,9 (C=CH₂) ; 131,0 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 163,5 (C₄).

MS 282 (M⁺)

75 : 9-N-[2-(acétoxyméthyldiméthylsilyl)-2-propényl]adénine.



C₁₃H₁₉N₅O₂Si

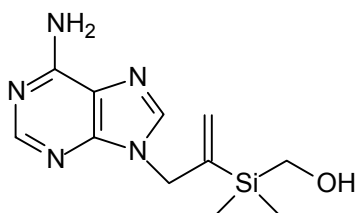
MM = 304,8 g mol⁻¹

A une solution de DMF anhydre (10 ml) est ajouté 0,2g (0,7 mmoles) du composé **74**, puis 0,12g (1,5 mmoles) d'acétate de sodium fraîchement déshydraté. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et chauffé au reflux du DMF pendant 12 heures. Le solvant est alors coévaporé sous pression réduite avec du toluène et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 95/5. 0,15g (71%) du produit **75** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 2,00 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,82 (s, 2H, CH₂OAc) ; 4,61 (s, 2H, CH₂N) ; 5,49 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) , 5,98 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,92 (large s, 2H, NH₂) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 20,7 (CH₃CO) ; 48,3 (CH₂N) ; 57,3 (CH₂OAc) ; 125,9 (C=CH₂) ; 130,26 (CH₂=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 164,4 (C₄) ; 172,5 (CH₃CO).

76 : 9-N-[2-(hydroxyméthyldiméthylsilyl)-2-propényl]adénine.



C₁₁H₁₇N₅O_{Si}

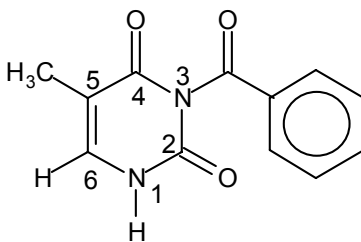
MM = 281,3 g mol⁻¹

A une solution de méthanol anhydre (20 ml) est ajouté 0,15g (0,5 mmoles) du composé **75**, puis 0,07g (0,5 mmoles) de carbonate de potassium (K₂CO₃). Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote au reflux du méthanol pendant 6 heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 95/5. 0,10g (78%) du produit **76** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 3,3 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,41 (s, 2H, CH₂N) ; 5,52 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,89 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,87 (large s, 2H, NH₂) ; 8,1 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,2 ((CH₃)₂Si) ; 44,3 (CH₂OH) ; 50,3 (CH₂N) ; 125,7 (C=CH₂) ; 130,4 (CH₂=) ; 143,2 (C₅) ; 145,2 (C₈) ; 151,3 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 162,5 (C₄).

77 : N-3 benzoyl thymine

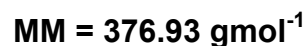
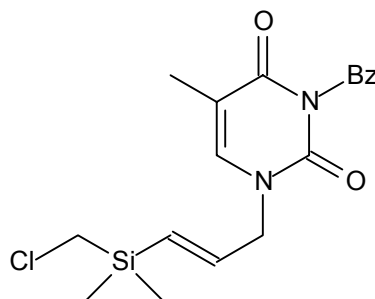
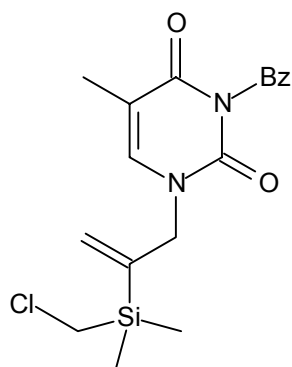


A 1,26g (10 mmoles) de thymine dans 15 ml d'acétonitrile et 4 ml de pyridine, nous ajoutons goutte à goutte une solution de 6g (42.7 mmoles) de chlorure de benzoyle. Après 24 heures de chauffage à 60°C, la pyridine est coévaporée sous pression réduite avec du toluène. Nous récupérons une pâte jaunâtre à laquelle nous ajoutons 20 ml d'une solution aqueuse saturée en K₂CO₃ et 20 ml d'acétonitrile. Après 3 heures d'agitation, la phase aqueuse est filtrée et évaporée. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice pour isoler 2.5g (90%) du composé **77**.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,80 (d, 3H J=1Hz, CH₃(t)) ; 7,53 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)) ; 7,60-7,94 (m, 5H, CH Benz) ; 11,37 (s, 1H, N₁H).

78 : N-1-[2-(chlorométhyl)diméthylsilyl] prop-2-ènyl]-N-3-benzoylthymine

79 : (E) N-1-[3-(chlorométhyl)diméthylsilyl] prop-2-ènyl]-N-3-benzoylthymine



A un mélange de triphénylphosphine en solution dans du THF anhydre à -15°C , le DEAD est ajouté goutte à goutte sur une période de 15 minutes. Puis la N-3 benzoyl thymine et pour finir une solution d'un des silyl-alcools (**42** et **43**) sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité à cette température pendant 24 heures. La solution est filtrée et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 97/3.

78

N-3Benzoyl thymine : 1,12g (4,9 mmoles) ;
DEAD : 2,12g (12,15 mmoles) ;
Triphénylphosphine : 3,2g (12,15 mmoles) ;
2-(chlorométhyl)diméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**43**) : 0,8g (4,9 mmoles).
1,3g (71%) de composé **78** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,25 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,87 (d, 3H J=1Hz, CH₃(t)) ; 2,76 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,41 (s, 2H, CH₂N) ; 5,51 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,94 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 7,03 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)) ; 7,37-7,80 (m, 5H, CH Benz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,9 ((CH₃)₂Si) ; 12,2 (CH₃(t)) ; 29,2 (CH₂-N) ; 51,7 (CH₂Cl) ; 110,6 (CH₃-C=CH) ; 130,2 (CH₂=) ; 128,3-135,4 (5CH de benz) ; 131,4 (Cq(Benz)) ; 140,0 (-CH=CCH₃) ; 142,6 (Cq=CH₂) ; 149,6 (N-CO-N) ; 162,5 (C4(t)) ; 169,5 (CO(Benz)).

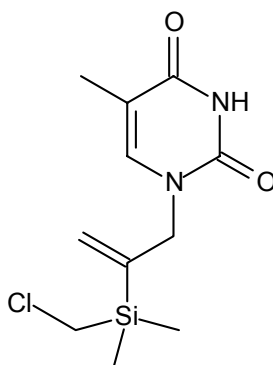
79

N-3Benzoyl thymine : 0,56g (2,5 mmoles) ;
DEAD : 1g (6 mmoles);
Triphénylphosphine : 1,6g (6 mmoles);
(E) 3-(chlorométhyldiméthylsilyl)prop-2-ène-1-ol (**43**) : 0,4g (2,5 mmoles).
0,24g (26%) de composé **79** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,16 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,86 (d, 3H J=1Hz, CH₃(t)) ; 2,75 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,30 (d, 2H J=4,6Hz, CH₂N) ; 5,89 (d, 1H J=19,1Hz, =CHSi) ; 6,25 (dt, 1H J=19,1Hz et J=4,6Hz, =CH-CH₂) ; 7,03 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)) ; 7,37-7,80 (m, 5H, CH Benz).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,8 ((CH₃)₂Si) ; 12,5 (CH₃(t)) ; 29,8 (CH₂-N) ; 51,7 (CH₂Cl) ; 110,3 (CH₃-C=CH) ; 124,6 (=CH-CH₂) ; 128,4-135,0 (5CH de Benz) ; 131,8 (Cq(Benz)) ; 140,7 (-CH=CCH₃) ; 142,0 (Cq=CH₂) ; 147,7 (=CH-Si) ; 149,6 (N-CO-N) ; 162,0 (C4(t)) ; 169,1 (CO(Benz)).

80 : N-1-[2-(chlorométhyldiméthylsilyl) prop-2-ényl]-thymine



C₁₁H₁₇ClN₂O₂Si

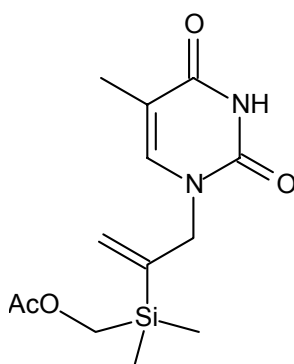
MM = 272,8 gmol⁻¹

A une solution de méthanol (60 ml) est ajouté 0,7g (1,85 mmoles) du composé **78**. Puis 8 ml d'une solution d'ammoniaque à 32% dans de l'eau sont introduits à la seringue. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et à température ambiante pendant trois heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange dichlorométhane / méthanol, 95/5. 0,45g (85%) du produit **80** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,84 (d, 1H J=1Hz, CH₃(t)) ; 2,79 (s, 2H, CH₂Cl) ; 4,41 (s, 2H, CH₂N) ; 5,56 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,96 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 7,1 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -5,1 ((CH₃)₂Si) ; 12,5 (CH₃(t)) ; 29,3 (CH₂-N) ; 51,9 (CH₂Cl) ; 110,6 (CH₃-C=CH) ; 130,8 (CH₂=) ; 140,6 (-CH=CCH₃) ; 142,8 (Cq=CH₂) ; 149,2 (N-CO-N) ; 162,4 (C4(t)).

81 : N-1-[2-(acétoxyméthyl)diméthylsilyl] prop-2-ènyl]-thymine



C₁₃H₂₀N₂O₄Si

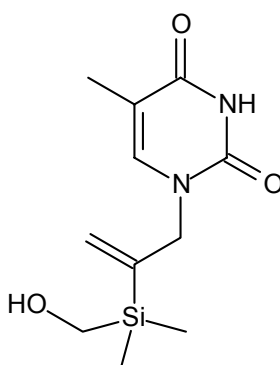
MM = 296,4 g mol⁻¹

A une solution de DMF anhydre (15 ml) est ajouté 0,39g (1,43 mmoles) du composé **80**. Puis il est introduit 0,25g (3 mmoles) d'acétate de sodium fraîchement déshydraté. Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote et chauffé au reflux du DMF pendant 12 heures. Le solvant est alors coévaporé sous pression réduite avec du toluène et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange d'hexane / acétate d'éthyle, 30/70. 0,3g (70%) du produit **81** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,87 (d, 1H J=1Hz, CH₃(t)) ; 1,95 (s, 3H, CH₃CO) ; 3,76 (s, 2H, CH₂OAc) ; 4,41 (s, 2H, CH₂N) ; 5,53 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,9 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 7,03 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,6 ((CH₃)₂Si) ; 12,5 (CH₃(t)) ; 20,7 (CH₃CO) ; 29,8 (CH₂-N) ; 57,3 (CH₂OAc) ; 110,6 (CH₃-C=CH) ; 130,6 (CH₂=) ; 140,07 (-CH=CCH₃) ; 142,6 (Cq=CH₂) ; 149,6 (N-CO-N) ; 162,5 (C4(t)) ; 172,5 (CH₃CO).

82 : N-1-[2-(hydroxyméthyldiméthylsilyl) prop-2-ényl]-thymine



C₁₁H₁₈N₂O₃Si

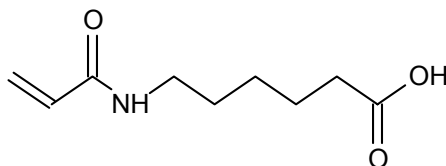
MM = 254,4 g mol⁻¹

A une solution de méthanol anhydre (15 ml) est ajouté 0,3g (1 mmoles) du composé **81**. Puis il est introduit 0,14g (1 mmoles) de carbonate de potassium (K₂CO₃). Le mélange est alors agité sous atmosphère d'azote à température ambiante pendant 15 heures. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 90/10. 0,24g (94%) du produit **82** est recueilli.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,18 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,87 (d, 1H J=1Hz, CH₃(t)) ; 3,1 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,41 (s, 2H, CH₂N) ; 5,47 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,89 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 6,98 (d, 1H J=1Hz, H₆(t)).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,9 ((CH₃)₂Si) ; 12,2 (CH₃(t)) ; 29,7 (CH₂-N) ; 45,3 (CH₂OH) ; 110,1 (CH₃-C=CH) ; 130,1 (CH₂=) ; 140,0 (-CH=CCH₃) ; 142,3 (Cq=CH₂) ; 149,6 (N-CO-N) ; 162,5 (C4(t)).

83 : Acide 6-acrylamidohexanoïque.



C₉H₁₅NO₃

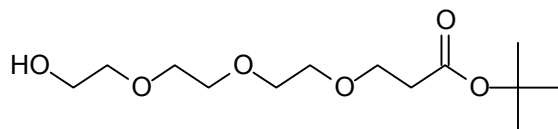
MM = 185,2 g mol⁻¹

Dans un tricol contenant 75 ml d'eau et 5,6 g (76,2 mmoles) de dihydroxyle de calcium, sont additionnés 5g (38,1 mmoles) d'acide 6-aminohexanoïque le tout à 0°C. Puis à la seringue est ajouté 3,5 ml (44 mmoles) de chlorure d'acryloyle à raison de 1 ml toutes les deux minutes. La réaction se déroule pendant cinq minutes sous une forte agitation et la solution est filtrée sur un verre fritté de porosité 4 pour éliminer le Ca(OH)₂ en excès. Le filtrat est de nouveau placé dans un dicol à 0°C sous forte agitation dans lequel est ajoutée une solution d'HCl 1N afin d'acidifier la solution jusqu'à un pH=2. Très rapidement un précipité blanc se forme dans le ballon. La solution est alors filtrée et le précipité blanc est recueilli et séché. 6,35g (90%) du produit **83** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,20-1,55 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂) ; 2,17 (t, 2H J=7,1Hz, CH₂CO) ; 3,1 (q, 2H J=8 et 5Hz, CH₂NH) ; 5,55 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 6,02 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 24,3 (CH₂CH₂COOH) ; 26,0 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 28,8 (NHCH₂CH₂) ; 33,80 (CH₂COOH) ; 38,4 (NHCH₂) ; 124,7 (CH₂=) ; 131,9 (CH=) ; 165,5 (CONH) ; 174,7 (COOH).

84 : 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle.



C₁₃H₂₆O₆

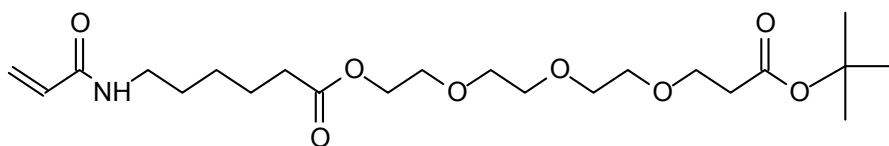
MM = 278,4 g mol⁻¹

Dans un dicol de 1 litre contenant 500 ml de tétrahydrofurane anhydre sont ajoutés 144g (1,12 moles) de triéthylène glycol commercial, le tout sous atmosphère d'azote et sous agitation. Nous ajoutons 0,27g (12 mmoles) de sodium puis attendons la dissolution complète. 56g (0,37 mole) de tertbutylacrylate est alors ajouté à la seringue. La réaction est agitée pendant 20 heures à température ambiante. 12 ml (12 mmoles) d'HCl sont rajoutés pour neutraliser la solution. Le tout est agité pendant 30 minutes puis le THF est évaporé sous pression réduite. La solution est alors noyée dans 200 ml d'eau salée saturée, puis dans 400 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est alors extraite. Ceci est renouvelé deux fois. Les différentes phases organiques sont alors rassemblées, séchées et le solvant est évaporé sous pression réduite. 102g (98%) du produit **84** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,33 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 2,39 (t, 2H J=7Hz, CH₂COO) ; 3,48-3,63 (m, 14H, CH₂O)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 27,9 (CH₃)₃C) ; 36,2 (CH₂COOtBu) ; 61,5 (CH₂OH) ; 66,8 (CH₂CH₂COOtBu) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 72,4 (CH₂CH₂OH) ; 80,3 (C(CH₃)₃) ; 170,8 (COO).

85 : 12-[(6-acrylamido)hexanoate]-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle



$C_{22}H_{39}NO_8$

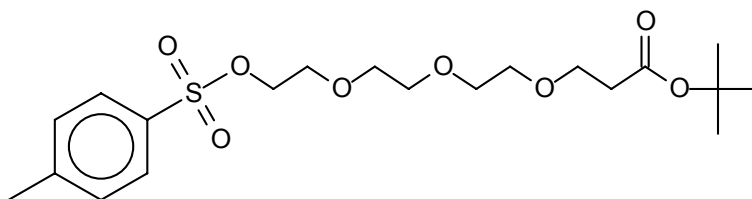
MM = 445,6 g mol⁻¹

Dans un dicol de 250 ml sont placés 5g (27 mmoles) du composé **83** avec 100 ml de dichlorométhane, le tout sous azote, forte agitation et à 0°C ; 5,7g (27 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide sont alors ajoutés. La réaction tourne pendant 30 minutes avant addition de 7,6g (27 mmoles) du composé **84**. Après 20 heures de réaction à température ambiante la solution est placée à 0°C de façon à augmenter la précipitation du cyclohexylcarbodiimide urée. Elle est alors filtrée sur un verre fritté de porosité 3 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol (95/5). 3,5g (30%) du produit **85** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,42 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 1,53 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,65 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,2 (t, 2H J=7,7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,44 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 3,20 (q, 2H J=8 et 5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 10H, OCH₂CH₂O) ; 5,6 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 6,1 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 28,9 ((CH₃)₃C) ; 34,6 (CH₂CH₂CH₂CO et CH₂COOtBu) ; 39,1 (NHCH₂), 61,5 (COOCH₂) ; 63,3 (OCH₂CH₂COOtBu) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 80,3 (C(CH₃)₃) ; 125,7 (CH₂=) ; 131 (CH=) ; 165,5 (CONH) ; 170,7 (COOtBu) ; 173,4 (COO).

86 : 12-Tosyl-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle.



C₂₀H₃₂O₈S

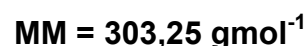
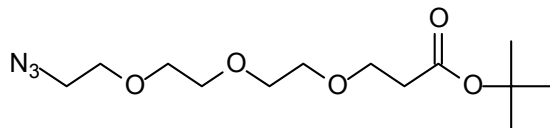
MM = 432,5 g mol⁻¹

Dans une solution de 170 ml de pyridine distillée est placé 62,5g (0,18 mole) du composé **84**, le tout sous flux d'azote, sous agitation et à 0°C. 69g (0,36 mole) de chlorure de tosylo sont additionnés, la solution est alors ramenée à température ambiante. Après 15 heures de réaction le tout est noyé dans la glace, puis extrait trois fois avec du dichlorométhane. La phase organique est alors lavée avec 300 ml d'une solution d'acide acétique 2% puis 300 ml d'eau. La nouvelle phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice dichlorométhane / méthanol (90/10). 45,2g (60%) du produit **86** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,38 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 2,39 (s, 3H, CH₃tosyl) ; 2,43 (t, 2H J=7Hz, CH₂COO) ; 3,48-3,63 (m, 12H, CH₂O) ; 4,12 (t, 2H J=5Hz, CH₂Otosyl) ; 7,26-7,76 (dd, 4H J=83Hz et 7Hz, CH=CH)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 21,6 (CH₃ tosyl) ; 28,1 ((CH₃)₃C) ; 36,2 (CH₂COOtBu) ; 66,8 (CH₂CH₂COOtBu) ; 66,8 (CH₂Otosyl) ; 69,3 (CH₂CH₂Otosyl) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 80,4 (C(CH₃)₃) ; 127,9 ((CH=)₂) ; 129,8 ((CH=)₂) ; 133,1 (CCH₃ tosyl) ; 144,5 (CSO₂tosyl) 170,8 (COO).

87 : 12-Azido-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle.

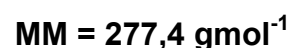
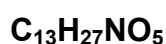
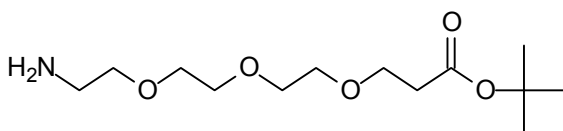


Dans une solution de 150 ml de diméthylformamide distillé (DMF) est additionné 10g (23 mmoles) du composé **86** puis 4,5g (69 mmoles) d'azide de sodium. La solution est agitée sous azote et à température ambiante pendant 20 heures. 25 ml d'eau sont alors rajoutés et la solution est lavée trois fois avec du diéthyléther. La phase organique est récupérée, séchée sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. 6,6g (95%) du produit **87** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,33 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 2,38 (t, 2H J=7Hz, CH₂COO) ; 3,30 (m, 2H, CH₂N₃) ; 3,48-3,63 (m, 12H, CH₂O)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 27,9 (CH₃)₃C) ; 36,2 (CH₂COOtBu) ; 50,5 (CH₂N₃) ; 66,8 (CH₂CH₂COOtBu) ; 67,4 (CH₂CH₂N₃) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 80,3 (C(CH₃)₃) ; 170,8 (COO).

88 : 12-Amino-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle.



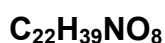
Dans un dicol de 200 ml contenant une solution de méthanol et 7g (23 mmoles) du composé **87** est introduit 7,5g (29 mmoles) de triphénylphosphine (PPh₃). Après trois heures de réaction le méthanol est évaporé. La solution est filtrée sur un verre fritté de porosité 4 rempli de silice (mesh 70/200) ; l'élution débute avec du dichlorométhane de façon à éliminer la triphenylphosphine en excès, puis se poursuit avec un mélange de dichlorométhane / méthanol (50/50) de façon à récupérer 5,8g (91%) du produit pur **88**.

Mais aussi il est possible d'ajouter à 150 ml d'éthanol anhydre 5g (12,2 mmoles) du composé **87** puis 1,57g (49 mmoles) d'hydrazine. Le tout est agité sous azote et chauffé à 80°C. Après 12 heures de réaction, la solution est filtrée sur un verre fritté de porosité 3. Le solvant est évaporé sous pression réduite. 3g (88%) du produit **88** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,37 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 2,2 (bs, 2H, NH₂) ; 2,45 (t, 2H J=7Hz, CH₂COO) ; 2,82 (t, 2H J=5,3Hz, CH₂NH₂) ; 3,43 (t, 2H J=5,3Hz, CH₂CH₂NH₂) ; 3,48-3,63 (m, 12H, CH₂O).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 27,9 (C(CH₃)₃C) ; 36,1 (CH₂COOtBu) ; 41,4 (CH₂NH₂) ; 66,8 (CH₂CH₂COOtBu) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 72,8 (CH₂CH₂NH₂) ; 80,3 (C(CH₃)₃) ; 170,8 (COO).

89 : 12-[(6-acrylamido)hexanamido]-4,7,10-trioxadodécanoate de tertio-butyle



$$\text{MM} = 445,6 \text{ g mol}^{-1}$$

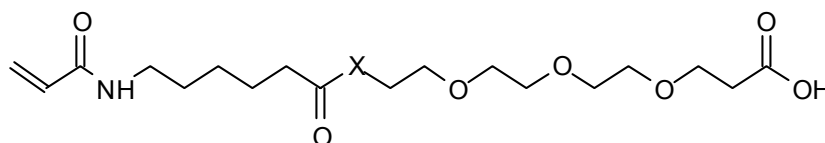
A une solution de 100 ml de dichlorométhane 5g (27 mmoles) du composé **83** est ajouté. La solution est placée à 0°C sous azote et forte agitation, puis est introduit 5,7g (27 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide. La réaction tourne pendant 30 minutes puis pour finir 7,6g (27 mmoles) du composé **88** est ajouté. Après 20 heures de réaction à température ambiante la solution est placée à 0°C de façon à augmenter la précipitation de la cyclohexylcarbodiimide urée. Elle est alors filtrée sur un verre fritté de porosité 3 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 95/5. 3,5g (30%) du produit **89** sont récupérés.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,42 (s, 9H, (CH₃)₃C) ; 1,50 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,20 (t, 2H J=7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,40 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 2,95 (t, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,20 (t, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 12H, OCH₂CH₂O) ; 5,55 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 6,02 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 28,9 ((CH₃)₃C) ; 34,6 (CH₂CH₂CH₂CO et CH₂COOtBu) ; 39,1 (NHCH₂), 61,5 (COOCH₂) ; 63,3 (OCH₂CH₂COOtBu) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 80,3 (C(CH₃)₃) ; 125,7 (CH₂=) ; 131 (CH=) ; 165,5 (CONH) ; 170,7 (COOtBu) ; 173,4 (COO).

90 : acide 12-[(6-acrylamido)hexanoate]-4,7,10-trioxadodécanoïque

91 : acide 12-[(6-acrylamido)hexanamido]-4,7,10-trioxadodécanoïque



Dans une solution d'acide trifluoroacétique anhydre est additionné, sous azote, de l'anisole, puis un des composés **86** ou **90**. La réaction est agitée pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante. L'acide trifluoroacétique est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 95/5.

90: X = O

C₁₈H₃₁NO₈

MM = 389,5 g mol⁻¹

composé **85** : 4,3g (9,6 mmoles) ;
 anisole : 1,25g (11,4 mmoles) ;
 acide trifluoroacétique : 150 ml ;
 2,4g (65%) du composé **90** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,50 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,20 (t, 2H J=7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,50 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 3,20 (t, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 14H, OCH₂CH₂O et CH₂OCO) ; 5,55 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 6,02 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 33,8 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 34,7 (CH₂COOH) ; 39,1 (NHCH₂) ; 61,5 (COOCH₂) ; 63,6 (OCH₂CH₂COOH) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,1-70,4 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 126,3 (CH₂=) ; 130,7 (CH=) ; 166 (CONH) ; 173,7 (COO) ; 174,1 (COOH).

91 : X = NH

C₁₈H₃₂N₂O₇

MM = 388,46 g mol⁻¹

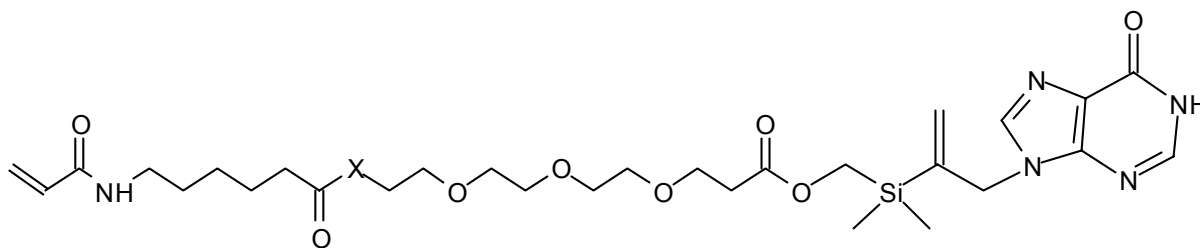
composé **89** : 1,24g (2,8 mmoles) ;
anisole : 0,4g (3,7 mmoles) ;
acide trifluoroacétique : 75 ml ;
0,95g (90%) du composé **91** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,60 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,80 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,15 (t, 2H J=7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,45 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 3,1 (t, 2H J=5,3Hz, CH₂NH) ; 3,30 (t, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 12H, OCH₂CH₂O) ; 5,55 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 6,02 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 34,8 (CH₂CH₂CH₂CO et CH₂COOH) ; 39,5 (CONCH₂) ; 40,9 (NHCH₂) ; 63,30 (OCH₂CH₂COOH) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,3-70,6 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 125,7 (CH₂=) ; 131 (CH=) ; 165,5 (CONH) ; 172,5 (COO) ; 173,8 (COOH).

92 : 12-[(6-acrylamido)hexanoate]-4,7,10-trioxadodécanoate de [[2-(3-(N-9-hypoxanthyl)) prop-1-ényl] diméthyl silyl] méthyle.

93 : 12-[(6-acrylamido)hexanamido]-4,7,10-trioxadodécanoate de [[2-(3-(N-9-hypoxanthyl)) prop-1-ényl] diméthyl silyl] méthyle.



Dans une solution de 100 ml de dichlorométhane le composé acide est ajouté. La solution, sous azote et forte agitation, est placée à 0°C, puis le dicyclohexylcarbodiimide est additionné. La réaction tourne pendant 30 minutes puis l'analogue **70** est introduit dans la solution. Après 20 heures de réaction à température ambiante la solution est placée à 0°C de façon à augmenter la précipitation de la cyclohexylcarbodiimide urée. Elle est alors filtrée sur un verre fritté de porosité 3 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec comme éluant un mélange de dichlorométhane / méthanol, 95/5.

92: X = O**MM = 635,79 g mol⁻¹**

composé **90** : 0,5g (1,28 mmoles) ;
composé **70** : 0,36g (1,28 mmoles) ;
DCC : 0,36g (1,28 mmoles) ;
Dichlorométhane : 20 ml ;
0,15g (15%) du composé **92** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,2 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,50 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,6 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,20 (t, 2H J=7,7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,50 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 3,20 (t, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 14H, OCH₂CH₂O et CH₂OCO) ; 5,10 (s, 2H, CH₂N) ; 5,50 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 5,68 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,91 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 6,12 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=) ; 8,23 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 33,8 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 34,7 (CH₂COOH) ; 39,1 (NHCH₂) ; 43,3 (CH₂O) ; 51,3 (CH₂-N) ; 61,5 (COOCH₂) ; 63,30 (OCH₂CH₂COOH) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 125,9 (C=CH₂) ; 126,2 (CH₂=) ; 130,26 (CH₂=) ; 130,7 (CH=) ; 142,2 (C₅) ; 145,6 (C₈) ; 151,7 (C₆) ; 152,2 (C₂) ; 166 (CONH) ; 173,7 (COO) ; 174,1 (COO) ; 174,5 (C₄).

93: X = NH**MM = 634,81 g mol⁻¹**

composé **91** : 0,61g (1,6 mmoles) ;
composé **70** : 0,45g (1,6 mmoles) ;
DCC : 0,32g (1,6 mmoles) ;
Dichlorométhane : 20 ml ;
0,19g (19%) du composé **93** sont recueillis.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 0,2 (s, 6H, (CH₃)₂Si) ; 1,33 (m, 2H, NH(CH₂)₂CH₂) ; 1,50 (m, 2H, NHCH₂CH₂) ; 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CO) ; 2,20 (t, 2H J=7,7Hz, OCH₂CH₂CO) ; 2,50 (t, 2H J=7,7Hz, CH₂CH₂CH₂CO) ; 3,02 (t, 2H J=5,3Hz, CH₂NH) ; 3,20 (q, 2H J=5Hz, CH₂NH) ; 3,50-3,65 (m, 12H, OCH₂CH₂O) ; 5,10 (s, 2H, CH₂N) ; 5,45 (dd, 1H J_{AM}=10Hz et J_{AX}=1,8Hz, CH₂=) ; 5,52 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,86 (d, 1H J^{gem}=1,2Hz, CH₂=) ; 5,95 (dd, 1H J_{MA}=10Hz et J_{MX}=17Hz, CH=) ; 6,31 (dd, 1H J_{XA}=1,8Hz et J_{XM}=17Hz, CH₂=) ; 8,13 (s, 1H, H₈) ; 8,7 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : -4,7 ((CH₃)₂Si) ; 24,5 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 26,4 (NHCH₂CH₂CH₂) ; 27,4 (NHCH₂CH₂) ; 33,8 (CH₂CH₂CH₂CO) ; 34,7 (CH₂COOH) ; 39,1 (NHCH₂) ; 40,9 (NHCH₂) ; 51,3 (CH₂-N) ; 61,5 (COOCH₂) ; 63,30 (OCH₂CH₂COOH) ; 66,6 (COOCH₂CH₂O) ; 70,2-70,5 ((OCH₂CH₂O)₂) ; 125,9 (C=CH₂) ; 126,2 (CH₂=) ; 130,26 (CH₂=) ; 130,7 (CH=) ; 142,2 (C5) ; 145,6 (C8) ; 151,7 (C6) ; 152,2 (C2) ; 166 (CONH) ; 173,7 (COO) ; 174,1 (COO) ; 174,5 (C4).

4-2. BIOLOGIE

4-2.1. CULTURE CELLULAIRE

Les prélèvements de moelle osseuse humaine (Pr. Durandea, Service Traumatologie, CHR Pellegrin) sont obtenus à partir de la diaphyse fémorale de patients sains (âgés de 20 à 60 ans), subissant des interventions chirurgicales au niveau de la hanche après un traumatisme. La moelle osseuse est homogénéisée par des passages successifs dans des aiguilles de diamètre décroissant : G-16, G-18 puis G-20 et centrifugée à 800×g pendant dix minutes. Le culot est re-suspendu par 10 ml de milieu IMDM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et de dexaméthasone à 10^{-8} M. Cette suspension cellulaire estensemencée à 4.10^5 cellules / cm^2 dans ce même milieu, incubée en atmosphère humide (5% CO₂, 95% air) à 37°C. Le milieu de culture est remplacé tous les quatre jours, et la dexaméthasone (à la même concentration 10^{-8} M), est ajoutée lors des trois premiers changements de milieu.

4-2.2. CYTOCOMPATIBILITE DES SILA-CONJUGUES SYNTHETISES

4-2.2.1. INTRODUCTION

Il s'agit de tests colorimétriques permettant de mettre en évidence une activité métabolique cellulaire ou simplement la viabilité cellulaire. La mesure de l'intensité de la réaction colorée à l'aide d'un spectrophotomètre permet une appréciation quantitative. De plus, pour ces tests de biocompatibilité, les cellules sont placées dans des plaques de culture de 96 puits qui permettent la lecture sur le spectrophotomètre. La densité d'ensemencement est de 20 000 cellules / cm^2 pour les ostéoblastes en croissance.

4-2.2.2. TESTS AU MTT

➤ **Principe**

Ce test a été introduit par Moshmann [1] pour déterminer l'activité métabolique cellulaire. Le MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est métabolisé par la succinate déhydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en cristaux bleus de formazan. La quantité de formazan générée par les cellules après incubation en présence d'un agent toxique donne l'indication du nombre et de l'activité métabolique des cellules vivantes. Toutes ces mesures sont effectuées à partir d'un contrôle positif et comparées par rapport au 100% de ce contrôle.

➤ **Protocole**

Les plaques de culture sont retirées de l'incubateur après 24 heures de contact entre les solutions d'agent potentiellement toxiques et les cellules, chaque puits est rincé deux fois à l'aide de 0,2 ml de tampon phosphate. Une solution de MTT (0,125 ml à 1 g/ml préparé dans un tampon de Hanks (cf. annexe) contenant 1 g/l de glucose est distribuée dans chaque puits. Les plaques sont replacées dans l'incubateur pendant trois heures afin que la réaction enzymatique attendue survienne. Après élimination du surnageant, les cristaux de formazan formés sont solubilisés par addition de 0,1 ml/puits de DMSO. La solubilisation des cristaux est instantanée, mais leur coloration n'est stable qu'une heure. Les plaques sont donc rapidement lues dans le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm, ce qui permet d'obtenir une valeur d'absorbance par puits. La coloration s'étend de l'incolore pour les concentrations entraînant 100% de toxicité à une couleur violacée très foncée pour le témoin et les extraits peu ou pas toxiques.

4-2.2.3. TESTS DU ROUGE NEUTRE

➤ **Principe**

Ce test a été mis au point par Parish et Mullbacher [2] en 1983 pour déterminer la viabilité cellulaire. Le rouge neutre est un colorant vital qui se fixe par liaison électrostatique aux sites anioniques des membranes lysosomiales dans les cellules vivantes. Une altération de cette membrane provoque une diminution de la fixation du colorant. L'intensité de la réaction colorée permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes après incubation en présence de l'agent supposé toxique.

➤ **Protocole**

Les plaques de culture sont retirées de l'incubateur après 24 heures de contact entre le composé apparemment toxique et les cellules. Chaque puits est alors rincé au moins deux fois à l'aide de 0,2 ml de tampon phosphate. Une solution de rouge neutre à 0,4% (v/v) dans le milieu de culture (100 µl/puits) est distribuée dans chacun des puits. Après trois heures d'incubation à 37°C, la solution de rouge neutre est enlevée et l'extraction du colorant est réalisée en ajoutant 100µl/puits d'une solution à 1% (v/v) dans l'eau d'acide acétique dans 50% (v/v) d'éthanol. Les plaques sont agitées pendant cinq minutes. Nous obtenons dans chacun des puits une coloration d'intensité variable dont l'absorbance est mesuré sur le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. La coloration s'étend de l'incolore pour les extraits entraînant 100% de toxicité à une couleur plus ou moins rouge pour le témoin et les extraits peu toxiques. Les résultats que nous avons obtenus sont très proches voire identiques à ceux mesurés avec le test MTT. C'est pour cela que dans un souci de clarté nous avons préféré ne présenter dans le manuscrit que les résultats des tests MTT

4-2.3. TESTS DU TRANSPORT DES MOLECULES NATURELLES D'INTERET BIOLOGIQUE

4-2.3.1. TRANSPORT DE L'ACIDE ASCORBIQUE

➤ Principe

Nous avons effectué ce test afin de caractériser le transport de l'acide ascorbique au sein des ostéoblastes humains. Les travaux déjà décrits pour différents autres types cellulaires nous ont servi de support d'étude. Nous avons utilisé des cellules humaines en croissance que nous avons laissé incuber sur différentes durées avec de l'acide ascorbique marqué radioactivement au carbone 14 et à différentes concentrations.

➤ Protocole

Nous avons utilisé des plaques de culture 24 puitsensemencées à raison de 5000 cellules/puits. Après 24 heures de croissance dans l'étuve à 37°C, 5% CO₂, les puits sont lavés trois fois avec 1 ml de tampon phosphate (annexe). Une solution de 0,3 ml, contenant la molécule marquée dans le tampon à différentes concentrations, est déposée dans chacun des puits. La réaction est chronométrée et au temps choisi, le puits est vidé et aussitôt lavé trois fois avec 1 ml de tampon de façon à bloquer le processus d'entrée de la molécule. Les puits sont alors vidés du tampon et les cellules sont laissées 2 heures à +4°C en présence de 0,3 ml d'eau distillée. La lyse des cellules effectuée, les puits sont nettoyés et l'ensemble de la solution aqueuse est récupéré et mélangé dans un tube à du liquide à scintillation. L'ensemble des tubes est alors placé dans le compteur gamma et les mesures sont enregistrées en coups par minute (cpm). Les mesures sont ensuite comparées à des contrôles négatifs et positifs.

4-2.3.2. CARACTERISATION DE LA DEGRADATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

➤ Principe

Pour tenter d'élucider l'allure des différentes courbes que nous avons obtenues dans l'expérience précédente, nous avons imaginé un montage susceptible de caractériser une éventuelle dégradation de la molécule naturelle soit dans le milieu tampon soit dans la cellule elle-même. Pour cela, nous avons de nouveau utilisé des ostéoblastes humains et de l'acide ascorbique marqué radioactivement ; mais cette fois l'ensemble de la réaction s'est déroulée dans un espace confiné avec une entrée et une sortie de gaz contrôlées.

➤ Protocole

Le montage se compose de deux enceintes A et B hermétiquement closes dans lesquelles nous allons faire circuler un flux d'argon. L'utilisation de ce gaz lourd inerte avec un flux de 5 ml / s permet de purger toute trace de gaz plus léger de la première enceinte A vers la deuxième B puis vers l'extérieur. Le réseau d'aiguille est donc positionné de façon à ce que l'arrivée d'argon se fasse au fond de l'enceinte A, puis, par l'intermédiaire d'une canule (positionnée au plus haut de la première enceinte), atteigne le fond d'une fiole placée au préalable dans l'enceinte B. La sortie des gaz se fera par une troisième aiguille placée le plus haut possible dans la deuxième enceinte (B). L'intérêt de ce montage étant de mesurer le plus précisément possible le dégagement de CO₂, nous avons imaginé utiliser une solution de chaux éteinte qui sera placée, au moment de la réalisation de l'expérience, dans la fiole de l'enceinte B. Le bullage des gaz *via* la canule dans la solution de chaux éteinte devrait permettre de piéger l'intégralité du CO₂ radio-marqué dégagé lors de l'expérience.

Nous avons donc réalisé deux expériences. La première correspond à un témoin : nous avons placé dans l'enceinte A une boîte de Pétri de 10 cm² ne contenant pas d'ostéoblaste. Nous avons ensuite purgé l'atmosphère des deux enceintes pendant une heure avec le flux d'argon. L'atmosphère étant jugée inerte, nous avons ajouté simultanément 5 ml d'une solution d'acide ascorbique radio-marqué à une concentration de 10 µM dans le tampon PBS 1X (annexe) dans la

boite de Pétri (enceinte A) et 15 ml de la solution de chaux éteinte dans la fiole (enceinte B). L'argon s'est alors mis à buller dans la fiole et nous avons laissé le système fonctionner tel quel pendant quatre heures.

La deuxième manipulation est semblable à l'expérience témoin, si ce n'est que la boite de Pétri est maintenant recouverte d'un tapis cellulaire. Le temps de réaction est une nouvelle fois de quatre heures (temps au bout duquel nous considérons que l'ensemble des échanges cellulaires se sont produits).

La réaction terminée, nous prélevons des fractions de la solution de chaux éteinte (0,5 ml que nous additionnons à 4,5 ml de liquide à scintillation). Les tubes sont alors analysés à l'aide d'un compteur à scintillation qui mesure le nombre de coups par minute issus des carbones radioactifs des différentes molécules. De plus nous avons réalisé des mesures annexes permettant d'obtenir l'ensemble des contrôles nécessaires à l'interprétation des résultats. Avant chacune des deux expériences nous avons prélevé une fraction de chaux éteinte. Puis à la fin de la deuxième expérience nous avons lavé plusieurs fois les cellules avec la solution tampon et nous avons placé 3ml d'eau distillée dans la boite. Après 24 heures à +4°C nous avons prélevé la solution et analysé au compteur à scintillation. Les mesures enregistrées correspondent à la radioactivité présente dans la membrane et à l'intérieur des cellules. L'ensemble des expériences est réalisé en triple exemplaire.

L'expérience précédente ayant été réalisée sous un flux d'argon, nous avons renouvelé cette manipulation en utilisant cette fois un flux d'air (débit de 10 ml / s). Le mode opératoire est sensiblement le même que celui décrit précédemment si ce n'est que nous avons placé en amont de l'enceinte A un piège à CO₂ contenant une importante quantité de chaux éteinte. Ce piège permet de capter les traces de CO₂ résiduel qui seraient présentes dans l'air injecté. De plus, des aliquotes de la chaux contenue dans ce piège ont été prélevés avant et après la manipulation.

4-2.3.3. TRANSPORT DE L'HYPOXANTHINE

➤ Principe

Par analogie avec les expériences réalisées pour caractériser le transport de l'acide ascorbique, nous avons tenté de mettre en évidence le transport de l'hypoxanthine. Nous avons utilisé des ostéoblastes en croissance ainsi que de l'hypoxanthine marquée radioactivement au

carbone 14. Nous avons fait varier le temps de contact entre les cellules et la molécule marquée, ainsi que la concentration de cette dernière.

➤ **Protocole**

Nous avons utilisé des plaques de culture 24 puits,ensemencées à raison de 5000 cellules/puits. Après 24 heures de croissance dans l'étuve à 37°C, 5% CO₂ les puits sont lavés trois fois avec 1 ml de tampon phosphate (annexe). Une solution de 0,3 ml, contenant la molécule naturelle marquée dans le tampon à différentes concentrations est déposée dans chacun des puits. La réaction est chronométrée et au temps choisi, le puits est vidé et aussitôt lavé trois fois avec 1 ml de tampon de façon à bloquer le processus d'entrée de la molécule. Les puits sont alors vidés du tampon et les cellules sont laissées 2 heures à +4°C en présence de 0,3 ml d'eau distillée. La lyse des cellules effectuée, les puits sont nettoyés et l'ensemble de la solution aqueuse est récupéré et mélangé dans un tube au liquide à scintillation. L'ensemble des tubes est alors placé dans le compteur gamma et les mesures sont enregistrées en coups par minute (cpm). Les mesures sont ensuite comparées par rapport à des contrôles négatifs et positifs.

4-2.4. TESTS D'INHIBITION DU TRANSPORT DES MOLECULES NATURELLES

4-2.4.1. INTRODUCTION

Nous avons effectué des tests d'inhibition semblables pour les deux molécules naturelles que sont l'acide ascorbique et l'hypoxanthine. C'est pour cela qu'un seul protocole est décrit ci-après. Les sila-conjugués synthétisés sont placés un à un en présence des cellules et de la molécule naturelle correspondante.

4-2.4.2. MISE EN ŒUVRE DU TEST

➤ **Principe**

Ce test a été mis au point pour déterminer l'éventuelle capacité de sila-conjugués à être reconnu par le transporteur de la molécule naturelle. Pour cela nous avons utilisé la molécule marquée radioactivement au carbone 14 comme traceur.

➤ **Protocole**

Les plaques de culture (de 24 puits etensemencées à raison de 5000 cellules/puits) sont retirées de l'incubateur après 24 heures de croissance. Les puits sont lavés trois fois avec 1 ml de tampon phosphate (annexe). Une solution de 0,3 ml, contenant la molécule marquée et son analogue à tester dans du tampon, est placée au contact des cellules dans chaque puits. La réaction est chronométrée et au temps choisi, le puits est vidé et aussitôt lavé trois fois avec 1 ml de tampon de façon à bloquer le processus. Les puits sont alors vidés du tampon et les cellules sont laissées 2 heures à +4°C en présence de 0,3 ml d'eau distillée. La lyse des cellules effectuée, les puits sont nettoyés et l'ensemble de la solution aqueuse est récupéré et mélangé dans un tube au liquide à scintillation. L'ensemble des tubes est alors placé dans le compteur gamma et les mesures sont enregistrées en coups par minute (cpm). Les mesures sont ensuite comparées à des contrôles négatifs et positifs.

4-2.5. TESTS D'ATTACHEMENT DES OSTEOPROGENITEURS SUR LE PVDF

4-2.5.1. INTRODUCTION

Après avoir synthétisé le bio-conjugué, l'avoir fixé sur le PVDF et l'avoir caractérisé par IR-TF, nous avons effectué la dernière étape de ce travail : le test d'adhésion des HBMSC sur le PVDF chimiquement modifié.

4-2.5.2. MISE EN ŒUVRE DU TEST

➤ Principe

Ce test a été effectué selon une méthode adaptée de celle décrite dans la littérature [3,4]. Le plastique des boîtes de culture constitue le témoin qui représente 100% d'adhésion cellulaire. Le revêtement d'agarose, représente ici le témoin de non-adhésion cellulaire.

➤ Protocole

Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans du milieu de culture dépourvu de SFV et de rouge phénol, et sur le matériau puis incubé trois heures à 37°C, 5% CO₂. Après lavage de la couche cellulaire avec du PBS 0,1M pH 7,4 le nombre des cellules adhérentes est quantifié par le dosage de l'activité de l'enzyme lysosomiale, la N-acétyl-β-D-hexosaminidase. 180μl de la solution substrat : p-nitrophényl N-acétyl-β-D-glucosaminide 7,5mM, citrate de sodium 0,1M pH 5, Triton-X100 5% (v/v) sont respectivement ajoutés dans les cupules de 1 cm² et sur les biomatériaux. Après incubation pendant deux heures à 37°C en chambre humide, la réaction est arrêtée par l'addition de 270 μl de tampon PBS 0,1M pH 10,4 contenant de la glycine 50mM et de l'EDTA 5mM puis la réaction est quantifiée par la lecture au spectrophotomètre à 405 nm (Dynex MRX Microplate Reader). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion par rapport au plastique des boîtes de culture, considéré comme la valeur contrôle correspondante au 100%.

4-3. GREFFAGE

4-3.1. PVDF ET IRRADIATION

Le PVDF utilisé nous a été fourni par Madame Natacha BETZ du Département de Recherches sur l'Etat Condensé, les Atomes et les Molécules, du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Saclay. Il se présente sous forme de feuilles de 25 μ M d'épaisseur. Nous avons pour notre part découpé des fragments de 1cm de coté facilitant les différentes manipulations et analyses.

Pour servir de support de greffage le PVDF est tout d'abord lavé dans un soxhlet avec du toluène pendant 24 heures. Les matériaux sont alors récupérés et séchés sous vide par l'intermédiaire d'une pompe à palette pendant 6 heures. C'est après cette étape de lavage qu'ils sont alors susceptibles d'être irradiés.

Les biomatériaux sont placés dans un irradiateur γ au césium 137. L'irradiation est effectuée sous air sur une période de 36 heures. Ce temps est défini de façon à délivrer une dose de 100 kGy sur les matériaux. Ces derniers sont ensuite stockés dans un ballon sous argon et placés à 4°C.

4-3.2. REACTION DE GREFFAGE

Les fragments de PVDF sont introduits dans un ballon de 100ml à fond plat contenant une solution de toluène mélangé au bio-conjugué **93** (10%). Le système est alors chauffé à 60°C pendant trois heures. Les matériaux sont retirés et placés de nouveau dans le Soxhlet au reflux du toluène pendant 24 heures. Ce lavage terminé, ils sont mis sous vide pendant une période de 6 heures.

ANNEXE

Tampon de HANKS

Sa composition pour 10 litres d'eau distillée est :

CaCl_2 (anhydre) : 1,4 g/l

KCl : 4 g/l

KH_2PO_4 : 0,6 g/l

$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 1g/l

NaCl : 80 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,9 g/l

D-glucose : 10 g/l

Le pH est ajusté à 7,4

Tampon PBS

Sa composition pour 10 litres d'eau distillée est :

KCl : 2 g/l

KH_2PO_4 : 2 g/l

NaCl : 80 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 11,5 g/l

Le pH est ajusté à 7,4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 4

- [1] Moshmann T : Rapid colorimetric assay for cellular survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.* **1983** ; 65 : 55-63.
- [2] Parish CR, Mullbacher A : Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **1983** ; 58 : 225-227.
- [3] Landegren U. : Mesurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surfaces antigens. *J. Immunol. Meth.* **1984** ; 67 : 379-388.
- [4] Majeska R.J., Port M., Einhorn T.A. : Attachment to extracellular matrix molecules by cells differing in the expression of the osteoblastic traits. *J. Bone Miner. Res.* **1993** ; 8 : 177-289.

Résumé

Nous présentons dans ce mémoire une étude visant à améliorer les propriétés ostéoinductrices d'un matériau biocompatible par fonctionnalisation chimique de sa surface. Après avoir identifié différentes molécules d'intérêt biologique comme l'acide L-ascorbique et plusieurs bases nucléiques, nous avons vérifié le transport de l'acide ascorbique au sein des cellules osseuses malgré la mise en évidence, originale, de sa dégradation partielle, par décarboxylation. Parmi les différentes bases nucléiques étudiées, nous avons ensuite caractérisé, pour la première fois dans les cellules osseuses humaines, un transport actif d'hypoxanthine. Nous avons synthétisé un bio-conjugué constitué d'un bras espaceur et d'un lien organo-silicié associé à une molécule organique d'intérêt biologique. La cytotoxicité et l'inhibition du transport des molécules naturelles sélectionnées ont été évaluées pour chacune des molécules synthétisées. Deux d'entre elles ont été caractérisées en tant qu'inhibiteurs du transport de l'hypoxanthine dans les cellules ostéoprogénitrices humaines. Dans l'étape suivante, nous avons greffé le bio-conjugué à la surface du matériau choisi : le polyfluorure de vinylidène (PVDF) après irradiation γ . La surface du biomatériau a été analysée avant et après greffage par spectroscopie FT-IR en mode ATR. Enfin, l'impact de la modification chimique de la surface du biomatériau sur le taux d'adhésion cellulaire a été évalué pour conduire à des premiers résultats encourageants pour la suite de cette étude.

Titre

Conception et évaluation de modifications biospécifiques de biomatériaux

Mots clés

Synthèse organique, silicium, hypoxanthine, acide ascorbique, réaction de Mitsunobu, hydrolyse enzymatique, cellules ostéoprogénitrices, poly(fluorure de vinylidène), greffage par irradiation γ , transport, adhésion cellulaire.