

# Analogues de lysolécithines: mimes azido et mimes amino de lysolécithines dérivés de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique



Dimitrios Papadopoulos,<sup>a</sup> Stéphane Auberger,<sup>a</sup> Christine Gérardin,<sup>a</sup> Jacques Amos,<sup>a</sup> Michel Maugras,<sup>b</sup> Marie José Stébé<sup>a</sup> et Claude Selve<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloïdale (CNRS UMR 7565), Université Henri Poincaré-Nancy I, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France.

Fax: +33 3 83 91 25 32; e-mail: claude.selve@lesoc.u-nancy.fr

<sup>b</sup> Groupe de Recherches sur les Interactions Moléculaires aux Interfaces, Université Henri Poincaré-Nancy I, Bâtiment INSERM, CO 10, Plateau de Brabois, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

Received (in Strasbourg, France) 21st January 1999; Accepted 10th March 1999

Les lysolécithines présentent un grand intérêt par différentes propriétés tant physicochimiques que biologiques. Ces molécules peuvent être considérées comme composées de trois parties: une queue lipophile (acide gras), un module central (glycérol) et une tête lipophobe (phosphatidylcholine). Nous décrivons la synthèse par stratégie modulaire d'analogues basés sur un pivot central mimant le glycérol: l'acide 2-azidométhyl-2-méthyl-3hydroxypropionique. La fonction azoture est réduite en amine donnant les dérivés correspondants. Ces diverses structures ont été obtenues tant avec des chaînes hydrophobes hydrogénées que fluorées avec des rendements globalement corrects. Les propriétés de surface des solutions aqueuses des analogues préparés montrent un comportement globalement proche de celui des lysolécithines naturelles mais présentent des analogies pour certains aspects avec les tensioactifs ioniques. Au niveau de l'impact sur une culture de cellules, les produits inhibent la croissance cellulaire à des concentrations supérieures à  $5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. La mort cellulaire intervient alors essentiellement par nécrose. Elle semble devoir être interprétée comme une pénétration de la membrane cellulaire par les dérivés entraînant une solubilisation par "effet détergent" avec formation de micelles mixtes "analogues de lécithine-phospholipides membranaires".

## Lysolecithin analogues: azido- and aminolysolecithin mimics derived from 2,2-bis(dihydroxymethyl)propionic acid.

Lysolecithins have attracted much interest due to some of their physicochemical and biological properties. These molecules are composed of three parts, a lipophilic tail (fatty acid), a central module (glycerol) and a lipophobic head (phosphatidylcholine). We describe here the synthesis, following a modular strategy, of lysolecithin analogues starting from 2-azidomethyl-2-methyl-3-hydroxypropionic acid as a glycerol mimic. The reduction of the azido group leads to amines with good yields for both hydrogenated and fluorinated compounds. The study of the surface properties of aqueous solutions of these analogues gives evidence for a behaviour similar to that of natural lysolecithins, but they present also some analogies with ionic surfactants. Concerning the impact on cell cultures, our products inhibit cellular growth for a concentration above  $5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Cellular death occurs essentially by necrosis; this phenomenon can be interpreted by a penetration of the compounds into the membrane, disrupting it by forming mixed micelles (lysolecithin analogues–membrane phospholipids).

Parmi les phospholipides, une classe de molécules amphiphiles, les lysolécithines, donne lieu depuis quelques années à une investigation importante. Cet intérêt est en relation avec leurs comportements tensioactifs mais aussi en raison de leur importance dans le domaine biologique, en particulier leur activité antivirale potentielle<sup>1</sup> ou avérée<sup>2</sup> ainsi que leur activité anticancéreuse récemment illustrée par la mise sur le marché d'un nouveau médicament de cette famille.<sup>3</sup> Les lysolécithines naturelles sont des substances qui proviennent des diacylglycérophosphatidylcholines, après hydrolyse d'une de leurs liaisons ester par les phospholipases. Elles sont nettement plus solubles dans l'eau que les lécithines. Elles sont en petite quantité dans les membranes biologiques.<sup>4</sup> Pendant longtemps on les a considérées comme ne pouvant pas former des systèmes organisés en bicouches; la formation de liposomes à base de lysolécithines en présence de cholestérol est venue contredire cette idée.<sup>5</sup>

En méthodologie modulaire<sup>6</sup> de synthèse de tensioactifs, nous considérons ces molécules comme constituées par trois

modules: un module hydrophobe, un module de jonction et un module hydrophilic. Pour les lysolécithines, le module hydrophobe est constitué par une chaîne hydrocarbonée appartenant à un acide gras qui est relié par une fonction ester à la molécule pivot, le glycérol. Celui-ci joue le rôle de module de jonction, la deuxième fonction alcool est libre tandis que la troisième porte un module hydrophilic du type phosphatidylcholine, par exemple.<sup>7</sup> Dans nos travaux antérieurs de préparations de molécules amphiphathiques par les méthodes de synthèses modulaires, nous avons montré l'intérêt de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique ou acide 3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-2-méthylpropionique<sup>8</sup> comme pivot central. Cette molécule trifonctionnelle, pouvant mimer le glycérol, peut servir de module de jonction. L'addition d'un module hydrophilic et d'un module hydrophobe à cette molécule permet d'obtenir des analogues de lysolécithines à l'aide d'une stratégie adaptée (Schéma 1). Ces démarches s'inscrivent également dans la mise au point de méthodologies de synthèse permettant l'accès à des molécules amphiphathiques

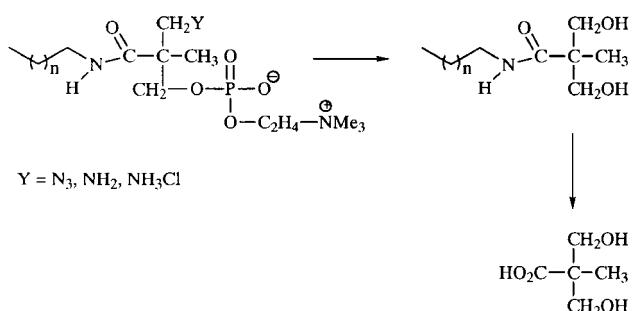


Schéma 1 Rétrosynthèse des analogues de lysolécithines basés sur l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique.

antibactériennes de la série monobactame<sup>9,10</sup> ou encore à des molécules mimes phospholipides du type lécithine-céramide.<sup>11,12</sup>

Nous présentons ici les méthodologies de synthèse de ces analogues de lysolécithines, leurs propriétés physicochimiques en solution aqueuse ainsi que quelques aspects de leur action sur une culture de cellules de type lymphoblastes U937.

## Résultats et discussion

### Synthèses

Nos démarches de synthèses découlent des résultats qui décrivent dans un précédent article la synthèse de modules hydrophobes pour tensioactifs.<sup>8</sup> La préparation d'amidoazido alcool est effectuée à partir de l'acide 3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-2-méthylpropionique.<sup>9</sup> De plus, le groupe azoture permet de modifier d'autres fonctions, sans être affecté.<sup>13,14</sup> Le choix de préparer l'azidolysolécithine est basé également sur deux hypothèses: l'une correspond aux éventuelles propriétés antivirales des molécules préparées<sup>1,2</sup> qui peuvent être augmentées par la présence de la fonction azoture (*cf.* AZT<sup>15</sup>) et l'autre repose sur le fait que la fonction azoture peut faciliter la réaction de phosphorylation difficile dans ce cas en raison de la présence d'un carbone quaternaire et d'une liaison amide. Cette fonction peut gêner la réactivité de l'alcool en diminuant sa nucléophilie; la présence du groupe azoture peut compenser cet effet. Ainsi Polt *et al.*,<sup>16</sup> pour pallier le problème de la glycolysation d'un *N*-acyl-β-amino alcool, proposent le modèle d'une nucléophilie renforcée grâce à une liaison hydrogène favorable impliquant le groupe azoture. Pour nos molécules la possibilité d'une liaison hydrogène favorable plutôt qu'une défavorable semble une hypothèse raisonnable (Schéma 2).

La méthode de phosphorylation choisie, après différents essais en particulier avec le 2-chloro-2-oxo-1,2,3-dioxophospholane,<sup>17</sup> met en oeuvre la réaction entre l'alcool et le 2-bromoéthyldichlorophosphate<sup>2,18</sup> (Schéma 3). Celui-ci est préparé *in situ*, en faisant réagir le bromoéthanole et l'oxychlorure de phosphore en présence de triéthylamine dans le THF. Etant donné la grande facilité avec laquelle la liaison P—Cl s'hydrolyse, nous n'isolons pas le produit et la réaction se poursuit par addition de l'azidomonoamido alcool en solution dans le THF avec un excès de triéthylamine, accepteur d'acide chlorhydrique. L'hydrolyse de la liaison P—Cl restante peu réactive, nécessite des conditions basiques ou la présence de sel.<sup>19</sup> Par la suite, le diester phosphorique bromé III est récupéré dans la phase organique après lavage acide.

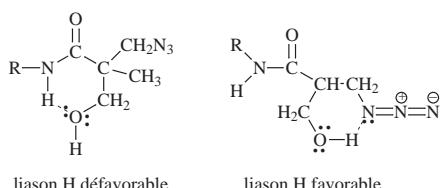


Schéma 2 Hypothèse sur les liaisons hydrogènes intramoléculaires et leur impact sur la réactivité.

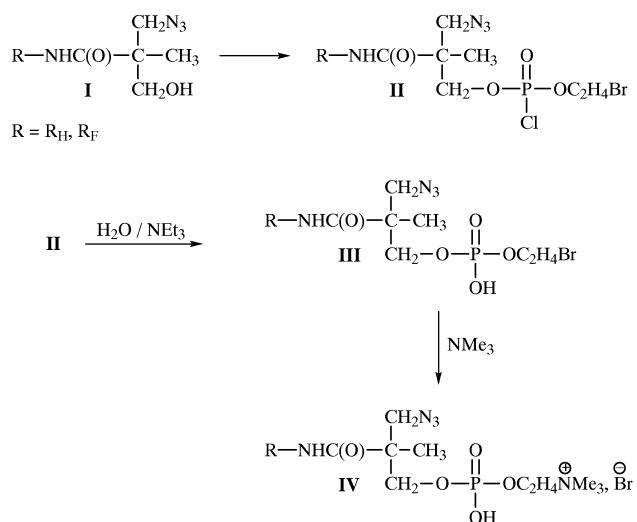


Schéma 3 Principe de la synthèse des produits IV.

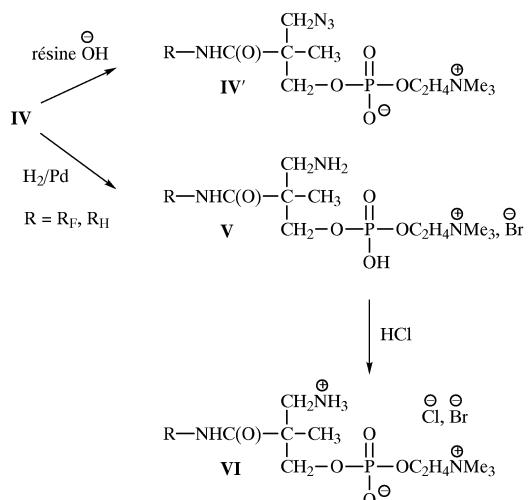
Des problèmes de solubilités pour certains amido alcools dans des démarches identiques de phosphorylation, soit avec le bromoéthyldichlorophosphate soit avec le phospholane, ont été signalés.<sup>20,21</sup> En ce qui concerne nos substrats, nous n'avons pas rencontré de difficultés particulières. Les composés bromés III sont purifiés par chromatographie sur silice avec des rendements raisonnables (45–55% par rapport aux alcools de départ), quelle que soit la nature de la chaîne hydrophobe (voir la partie expérimentale pour plus de détails et l'identification des différents composés).

Nous avons estimé ces résultats comme étant satisfaisants: il faut souligner en effet que l'étape de phosphorylation est souvent peu efficace.<sup>22,23</sup> Nous effectuons un travail systématique pour tenter de mettre au point des méthodologies plus performantes pour cette réaction.<sup>24</sup> La forme zwittérionique de ces molécules est obtenue après traitement par un excès de triméthylamine qui substitue le brome avec des rendements élevés (généralement supérieurs à 85%).

Les produits IV, solubles dans les solvants polaires, précipitent dans la plupart des autres solvants organiques. Ainsi, ils se séparent du milieu réactionnel (chloroforme-acétonitrile) en entraînant avec eux des impuretés, ce qui nécessite leur purification. Elle est effectuée dans un premier temps par recristallisation dans un mélange de deux solvants (méthanol-acétate d'éthyle), puis dans un deuxième temps, par purification par chromatographie sur silice, ce qui permet d'obtenir les dérivés IV avec des rendements satisfaisants (voir la partie expérimentale). En ce qui concerne leur aspect, les azidolysolécithines obtenues sont des produits très pâteux solubles dans l'eau: il n'y a pas de différence marquée pour la solubilité entre les composés hydrogénés et fluorés.

Une hydrogénéation catalytique des azidolysolécithines IV fournit les aminolysolécithines V correspondantes (Schéma 4) avec des rendements excellents (voir la partie expérimentale). Les solubilités dans le méthanol sont suffisantes pour que l'hydrogénéation soit réalisée dans ce solvant et aucune difficulté n'est rencontrée dans cette réduction malgré la présence des diverses fonctions portées par les dérivés IV. Nous avons remplacé les ions bromures par des ions hydroxyles par passage des azotures IV ainsi que les amines V sur une résine d'échange d'anions, préalablement régénérée par une solution de soude (Schéma 4). Aucune perte de produit n'a été constatée et l'échange complet des bromures a été vérifié par un test au nitrate d'argent. Nous avons également traité les dérivés type V par un équivalent de HCl et isolé les sels correspondants VI protonés sur la fonction amine (Schéma 4).

Pour conclure sur la synthèse des analogues de lécithines, nous avons mis au point des méthodologies d'accès à des structures originales sur la base de l'acide 2,2-bis(hydroxy-



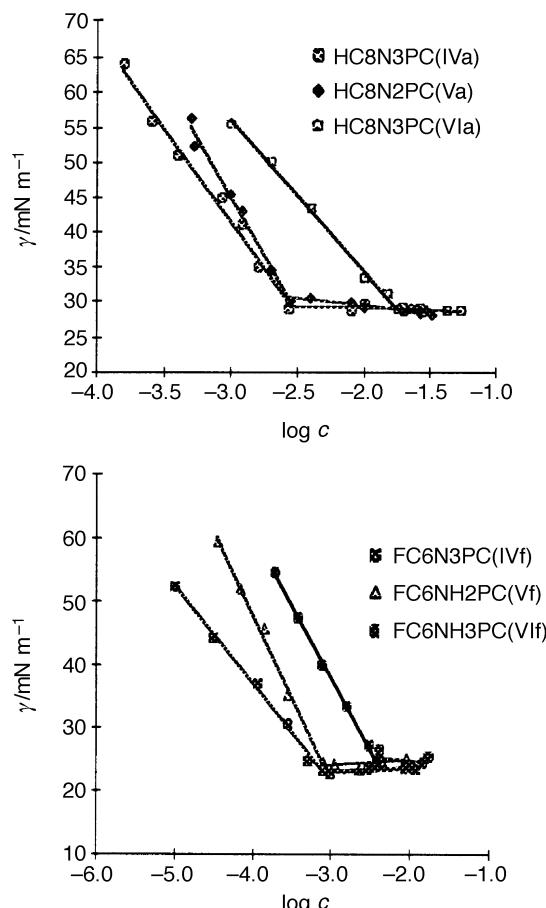
**Schéma 4** Passage à l'amine et au zwitterion pour les dérivés **IV**.

méthyl)propionique. Les réactions mises en jeu sont globalement performantes. Nous avons en particulier observé que le groupement azoture permet d'améliorer sensiblement les rendements de la phosphorylation d'alcools encombrés comportant des fonctions amides. Enfin nous avons pu préparer avec des rendements analogues satisfaisants, des molécules à chaîne perhydrogénées comme perfluorées.

### Propriétés tensioactives

L'étude de la variation de la tension superficielle  $\gamma$  en fonction de la concentration en milieu aqueux de nos analogues de lysolécithines a été effectuée. A titre d'illustration, nous avons reporté les courbes  $\gamma = f(\log C)$  pour les produits **IVa**, **Va**, **Vla** et **IVf**, **Vf**, **Vlf**. Les propriétés de surfaces déduites à partir de ces courbes sont regroupées dans le Tableau 1. Les valeurs de l'excès de surface ( $\Gamma$ ) ont été calculées pour des molécules "neutres" et ioniques ainsi que les surfaces par têtes polaires ( $\sigma$ ) en utilisant les équations de Gibbs.<sup>26</sup>

Nous remarquons une uniformité de comportement pour les différents produits, avec simplement des différences liées à la nature de la chaîne hydrophobe. Les valeurs de  $\gamma_{CMC}$  sont du même ordre pour l'ensemble des dérivés HC8 et HC14 et sont comprises entre 30 et 35 mN m<sup>-1</sup>, des valeurs classiquement obtenues avec les différentes classes de tensioactifs à queue hydrophobe hydrogénée. Les dérivés fluorés (FC6) abaissent cette tension de surface à des valeurs nettement plus basses comme cela est attendu.<sup>27</sup> Nous pouvons remarquer que les dérivés **IV**, portant le groupement azoture, présentent un  $\gamma_{CMC}$  plus faible que les autres dérivés **V** et **VI**. L'azoture apporte une contribution hydrophile moins importante à la molécule par rapport à la fonction amine ou au groupe ammonium. En effet il peut échanger des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau mais globalement de façon moins favorable que les groupes amine ou ammonium. En consé-



**Fig. 1** Courbes  $\gamma$  vs.  $\log C$  pour **IVa**, **Va**, **Vla** et **IVf**, **Vf**, **Vlf**.

quence la fonction azoture agirait en synergie avec la chaîne grasse.

Il faut aussi souligner la différence des pentes avant la concentration micellaire critique (CMC, Fig. 1) entre les produits **IV** et **V**: celles concernant les dérivés **IV** sont plus faible que celles des composés **V**. Ceci entraîne pour les valeurs de l'excès de surface  $\Gamma_{N_3} < \Gamma_{NH_2}$  et entraîne également pour les valeurs de la surface par tête polaire  $\sigma_{N_3} > \sigma_{NH_2}$ . Une interprétation possible de cette observation serait que la partie adjacente à l'azoture "se plie" vers l'interface air-eau (Schéma 5) et donc que la molécule occupe une plus grande surface ( $\sigma_{N_3} > \sigma_{NH_2}$ ). Moins de molécules de tensioactifs seraient nécessaires pour la saturation de l'interface avant la micellisation ( $\Gamma_{N_3} < \Gamma_{NH_2}$ ). Pour ces mêmes produits **IV**, les CMC sont sensiblement identiques à celles des dérivés **V**: le passage du groupement azoture à la fonction amine a peu d'impact sur la solubilité du monomère. Par contre la protonation par HCl (produits **VI**) conduit à une tête polaire ionique justifiant le déplacement des CMC vers des valeurs plus élevées: ceci s'explique par l'augmentation de polarité, apportée par l'ionisation, qui aug-

**Tableau 1** Propriétés de surface des analogues de lysolécithines

Produit	No	$\gamma_{CMC}/\text{mN m}^{-1}$	$\text{CMC}/10^4 \text{ mol L}^{-1}$	$\Gamma/10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$	$\sigma/\text{\AA}^2$
HC8N3PC	<b>IVa</b>	28,7	29,5	0,47	35
HC14N3PC	<b>IVc</b>	37,5	0,38	0,39	43
FC6N3PC	<b>IVf</b>	23,0	7,6	2,8	59
HC8NH2PC	<b>Va</b>	29,1	28	6,4	26
HC14NH2PC	<b>Vc</b>	37,9	0,39	9,4	18
FC6NH2PC	<b>Vf</b>	24,2	7,9	4,7	35
HC8NH3PC	<b>Vla</b>	28,7	180	1,9	87
HC14NH3PC	<b>Vlc</b>	36,4	1,7	1,3	128
FC6NH3PC	<b>Vlf</b>	24,6	38	2,0	83
FC8OPC <sup>25</sup>	—	23,0	1,1	4,0	41

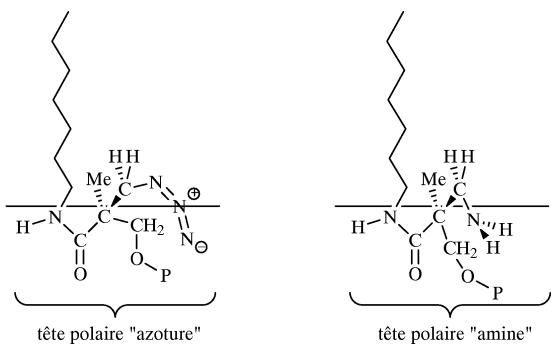


Schéma 5 Interprétation possible des valeurs  $\sigma_{N3} > \sigma_{NH2}$ .

mente la contribution hydrophile et donc la solubilité de la molécule. On peut également noter que les forces répulsives entre les charges positives, portées par les groupes ammonium, défavorisent l'agrégation en systèmes organisés supramoléculaires. La formation de ceux-ci (micelles ou autres organisations) ne se fait qu'à des concentrations plus élevées.

A l'examen du comportement des dérivés HC8 et HC14, nous faisons une constatation de l'effet de la chaîne grasse sur la micellisation et l'activité de surface. Nous observons une diminution de la CMC de l'ordre de 100 pour une hydrophobie majorée de 6 motifs CH<sub>2</sub> entre les produits HC8 (**IVa**, **Va**, **Vla**) et HC14 (**IVc**, **Vc**, **Vlc**). Cette valeur est identique à celle observée pour les tensioactifs anioniques du type sulfate par exemple.<sup>27</sup> Ceci semble indiquer que nos analogues hydrogénés, concernant leur capacité d'agrégation dans l'eau, ont un comportement se rapprochant de ceux de tensioactifs ioniques.<sup>28</sup>

Quant aux produits fluorés FC6 (**IVf**, **Vf**, **Vlf**), leur CMC sont nettement plus faibles que celles des produits HC8 qui comportent le même nombre de carbones dans la chaîne hydrophobe. Ceci est en accord avec la plus forte hydrophobie de ces dérivés. Il a été montré que les CMC des dérivés fluorés sont approximativement égales à celles des dérivés hydrogénés contenant 1,5 à 1,7 fois plus de carbone dans la chaîne hydrophobe.<sup>29,30</sup> Ici les produits hydrogénés qui auraient des valeurs de CMC identiques aux produits FC6 seraient en HC11 ou HC12. Remarquons que les valeurs observées pour les dérivés FC6 (**IVf**, **Vf**, **Vlf**) sont comprises entre les valeurs de CMC des dérivés HC8 et de HC14.

Nous pouvons comparer nos valeurs de CMC de ces dérivés fluorés FC6 avec des phosphatidylcholines à chaîne perfluorée décrites dans la littérature<sup>25</sup> dont la structure est présentée sur le Schéma 6. Les chaînes perfluorées de ces dérivés comportent 8 groupes CF<sub>2</sub> et 2 groupes CH<sub>2</sub>. Les valeurs de CMC correspondantes sont environ 10 fois plus faibles que celles obtenues avec les composés étudiés dans ce travail, dont la chaîne comporte 2 groupes CF<sub>2</sub> en moins. On aurait pu s'attendre à un écart plus important puisque l'étude réalisée avec une série de tensioactifs fluorés comportant une tête polaire éthoxylée beaucoup moins volumineuse montre que l'addition d'un groupe CF<sub>2</sub> conduit à une CMC 100 fois plus faible.<sup>31,32</sup> Il semble que les propriétés hydrophobes de la chaîne fluorée puissent être modifiées avec la structure de la tête polaire (volume, polarité, etc.). L'existence de fortes interactions agirait par conséquent sur les propriétés d'agrégation. Effectivement, les données concernant les CMC de tensioactifs fluorés ioniques, de Kunieda et Shinoda<sup>33</sup> comme celles rassemblées dans l'ouvrage de Kiss<sup>34</sup> montrent qu'il est difficile d'établir des corrélations applicables de manière générale. La variation de la CMC en fonction de la longueur de la chaîne

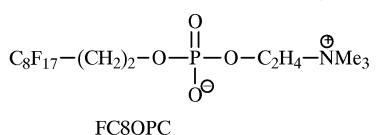


Schéma 6 Analogue fluoré de Krafft.<sup>25</sup>

hydrophobe dépend fortement de la nature de la partie hydrophile.

Pour conclure, il apparaît que nos analogues de lysolécithines ont un comportement de tensioactifs relativement classique, en tout cas très semblable à celui des lysolécithines décrites dans la littérature. Comme cela est attendu, la protonation de la fonction amine restante fait croître la solubilité du monomère. Cela se traduit par des valeurs de CMC nettement plus élevées.

### Impact sur une culture cellulaire

Nous avons étudié les effets de quelques uns des analogues de lysolécithines sur des cellules en culture, des lymphoblastes U937. Les principales observations sont présentées dans le Tableau 2. La viabilité cellulaire, évaluée par test d'exclusion au bleu trypan, montre que les analogues de lysolécithines comportant un groupement azoture (type **IV**) provoquent la mort de la majorité des cellules pour des concentrations supérieures à  $5 \times 10^{-4}$  M. Les composés type **V**, comportant un groupement amino, ont un effet analogue pour les concentrations supérieures à  $7 \times 10^{-4}$  M.

Nous avons étudié avec plus de précision la nature des effets produits sur les cellules en utilisant des colorations spécifiques permettant de distinguer respectivement la mort par nécrose (phénomène de destruction passif)<sup>35</sup> et la mort cellulaire par apoptose (phénomène biologique d'autodestruction).<sup>36,37</sup> L'hypothèse qui semble raisonnable est que la nécrose résulte d'effets "mécaniques". Il y aurait pénétration des analogues de lécithines dans la membrane cellulaire<sup>38,39</sup> et solubilisation des phospholipides membranaires avec formation de micelles mixtes: la membrane est détruite par cet effet "déturgent", il y a mort cellulaire par nécrose.

Nous avons effectué des observations, pour des concentrations inférieures à  $2 \times 10^{-4}$  M, en colorant les cellules avec le bromure d'éthidium et l'acridine orange,<sup>40</sup> permettant d'observer la mort soit par nécrose soit par apoptose.<sup>37</sup> La pénétration de la membrane cellulaire par les tensioactifs provoque une désorganisation, l'impact sur la cellule peut entraîner des réponses physiologiques aboutissant à l'apoptose; la nécrose, elle, n'apparaît que si la quantité de produit est suffisante pour amener la formation de micelles mixtes. Nous avons observé qu'un nombre important de cellules meurent par apoptose à partir de  $5 \times 10^{-5}$  M. Le surfactif, bien qu'en trop faible quantité pour solubiliser les phospholipides pour former des micelles mixtes, resterait et perturberait suffisamment l'organisation de la membrane, aboutissant au déclenchement de la mort programmée.

Cette hypothèse nous semble corroborée par le fait que les dérivés perfluorés ne provoquent un pourcentage de nécrose important que pour des concentrations supérieures à celles des composés hydrogénés de l'ordre d'un facteur 10. Par contre ils provoquent un pourcentage d'apoptose plus important à des concentrations comparables: à  $10^{-4}$  M on observe environ 50% de viabilité pour **IVe** et pour **IVg**. Cependant les rapports de cellules mortes par nécrose et celles mortes par apoptose sont sensiblement différents: pour le produit perhydrogéné **IVe** il y a autant de nécrose (~25%) que d'apoptose (~25%) alors que pour le dérivé perfluoré **IVg** l'apoptose est

Tableau 2 Impacts sur culture cellulaire

Tensioactifs	$C/\text{mol L}^{-1}$	Mort cellulaire	Nécrose	Apoptose
<b>IV</b> hydrogénés	$\geq 5 \times 10^{-4}$	≈ 100%	—	—
<b>IV</b> fluorés	$\geq 10^{-3}$	≈ 100%	—	—
<b>IVe</b>	$10^{-4}$	≈ 50%	≈ 25%	≈ 25%
<b>IVg</b>	$10^{-4}$	≈ 50%	≈ 10%	≈ 40%
<b>IV</b> et <b>V</b>	$5 \times 10^{-5}$	> 20%	—	—

nettement plus importante (~40%) que la nécrose (~10%). Le fait que l'analogue de lysolécithine hydrogénée **IVe** ait un impact différent de celui de l'analogue fluoré **IVg** est en accord avec l'idée d'interactions avec les molécules de la membrane cellulaire différentes. En tenant compte de la lipophobie des chaînes fluorées, on s'attend à ce que les lipides membranaires forment plus facilement des micelles mixtes avec des composés perhydrogénés qu'avec des perfluorés. Les résultats expérimentaux sont globalement en accord avec cette hypothèse.

Pour conclure, les effets sur culture de cellules semblent essentiellement liés à la nature amphipathique des lysolécithines et à leurs analogies structurales avec les phospholipides membranaires. Tous nos analogues structuraux sont toxiques pour les cellules à des concentrations comparables et provoquent la mort cellulaire tout d'abord par apoptose puis la nécrose domine aux concentrations plus élevées.

## Conclusions

Les analogues de lysolécithines basés sur l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique ont été obtenus par mise au point de méthodologies adaptées aux structures recherchées avec des rendements globalement satisfaisants. Il faut souligner les difficultés de la réaction de phosphorylation sur un alcool comportant d'autres fonctions comme des esters ou des amides. Ce problème a déjà été signalé par plusieurs auteurs.<sup>23,24</sup> Si les résultats de phosphorylation, avec la méthodologie utilisée, sont globalement corrects, nous poursuivons les travaux pour rechercher des méthodologies plus performantes. Les propriétés tensioactives des produits préparés montrent qu'ils présentent un comportement analogue à celui des lysolécithines naturelles. Les CMC sont à des valeurs comparables. Pour les capacités d'agrégations en systèmes organisés, les relations entre les différents produits, pour lesquels on fait varier la chaîne hydrophobe, sont comparables aux comportements des dérivés ioniques. Pour le comportement vis à vis d'une culture de cellules, nous avons observé que tous les produits étudiés sont toxiques, la mort cellulaire intervenant soit par apoptose soit par nécrose. Les dérivés fluorés présentent une toxicité différente de celle des dérivés hydrogénés, cela semble en relation avec une pénétration membranaire qui se ferait différemment. L'oléophobie des chaînes perfluorées pourrait être à l'origine de cette différence de comportement.

## Partie expérimentale

Les spectres RMN du proton (<sup>1</sup>H), du carbone (<sup>13</sup>C) et du phosphore (<sup>31</sup>P) ont été enregistrés, généralement en solution dans CDCl<sub>3</sub>, sur un spectromètre Bruker AM 400 ou AC 250. Les déplacements chimiques δ sont reportés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) en référence interne pour les spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C et par rapport à H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en référence externe pour les spectres de <sup>31</sup>P à 250 MHz. Les spectres IR sont enregistrés sur des appareils Perkin–Elmer 580D ou 1600 FTIR.

Tous les solvants sont de qualité "anhydre" et sont utilisés sans autre purification excepté le tetrahydrofurane (THF) qui est distillé sur benzophénone-sodium. Le déroulement des réactions et la pureté des produits sont évalués par CCM sur silice (Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>), l'éluant étant généralement l'acétate d'éthyle (AcOEt) ou un mélange acétate d'éthyle-méthanol 9/1. Les purifications sont effectuées par flash chromatographie sur colonne de gel de silice avec les mêmes éluants. Les points de fusion sont déterminés avec un appareil électrothermique (Electrothermal) et ne sont pas corrigés. Les indices de réfraction *n*<sub>D</sub> ont été mesurés à 20 °C sur un réfractomètre d'Abbe. Les analyses HPLC ont été effectuées sur un Kontron Analytical System sur une colonne chromasyl C4 (1, 6 × 250 mm) en mode gradient de 70% éluant A–30% éluant **B** à 10% éluant A–90% éluant **B** en 30 min. Les éluants utilisés sont: **A** = eau–0,1% acide trifluoroacétique et **B** = 80%

acétonitrile–20% eau–0,09% acide trifluoroacétique. La pression est de 1800 psi pour une vitesse d'élution de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Les produits sont détectés par UV à 210 nm. Les temps de rétention sont donnés en min. Les microanalyses qui ont été effectuées sont en accord avec les structures.

## Préparations des diesters de 2-bromoéthanol et de β-azido-γ'-monoalkylamido alcool de l'acide phosphorique de type **III**

Dans un réacteur muni d'un système d'agitation, contenant 5 × 10<sup>-3</sup> moles de OPCI<sub>3</sub> dans le THF, on introduit à l'aide d'une ampoule à brome 1 équiv. de bromoéthanol et 1 équiv. de NEt<sub>3</sub> dans une solution de THF. L'addition se fait à froid sous N<sub>2</sub>. Trois heures plus tard 1 équiv. de 2-azidomethyl-3-hydroxy-2-méthylpropionamide d'alkyle et 1 équiv. de NEt<sub>3</sub> dans le THF sont ajoutés dans le mélange. On laisse agiter à température ambiante toute la nuit. Par la suite 10 mL d'eau sont versés dans le réacteur et le pH est réglé à 9–10 avec quelques mL de NEt<sub>3</sub>. Après 3 à 4 h, on extrait la phase organique à l'AcOEt (3 × 120 mL). Le produit type **III** obtenu est purifié par une chromatographie sur colonne de silice (AcOEt–EtOH, de 100/0 à 50/50). Les rendements et les valeurs de R<sub>f</sub> sont donnés dans le Tableau 3.

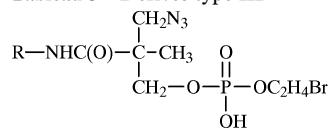
**Caractéristiques spectrales générales.** IR: ν<sub>N<sub>3</sub></sub> 2100, ν<sub>NC(O)</sub> 1640, ν<sub>P=O</sub> 1260 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>) δ: dérivés perhydrogénés CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sup>d</sup>NH<sup>e</sup>C(O)C(Cl<sup>f</sup>)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sup>b</sup>OP(O)(OH)OCH<sup>i</sup>CH<sub>2</sub>Br: 0,9 (t, CH<sup>a</sup>); 1,1 (s, CH<sup>f</sup>); 1,3 [m, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]; 1,6 (m, CH<sup>c</sup>); 3,2 (m, CH<sup>d</sup>); 3,5–3,7 (m, CH<sup>e</sup> et CH<sup>j</sup>); 4,2 (m, CH<sup>b</sup>); 4,4 (m, CH<sup>i</sup>); 7,2 (m, NH<sup>g</sup>). Dérivés perfluorés R<sub>F</sub>CH<sub>2</sub>CH<sup>d</sup>...: 2,4 (m, CH<sup>c</sup>); 3,5–3,7 (m, CH<sup>e</sup>); les autres groupes de protons présentent les mêmes caractéristiques que ceux des dérivés perhydrogénés ci-dessus. RMN <sup>31</sup>P δ: voir Tableau 3.

## Préparation des β-azido-γ'-monoalkylamidophosphocholines de type **IV**

Le composé bromé **III** récupéré dans l'expérience précédente est dilué dans une quantité minimale de CHCl<sub>3</sub>. De l'acetonitrile (100 mL) est ajouté dans le réacteur avec un gros excès de N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> anhydre. Le mélange est chauffé doucement à 50 °C et laissé sous agitation à cette température pendant 16 h. Le précipité formé est filtré et purifié par recristallisation dans MeOH–AcOEt. Une purification supplémentaire par chromatographie sur silice est nécessaire avec AcOEt–MeOH (gradient 100/0 à 0/100). Les rendements et les valeurs de R<sub>f</sub> sont donnés dans le Tableau 4.

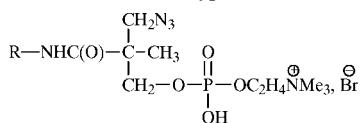
**Caractéristiques spectrales générales.** IR: ν<sub>N<sub>3</sub></sub> 2100; ν<sub>NC(O)</sub> 1640; ν<sub>P=O</sub> 1260 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>–CD<sub>3</sub>OD) δ: dérivés perhydrogénés CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sup>d</sup>NH<sup>e</sup>C(O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>–

Tableau 3 Dérivés type **III**



III	R	MM	Rdt/%	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	<sup>31</sup> P RMN/δ
<b>a</b>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	457,30	50	0,3	-2,5
<b>b</b>	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> <sup>b</sup>	485,35	45	0,3	-1,8
<b>c</b>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	513,40	45	0,2	-1,7
<b>d</b>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> <sup>b</sup>	541,45	40	0,3	-2,8
<b>e</b>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	569,50	55	0,3	-2,5
<b>f</b>	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> <sup>b</sup>	691,18	52	0,4	-2,7
<b>g</b>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> <sup>b</sup>	791,19	47	0,3	-2,1

<sup>a</sup> AcOEt–MeOH, 80 : 20. <sup>b</sup> Microanalyses en accord avec la structure.

**Tableau 4** Dérivés type IV

IV	R	MM	Rdt/%	$R_f^a$	$^{31}\text{P}$ RMN/ $\delta$
a: HC8N3PC	$\text{C}_8\text{H}_{17}^b$	516,41	80	0,2	-0,4
b: HC10N3PC	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	544,46	85	0,1	-0,5
c: HC12N3PC	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}$	572,52	70	0,2	0,3
d: HC14N3PC	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}^b$	600,57	75	0,2	0,6
e: HC16N3PC	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}^b$	628,63	88	0,2	-1,3
f: FC6N3PC	$\text{C}_6\text{F}_{13}\text{C}_2\text{H}_4^b$	750,29	79	0,3	-0,4
g: FC8N3PC	$\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_2\text{H}_4$	850,30	70	0,3	-0,6

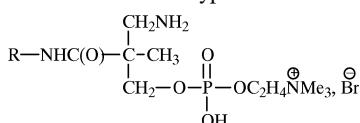
<sup>a</sup> MeOH. <sup>b</sup> Microanalyses en accord avec la structure.

$(\text{CH}_2\text{N}_3)\text{CH}_2\text{OP(O)(OH)OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ,  $\text{Br}^-$ : 0,9 (t,  $\text{CH}_3$ ); 1,1 (s,  $\text{CH}_3$ ); 1,3 [m,  $(\text{CH}_3)_n$ ]; 1,6 (m,  $\text{CH}_2$ ); 3,2 [s,  $(\text{CH}_3)_3$ ]; 3,3 (m,  $\text{CH}_2$ ); 3,5 (m,  $\text{CH}_2$ ); 3,6–3,7 (m,  $\text{CH}_2$ ); 3,9 (2 d, système AB,  $\text{CH}_2$ ); 4,2–4,3 (m,  $\text{CH}_2$ ); 7,2 (m, NH<sup>o</sup>). Dérivés perfluorés  $\text{R}_\text{F}\text{CH}_2'\text{CH}_2^d$  ...: 2,4 (m,  $\text{CH}_2'$ ); 35–3,7 (m,  $\text{CH}_2^d$ ); les autres groupes de protons présentent les mêmes caractéristiques que ceux des dérivés perhydrogénés ci-dessus. RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$ :  $\text{C}^\text{a}\text{H}_3(\text{C}^\text{b}\text{H}_2)_n\text{C}^\text{c}\text{H}_2\text{C}^\text{d}\text{H}_2\text{NHC(O)C}^\text{e}(\text{C}^\text{f}\text{H}_3)(\text{C}^\text{g}\text{H}_2\text{N}_3)$ – $\text{C}^\text{h}\text{H}_2\text{OP(O)(OH)C}^\text{i}\text{H}_2\text{C}^\text{j}\text{H}_2\text{N}^+(\text{C}^\text{k}\text{H}_3)_3$ ,  $\text{Br}^-$ : 13,9 ( $\text{C}^\text{a}\text{H}_3$ ); 18,5 ( $\text{C}^\text{f}\text{H}_3$ ); 22,4–29,4 ( $\text{C}^\text{b}\text{H}_2$ )<sub>n</sub>; 31,4 ( $\text{C}^\text{i}\text{H}_2$ ); 38,5 ( $\text{C}^\text{d}\text{H}_2$ ); 47,3 ( $\text{C}^\text{g}$ ); 54,0 ( $\text{C}^\text{k}\text{H}_3$ ); 55,5 ( $\text{C}^\text{h}\text{H}_2\text{N}_3$ ); 59,1 ( $\text{C}^\text{j}\text{H}_2$ ); 65,9 ( $\text{C}^\text{h}\text{H}_2$ ); 67,5 ( $\text{C}^\text{g}\text{H}_2$ ); 172,9 ( $\text{C}^\text{e}$ ). RMN  $^{31}\text{P}$   $\delta$ : voir Tableau 4. Microanalyse: pour  $\text{R} = \text{C}_{16}\text{H}_{33}$  trouvée (calculée): C% 49,8 (49,4); H% 8,8 (9,2); N% 11,1 (10,8).

### Hydrogénéation catalytique: préparation des $\beta$ -amino- $\gamma'$ -monoalkylamido phosphocholines de type V

Dans un réacteur d'hydrogénéation on met l'azidolysolécithine récupérée en solution dans du méthanol (70 mL). Une quantité catalytique de Pd–C (10%) est ajoutée. L'ensemble se met sous pression d'hydrogène (70 bars) pendant 4 h. Par la suite on filtre le mélange sur cérite et le solvant est évaporé sous pression réduite. Les rendements et les valeurs de  $R_f$  sont donnés dans le Tableau 5.

**Caractéristiques spectrales générales.** IR:  $\nu_{\text{OH}}$  et  $\nu_{\text{NH}_2}$  3650–3200;  $\nu_{\text{NC(O)}}$  1640;  $\nu_{\text{P=O}}$  1255  $\text{cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : dérivés perhydrogénés  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+\text{C(O)C(CH}_3^i$ – $(\text{CH}_2\text{NH}_2^h)\text{CH}_2\text{OP(O)(OH)OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ,  $\text{Br}^-$ : 0,9 (t,  $\text{CH}_3$ ); 1,1 (s,  $\text{CH}_3$ ); 1,3 [m,  $(\text{CH}_3)_n$ ]; 1,6 (m,  $\text{CH}_2$ ); 3,2 [s,  $\text{NH}_2^h$  et  $(\text{CH}_3)_3$ ]; 3,3 (m,  $\text{CH}_2^d$  et  $\text{CH}_2^g$ ); 3,5 (m,  $\text{CH}_2^h$ ); 3,9 (2 d, système AB,  $\text{CH}_2$ ); 4,2 (m,  $\text{CH}_2$ ); 7,2 (m, NH<sup>o</sup>). Dérivés perfluorés  $\text{R}_\text{F}\text{CH}_2'\text{CH}_2^d$  ...: 2,3 (m,  $\text{CH}_2'$ ); 3,6–3,8 (m,  $\text{CH}_2^d$ ); les

**Tableau 5** Dérivés type V

V	R	MM	Rdt/%	$R_f^a$
a: HC8NH2PC	$\text{C}_8\text{H}_{17}$	490,41	85	0,2
b: HC10NH2PC	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	518,47	82	0,2
c: HC12NH2PC	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}^b$	546,52	84	0,1
d: HC14NH2PC	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}$	574,57	89	0,2
e: HC16NH2PC	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}^b$	602,63	90	0,2
f: FC6NH2PC	$\text{C}_6\text{F}_{13}\text{C}_2\text{H}_4^b$	724,29	80	0,1
g: FC8NH2PC	$\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_2\text{H}_4$	824,31	85	0,2

<sup>a</sup> MeOH. <sup>b</sup> Microanalyses en accord avec la structure.

autres groupes de protons présentent les mêmes caractéristiques que ceux des dérivés perhydrogénés homologues.

### Tension superficielle

Les mesures de tension superficielle ont été réalisées par la méthode de Wilhelmy à l'aide d'un tensiomètre digital (Kruss K10ST). La tension superficielle  $\gamma$  est exprimée en  $\text{mN m}^{-1}$  et elle est la moyenne de trois mesures successives après avoir laissé la solution s'équilibrer, à 20 °C. On considère que les valeurs rapportées sont dans une fourchette d'erreur de 0,5  $\text{mN m}^{-1}$ . Les solutions sont préparées par dilution à partir d'une solution mère en utilisant de l'eau distillée.

### Biologie

**Les cultures.** Les cellules utilisées sont des lymphoblastes U937 (European Cell Collection of Animal Cells in the UK) cultivées en milieu RPMI 1640, avec 2 mM de glutamine et 10 à 20% (v/v) de SVF (serum de veau foetal), à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Les principaux constituants du milieu de culture RPMI sont fournis sous forme d'une dose de poudre à dissoudre dans 5 L d'eau bidistillée. A cette solution, on ajoute 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10 g de glucose (utilisée comme nutriment), 2,5 g de pénicilline G à 100 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 2,5 mL de streptomycine à 100 mg  $\text{mL}^{-1}$ , et de la glutamine à 2 mM. Ce milieu est supplémenté avec 5% (v/v) de SVF (apport de facteurs de croissance, de protéines, d'inhibiteurs de protéases, etc.). Le tampon PBS (sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) est composé de  $\text{NaCl}$  à 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 1,5 mM,  $\text{KCl}$  à 2,7 mM, et de D-glucose à 5 mM; ce tampon à  $\text{pH} = 7,4$  permet de maintenir l'isotonie du milieu.

**Les colorants.** Le bleu trypan penètre dans toutes les cellules dont la membrane plasmique est détériorée. Elles se trouveront alors colorées en bleu. On compte les cellules vivantes non colorées. Le mélange bromure d'éthidium-acridine orange 1/1 est réalisé à partir d'une solution de chaque substance à 100 g  $\text{mL}^{-1}$  dans du tampon PBS. La technique utilisée est dérivée de celle décrite par Mercille et Massie.<sup>40</sup> L'observation a été réalisée avec un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss, Strasbourg, France) avec une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 450–490 nm.

Le bromure d'éthidium, comme le bleu trypan, pénètre uniquement dans les cellules dont la membrane plasmique est altérée. Les cellules observées sous une lumière de  $\lambda$  de 450–490 nm émettent une lumière fluorescente rouge intense; une cellule morte présente une chromatine orange vif et son cytoplasme apparaîtra rouge foncé. L'acridine orange pénètre dans toutes les cellules (vivantes ou non). Les cellules émettent une fluorescence verte masquée par la fluorescence rouge due au

bromure d'éthidium pour les cellules mortes, ce qui permet de bien les différencier des cellules vivantes.

**Mode opératoire.** Pour chaque produit, des solutions mères à  $2 \times 10^{-3}$  M dans l'éthanol ont été utilisées. Des solutions aux concentrations désirées ont été préparées en complétant à 2,5 mL avec du PBS. Lors des manipulations on utilise un témoin qui ne contient que de l'éthanol et du PBS. Les différentes étapes de l'étude sont les suivantes: (i) centrifugation de la suspension cellulaire, à 1000 tours min<sup>-1</sup> pendant 5 min; (ii) élimination du surnageant, remise en suspension des cellules dans du PBS et comptage des cellules; (iii) préparation de suspension à  $5 \times 10^{-5}$  cellules mL<sup>-1</sup> dans du PBS. Dans des tubes stériles, mettre 1,8 mL de chaque solution de surfactif. Compléter à 2 mL par 200 µL de suspension cellulaire. Incuber 1 h dans l'étuve à 37°C; récupérer les cellules par une centrifugation de 5 min à 1000 tours min<sup>-1</sup>; éliminer le surnageant, le remplacer par 2 mL de milieu de culture, homogénéiser, incuber 2 h à l'étuve à 37°C; comptage des cellules après coloration avec le mélange bromure d'éthidium-acridine orange.

## Remerciements

Nous remercions le Pr J. J. Delpuech et le Dr L. Rodehäuser (Université de Nancy 1) ainsi que le Dr M. R. Infante (Barcelone) pour de fructueuses discussions sur ce travail. Les produits fluorés de départ nous ont été aimablement fournis par la Société Elf-Atochem (Dr P. Durual).

## Références

- 1 C. Jia et A. H. Haines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1993, 2521.
- 2 K. L. Meyer, C. J. Marasco, Jr., S. L. Morris-Natschke, K. S. Ishaq et C. Piantadosi, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 1377.
- 3 F. Choquet, *Info Chimie Magazine*, 1998, **399**, 91.
- 4 H. Winkler et A. D. Smith, *Arch. Pharm. Exp. Path.*, 1968, **261**, 379.
- 5 T. Kitagawa, K. Inque et S. Nojima, *J. Biochem.*, 1976, **79**, 1123.
- 6 V. Emmanouil, M. El Ghoul, C. André-Barres, B. Guidetti, I. Rico-Lattes et A. Lattes, *Langmuir*, 1998, **14**, 5389; I. Rico-Lattes et A. Lattes, *Colloids Surf.*, 1997, **123/124**, 37 et références citées.
- 7 A. L. Lehninger, *Biochimie, Bases Moléculaires de la Structure et des Fonctions Cellulaires*, Flammarion Ed., Paris, 2nd edn., 1979, pp. 282–290.
- 8 L. Molina, D. Papadopoulos et C. Selve, *New J. Chem.*, 1995, **19**, 813.
- 9 C. Selve, C. Delestre, S. Achilefu, M. Maugras et F. Attiou, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, **13**, 863.
- 10 L. Molina, C. Gérardin-Charbonnier, C. Selve, M. J. Stébé, M. Maugras, M. R. Infante, J. P. Lluis-Tores, M. A. Manresa et P. Vinardell, *New J. Chem.*, 1997, **21**, 1027.
- 11 M. Allouch, M. R. Infante, J. Seguer, M. J. Stébé et C. Selve, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 87.
- 12 J. Seguer, C. Selve, M. Allouch et M. R. Infante, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 79.
- 13 D. Papadopoulos, Thèse, Université Henri Poincaré-Nancy 1, France, 1996.
- 14 E. F. V. Scriven et K. Turbull, *Chem. Rev.*, 1988, **88**, 297.
- 15 E. De Clercq, *La Recherche*, 1992, **241**, 288.
- 16 R. Polt, L. Szabö, J. Treiberg, Y. Li et V. J. Hruby, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10249.
- 17 N. T. Thuong et P. Chabrier, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1974, **3/4**, 667.
- 18 A. R. Hirt et R. Berchtold, *Pharm. Acta Helv.*, 1958, **33**, 349.
- 19 C. Santaella, P. Vierling et J. G. Riess, *New J. Chem.*, 1991, **15**, 685.
- 20 L. Clary, Thèse, Université de Nice, France, 1996.
- 21 J. R. Surles, S. Morris-Natschke et M. H. Piantadosi, *Lipids*, 1993, **28**, 55.
- 22 P. P. M. Bonsen, G. J. Burbach-Westerhuis, G. H. De Haas et L. L. M. Van Deenen, *Chem. Phys. Lipids*, 1972, **8**, 199; M. L. Garcia, J. Pasqual, G. Gonzales, A. Palomer, M. Cabre, A. Andreu, D. Mauleon et G. Carganico, *Synth. Commun.*, 1993, **23**, 3165.
- 23 M. H. Marx, C. Piantadosi, A. Noseda, L. W. Daniel et E. J. Modest, *J. Med. Chem.*, 1998, **31**, 858.
- 24 P. Even, Rapport de DEA, Université Henri Poincaré-Nancy 1, France, 1998.
- 25 M. P. Kraft, J. P. Rolland, P. Vierling et J. G. Riess, *New J. Chem.*, 1990, **14**, 869.
- 26 Y. Moroë, E. Pramauro, M. Grätzel, E. Pelizzetti et P. Tundo, *J. Colloid Interface Sci.*, 1979, **69**, 341 et références citées.
- 27 K. R. H. Ottewill, dans *Surfactants*, ed. T. F. Tadros, Academic Press Inc, London, 1994, pp. 1–18.
- 28 *Amphoteric Surfactants* (Surface Science Series 12), eds. B. R. Bluestein et C. L. Hilton, Marcel Dekker, New York, 1982.
- 29 K. Shinoda, M. Hato et T. Hayashi, *J. Phys. Chem.*, 1972, **76**, 909.
- 30 J. C. Ravey et M. J. Stébé, *Colloid Surf. A, Physicochem. Eng. Aspects*, 1994, **84**, 11.
- 31 G. Mathis, P. Leempoel, J. C. Ravey, C. Selve et J. J. Delpuech, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6162.
- 32 C. Selve, J. C. Ravey, M. J. Stébé, C. El Moujahid, E. M. Moumni et J. J. Delpuech, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 411.
- 33 H. Kunieda et K. Shinoda, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 2468.
- 34 E. Kiss, *Fluorinated Surfactants, Synthesis, Properties, Applications*, Marcel Dekker, New York, 1994, ch. 4, pp. 94–161 et ch. 6, pp. 191–263.
- 35 H. F. Smyth, Jr. et J. C. Calandra, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1969, **14**, 315; M. Maugras, J. F. Stoltz, C. Selve, E. M. Moumni et J. J. Delpuech, *Innov. Technol. Biol. Méd.*, 1989, **10**, 45 et *ibid.*, 1990, **11**, 684.
- 36 J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie et A. R. Curie, *Br. J. Cancer*, 1972, **26**, 239.
- 37 R. W. Y. Hung et A. W. Chow, *Can. J. Infect. Dis.*, 1997, **8**, 103.
- 38 D. Lichtenberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **821**, 470.
- 39 J. A. Lucy, *Nature (London)*, 1970, **22**, 815.
- 40 S. Mercille et B. Massie, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **44**, 1140.

Paper 9/00678H