



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

1996

ECOLE DOCTORALE " BIOLOGIE ET SANTE "

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 5 Juillet 1996

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY 1
Mention Sciences du Médicament

par

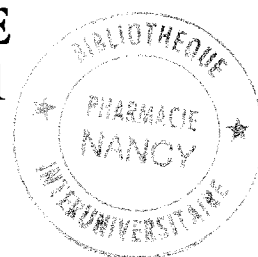
SALLAS Florence

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de
Métabolisme du Médicament et Pharmacologie Clinique

**METHODOLOGIES DE FONCTIONNALISATION DIRECTE, ETUDE
STRUCTURALE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE NOUVEAUX
DERIVES DE CYCLODEXTRINES.**

MEMBRES DU JURY

Juges : H. DRIGUEZ (Directeur de Recherches, CNRS, GRENOBLE)
C. FINANCE (Professeur, UHP, NANCY 1)
A. MARSURA (Professeur, UHP, NANCY 1)
Rapporteurs : A.W. COLEMAN (Directeur de Recherches, CNRS, LYON)
I. PINTER (Professeur, Institut de Chimie, BUDAPEST)
Invité : B. RIHN (Directeur de Recherches, INRS, Vandoeuvre
lès NANCY)

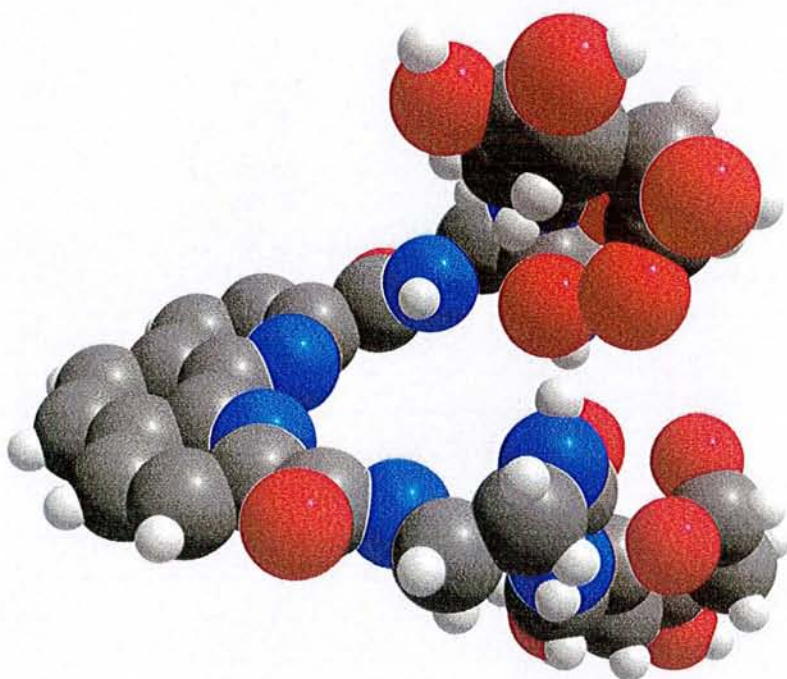


104 026987 2

Ph N96110

Double

*Méthodologies de Fonctionnalisation directe,
Etude structurale et physico-chimique
de nouveaux Dérivés de Cyclodextrines.*



Florence Sallas

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON
Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M^{le} BESSON Suzanne
M^{le} GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey
M. BAGREL Alain
M^{le} BATT Anne Marie
M. BLOCK Jean Claude
M. BONALY Roger
Mme FINANCE Chantal
M^{le} GALTEAU Marie Madeleine
M. HENRY Max
M. HOFFMAN Maurice
M. JACQUE Michel
M. KERGOSIEN Yannick
M. LABRUDE Pierre
M. LALLOZ Lucien
M. LECTARD Pierre
M. LEMAY René
M. LOPPINET Vincent
M. MAINCENT Philippe
M. MARSURA Alain
M. MARTIN Jean Armand
M. MORTIER François
M. NICOLAS Alain
Mme SCHWARTZBROD Janine
M. SCHWARTZBROD Louis
M. SIEST Gérard
M. VIGNERON Claude

Pharmacodynamie
Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Toxicologie
Santé et Environnement
Biochimie microbienne
Microbiologie moléculaire
Biochimie
Biologie végétale
Pharmacie clinique
Pharmacodynamie
Biophysique - Mathématiques -
Physiologie
Chimie organique
Biologie végétale et Cryptogamie
Droit et économie pharmaceutique
Chimie thérapeutique
Pharmacie galénique
Chimie thérapeutique
Chimie minérale et Minéralogie
Pharmacognosie
Chimie analytique et Bromatologie
Bactériologie - Parasitologie
Virologie - Immunologie
Chimie Biologique
Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M. CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. COLLIN Jean François	Pôle européen-
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mme FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M. LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDICKAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

Ce travail a été réalisé au sein du GEVSM sous la direction du Pr. Marsura que je tiens à remercier d'avoir bien voulu m'accueillir dans son équipe de recherches.

Je remercie Madame Chantal Finance et Messieurs Anthony Coleman, Istvan Pinter, Hugues Driguez, Bernard Ribn et Alain Marsura d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie aussi tous ceux, qui, chacun à leur façon, ont participé à la concrétisation de ce travail. Je ne les citerai pas pour n'en oublier aucun. Je suis sûre qu'ils se reconnaîtront.

Prenez intérêt, je vous en conjure, à ces demeures sacrées que l'on désigne du nom expressif de laboratoires. Demandez qu'on les multiplie et qu'on les ouvre. Ce sont les temples de l'avenir, de la richesse et du bien-être. C'est là que l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure.

Louis Pasteur

Ce que nous savons est le grand obstacle à l'acquisition de ce que nous ne savons pas.

Claude Bernard

Sommaire

Sommaire

Objectifs de Recherche	1
-------------------------------	---

Introduction	3
---------------------	---

• Définition et caractéristiques	3
• Nomenclature	4
• Structure	4
• Propriétés	5
• Applications diverses	7

<u>Partie 1</u> : Etude bibliographique: Méthodologies de fonctionnalisation des CDs :	8
---	---

Avant-propos	8
---------------------	---

<i>Méthodologies de fonctionnalisation des fonctions hydroxyles primaires</i>	8
---	---

I- Sulfonylations	8
--------------------------	---

1- Monotosylation	8
2- Monomésylation	10
3- Pertosylation et permésylation	11
4- Sulfonylations régiosélectives	13
5- CDs "chapeautées"	14

II- Azidation et amination	17
-----------------------------------	----

1- Mono-azidation et mono-amination	17
2- Perazidation et peramination	23
3- Azidation et amination régiosélectives	29
4- Autres réactions d'amination	29

III- Halogénéation	31
1- Mono-halogénéation	31
2- Per-halogénéation	32
IV- Oxydation et carboxylation	36
1- Oxydation	36
2- Carboxylation	38
V- CDs sulfatées et phosphorylées	40
VI- Mercapto-cyclodextrines	42
VII- Deshydratation et réduction des CDs	43
1- Déshydratation	43
2- Réduction des CDs : Obtention des 6-déoxy-CDs	44
VIII- Silylation et tritylation	45
1- Silylation	45
2- Tritylation	46
IX- Carbamoylation et carbonatation	47
<i>Méthodologies de fonctionnalisation de la face des hydroxyles secondaires</i>	
	51
I- Fonctionnalisation à partir des CDs natives	52
1- Sulfonation et époxydation	52
2- Autres méthodes de fonctionnalisation	56
II- Fonctionnalisation à partir des CDs protégées sur la face des hydroxyles primaires	61

<i>Méthodes d'alkylation et d'acylation des CDs</i>	66
I- Méthylation	66
II- Alkylation	67
III- Acylation	67
<i>Conclusion</i>	68
 <u>Partie 2</u> : Etude bibliographique : Applications potentielles	 71
<i>Transport et vectorisation de principes actifs par les CDs</i>	71
I- Les CDs et le transport de médicaments : généralités	71
II- CDs et le transport d'oligonucléotides - Interactions avec les acides nucléiques	72
1- Présentation : les oligonucléotides antisens	72
2- Systèmes de transport d'oligonucléotides	74
a- Autres que CDs	75
b- CDs : transporteurs de oligonucléotides	77
3- Interactions CDs-acides nucléiques	86
III- Les CDs glycosylées	87
1- Synthèse chimique de CDs glycosylées	87
a- Synthèse de O-glycosyles-CDs	87
b- Synthèse de S-glycosyles-CDs	90
c- Synthèse de N-glycosyles-CDs	98

2- Propriétés physico-chimiques et biologiques	105
a- Solubilité dans l'eau	105
b- Propriétés de complexation	106
c- Effets biologiques et capacités de reconnaissance	107
<i>Les CDs : sondes fluorescentes</i>	110
I- Les complexes CD-pyrène : Intérêts et caractéristiques du pyrène	111
II- Les CDs chimiquement modifiées par un ou plusieurs groupes pyrène	113
1- Les CDs substituées par une seule unité pyrène	113
2- Les CDs substituées par deux unités pyrène	117
III- Autres sondes fluorescentes	119
<i>CDs et chimie biomimétique</i>	122
Introduction	122
I- CDs comme modèle d'enzyme autre que nucléase	123
II- Les nucléases artificielles	125
1- Définition	125
2- Quelques exemples récents de nucléases artificielles	125
- Les macrocycles polyamines	125
- Les complexes de lanthanides	126
- Les complexes de cuivre (II)	127
3- Les complexes de cuivre (I) et (II) de la phénanthroline et de la néocuproïne	129
4- Les CDs : Modèles de nucléases artificielles	131
- Clivage des ribonucléotides catalysé par les CDs natives	131
- Clivage des ribonucléotides catalysé par les CDs modifiées	135

Partie 3 : Synthèses 138

Introduction 138

<i>Champ d'application et limites de la réaction de Mitsunobu en série cyclodextrines</i>	139
---	-----

Présentation de la réaction 139

I- Fonctionnalisation directe de la face primaire de la β -CD non protégée par la réaction de Mitsunobu 141

- 1- Etude des conditions de la réaction de thio-Mitsunobu sur la β -CD non protégée 142
 - a- Cas du thiophénol 142
 - Synthèse 142
 - Etude chromatographique 146
 - b- Cas du 2-mercaptobenzothiazole 150
 - c- Cas de l'acide thiobenzoïque et de l'acide thiolacétique 154
 - d- Cas du 3-mercapto-prop-1-ène 156
 - e- Cas des monosaccharides : 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose et 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-mannopyranose 157

Conclusion 161

- 2- Etude de la réaction de Mitsunobu avec une amine : Cas de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2**, synthèse de la biscyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38** 164
 - a- Synthèse de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** 164
 - b- Couplage à la β -CD native : Synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38** 167

II- La réaction de Mitsunobu avec la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose <u>21</u>	170
1- Synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose <u>21</u>	170
2- Etude de la réaction de Mitsunobu en fonction du solvant et du nucléophile	172
Conclusion	179

<i>Synthèse de CDs monosubstituées sur la face des hydroxyles secondaires</i>	180
---	-----

I- Synthèse de l'heptakis-(6-O-<i>tert</i>-butyldiméthylsilyl)-cyclomaltoheptaose <u>39</u>	181
II- Couplage à partir de l'heptakis(6-O-<i>tert</i>-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose <u>39</u>	182
1- Synthèse de l'heptakis[2-(1-(2-amino)éthylamino)-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl)]-β-CD	182
2- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl)-β-CD <u>40</u> , des (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio-β-D-galactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Per-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl)-CDs (<u>41</u> (α-CD), <u>42</u> (β-CD), <u>43</u> (γ-CD)) et de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))- Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butylsilyl)-β-CD <u>44</u>	184
a- Synthèse des (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio-β-D-galactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Per-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl) CDs (<u>41</u> (α-CD), <u>42</u> (β-CD), <u>43</u> (γ-CD))	185
b- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))- Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl)-β-CD <u>40</u>	187

c- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))- Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl)- β -CD 44	189
• <u>Synthèse du 1-(4-pyrène)-butanethiol 11</u>	189
• <u>Réaction de couplage à l'heptakis-(6-O-<i>tert</i>-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose 39 : Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-<i>tert</i>-butyldiméthylsilyl))- Hexakis-(6-O-<i>tert</i>-butyldiméthylsilyl)-β-CD 44</u>	191
Conclusion	192
d- Couplage avec une amine primaire	194
<i>Synthèse de dimères de β-CDs</i>	196
I- Synthèse de dimères de β -CD via la réaction dite "phosphinimine"	200
- <u>Généralités sur la réaction dite "phosphinimine"</u>	200
II- Synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]-1,10-phénanthroline 36 et de la Bis-[[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-(2,3-di-O-méthyl)- cyclomaltoheptaosyl- 6- [2,9-bis- (1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline 37	203
1- Synthèse de la (2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 33 et de la (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 34	204
2- Synthèse de la Bis-{cyclomaltoheptaosyl-6- [2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline 36 et de la Bis-[[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthylcyclomaltoheptaosyl-6- [2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline 37	205
a- Synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]-1,10-phénanthroline 36	205

b- Synthèse de la Bis-{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline 37	209
c- Synthèse des complexes métalliques des dimères 36 et 37	210
<i>Dérivés de CDs, Transporteurs d'Oligonucléotides</i>	213
I- Synthèse des amino-β-cyclodextrines	213
1- Synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]-cyclomaltoheptaose 17	213
2- Synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose 18	214
3- Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-(1-(2-amino)éthylamino))-cyclomaltoheptaose 23	215
a- Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-bromo)-cyclomaltoheptaose 22	215
b- Synthèse de l'heptakis (6-déoxy-6-(1-(2-amino)-éthylamino))-cyclomaltoheptaose 23	216
II- Synthèse des galactosyl-β-CDs	217
1- Synthèse de la 6-S- β -D-galactopyranosyl-6-thio-cyclomaltpeptaose 16	217
2- Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-S- β -D-galactopyranosyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose 24	219
3- Résultats biologiques	219

Partie 4 : Physico-Chimie 222

<i>Etude Physico-Chimique</i>	222
-------------------------------	-----

I- Diagrammes de complexation de molécules médicamenteuses 222

1- Formation des complexes d'inclusion avec le dimère **36** 224

a- Cas de l'itraconazole et du kétoconazole 224

b- Cas de l'hydrocortisone 227

2- Formation des complexes d'inclusion avec le dimère **35a** 228

3- Analyse des résultats 231

II- Cinétiques d'hydrolyse du bis(*p*-nitrophényl)phosphate (BNPP) par le dimère **36** 233

1- Résultats 233

2- Analyse des résultats 239

3- Mécanisme de la réaction 241

III- Etude par spectroscopie de fluorescence 242

IV- Spectroscopie de RMN ^1H : Analyse structurale 247

1- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** 248

2- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Pentakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- α -CD **41** 261

3- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- γ -CD **43** 261

4- Analyse RMN ^1H des dimères de phénanthrolyl- β -CDs	262
a- Cas de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36	262
b- Cas de la Bis-{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-(2,3-di-O-méthyl)-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline 37	270
c- Cas de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline 38	271
5- Les complexes métalliques de la phénanthroline diamine 9 et du dimère 36	274
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	280
<i>Partie expérimentale</i>	282
<i>Annexe</i>	323
Modélisation Moléculaire MM3 (MAD-CHIMISTE [®]) de la phénanthroline diamine 9	323
Modélisation Moléculaire MM3 (MAD-CHIMISTE [®]) du dimère 36	324
Liste des figures	325
Liste des tableaux	334
<i>Bibliographie</i>	336

Objectifs de Recherche

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Ce travail de recherche s'inscrit dans la thématique du Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament et concerne la synthèse de β -CDs chimiquement modifiées pour des applications dans le domaine biologique et médical.

Les objectifs principaux de ce travail sont :

- la synthèse de transporteurs pour des molécules biologiquement actives,
- la synthèse de molécules mimant les endonucléases,
- la synthèse de sondes fluorescentes.

L'ensemble a été développé au travers de la mise en œuvre de méthodologies nouvelles de synthèse, de tests évaluant la reconnaissance moléculaire envers une lectine ainsi que de tests évaluant leur cytotoxicité. Les capacités de complexation et l'activité enzymatique potentielle des dimères de CDs natives et modifiées ont été testées.

L'idée du transport et de la vectorisation de principes actifs n'est pas nouvelle puisque, dès 1906, ERLICH proposa les anticorps comme vecteurs de médicaments. Depuis, la recherche en ce sens n'a cessé de progresser et de multiples moyens ont été décrits pour transporter et cibler les médicaments et plus récemment pour transporter les oligonucléotides [1, 2]. C'est dans ces domaines que les CDs ont pris une importance croissante.

D'une manière générale, un vecteur est un moyen de transporter une molécule active sélectivement jusqu'à une cible (cellules, organites cellulaires, organes, tissus). Ce concept est particulièrement attrayant dans le cas des pathologies cancéreuses ou virales où les thérapeutiques sont trop souvent toxiques ou souffrent d'un manque de spécificité.

Sur le plan pratique, un vecteur doit remplir certaines conditions :

- Le système de couplage du principe actif au transporteur ne doit pas altérer leurs caractéristiques respectives,
- Une quantité suffisante du principe actif doit être couplée au vecteur pour préserver son efficacité au niveau de la cible, le vecteur, quant à lui doit avoir une bonne affinité pour sa cible,
- Le vecteur doit être atoxique, biodégradable ou facilement excrétable et ne pas avoir d'activité pharmacologique intrinsèque, il doit trouver sur les cellules cibles une structure spécifique pour se lier et être alors capable de libérer son principe actif.

Des conditions similaires de compatibilité au milieu biologique sont requises lors de la synthèse d'enzymes artificielles et de sondes. Ces voies sont en plein essor actuellement et permettront peut-être de mieux comprendre les mécanismes biochimiques et les rapports existant entre virus et cellule et de créer de nouveaux outils thérapeutiques très efficaces et spécifiques puisqu'agissant au niveau même du génôme de ces organismes.

Les CDs, de par leurs caractéristiques, représentent une option sérieuse pour atteindre ces objectifs et elles ont donc fait l'objet de nombreuses études de toxicité pour confirmer leur biocompatibilité. A titre d'exemple, nous citerons ici l'une des plus récentes, celle de LEROY-LECHAT *et al.* [3]. Ces auteurs ont plus particulièrement étudié la cytotoxicité des CDs (α -, β - et γ -) natives et hydroxypropylées envers les érythrocytes humains (activité hémolytique). Ainsi, la β -CD native est la plus cytotoxique car elle possède la plus grande affinité pour les constituants de la membrane (phospholipides et cholestérol). Les dérivés hydroxypropylés n'ont qu'une activité hémolytique réduite. L'effet cytotoxique des CDs dépend à la fois de leur concentration dans le milieu et de la concentration des molécules susceptibles d'être incluses, présentes dans ce milieu.

Introduction

Introduction

• Définition et caractéristiques

Les cyclodextrines (CDs), molécules découvertes au début du siècle, sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités D-glucose liées en α -1,4. Il en existe trois types majeurs α , β et γ constituées respectivement de six, sept et huit unités glucose. La structure des CDs se compose d'une couronne portant les fonctions alcools primaires et d'une couronne portant les fonctions alcools secondaires. Elle peut être assimilée à un cône tronqué portant les fonctions alcools primaires sur sa face la plus étroite et les fonctions alcools secondaires sur sa face la plus large. Leur structure respective et leurs principales caractéristiques sont présentées dans la figure 1 et le tableau 1 [4] :

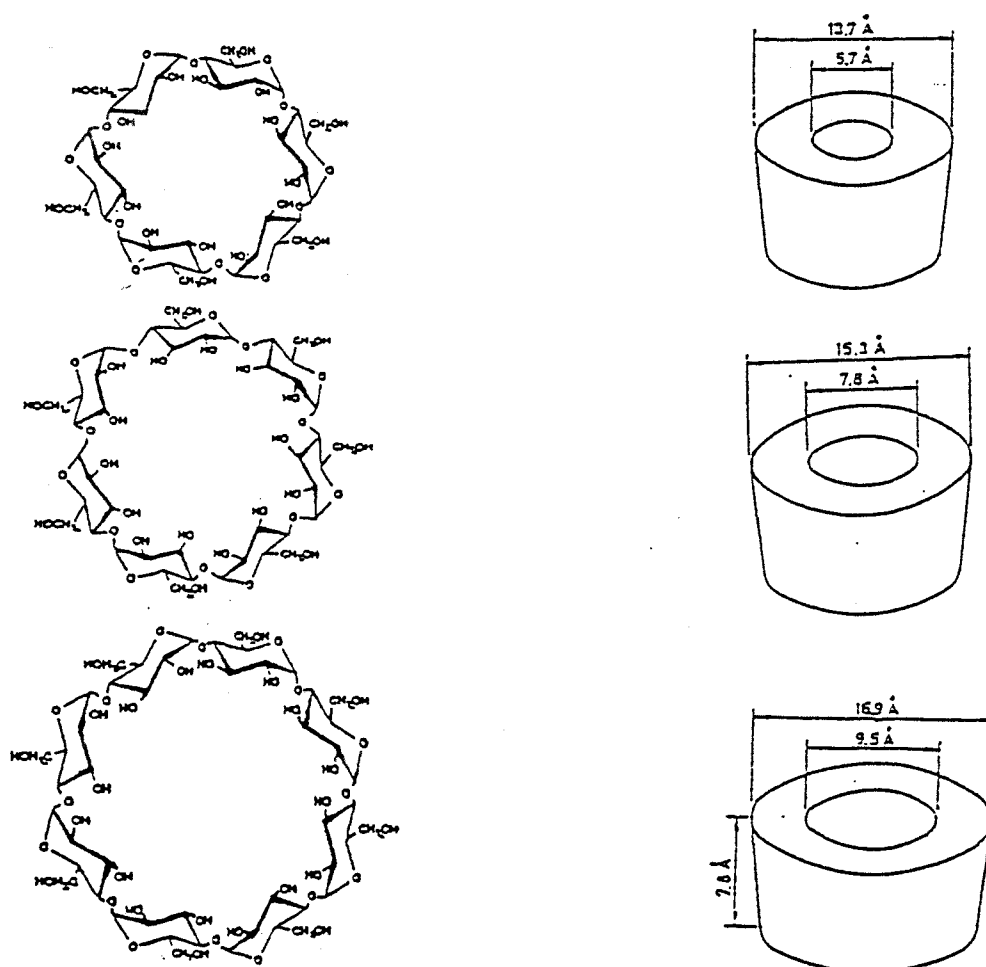


Figure 1 : Structure des α -, β - et γ -CDs

Tableau 1 : Principales caractéristiques des CDs :

	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Masse moléculaire	972	1135	1297
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6	11	17
Solubilité dans l'eau à 25°C (% p/v)	14,5	1,85	23,2
Point de fusion (°C)	275	280	275
Diamètre de la cavité (nm)	0,5-0,6	0,6-0,8	0,8-1,0
Diamètre externe (nm)	1,4-1,5	1,5-1,6	1,7-1,8
Hauteur du tore (nm)	0,8	0,8	0,8
Volume (mm ³)	0,176	0,346	0,510
Nombre de centres chiraux	30	35	40

Depuis une trentaine d'années, du fait de leur production industrielle, la chimie des CDs s'est très fortement développée et leur prix est devenu accessible. De curiosités de laboratoire, les cyclodextrines sont devenues des molécules possédant de très larges utilisations dans la chimie des "sucres". Le nombre important de publications et de brevets les concernant est en constante augmentation.

•Nomenclature [5]

Ces composés possèdent plusieurs noms triviaux :

- cyclodextrines, certainement le plus usité,
- dextrines de Schardinger, du nom de celui qui a mis en évidence leur structure cyclique,
- cycloglucanes, cycloamyloses,

mais la terminologie officielle découlant des règles de nomenclature de l'IUPAC les appelle cyclomaltooligosaccharides.

•Structure

La structure des CDs a été déterminée par radiocristallographie et par des méthodes de calcul quantique semi-empiriques [6]. Ces études théoriques montrent que la structure des résidus glucopyranoses est similaire à celle obtenue par les rayons X. La répartition des charges est pratiquement égale à celle calculée pour l' α -D-glucose. Ces

calculs permettent de reproduire la liaison hydrogène entre les fonctions hydroxyles secondaires en position 2 et 3. Les calculs montrent cependant des différences notables par rapport aux structures rayons X qui concernent l'orientation des fonctions hydroxyles primaires. Les calculs AM1 montrent que l'orientation de certains hydroxyles primaires de la β -CD permettent la formation de liaisons hydrogènes particulières (Figure 2). L'existence de ces liaisons semble être la conséquence de l'orientation d'unités glucoses vers l'intérieur de la cavité.

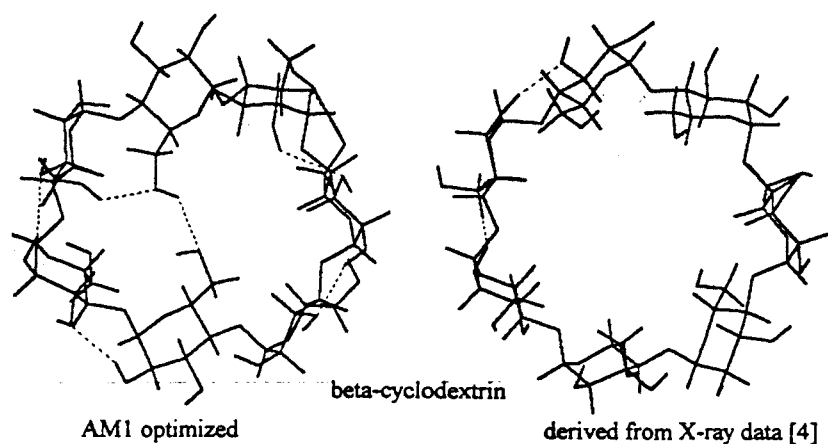


Figure 2 : Structure de la β -CD à partir de calculs AM1 et par radiocristallographie [6].

LICHTENTAKER et IMMEL [7], sur la base des structures RX des hydrates de CDs, ont calculé, par mécanique moléculaire (PIMM^{®1}), les conformations d'énergie minimum et ont généré les profils du potentiel d'hydrophobie. Il ont montré que la face portant les fonctions hydroxyles secondaires est beaucoup plus hydrophile que celle portant les hydroxyles primaires et que les régions hydrophobes sont concentrées vers l'intérieur de la cavité de la CD d'où leurs capacités de complexation de molécules hydrophobes.

•Propriétés

Les CDs sont des molécules solubles dans l'eau, la β -CD étant la moins soluble du fait d'un réseau de liaisons hydrogènes entre les fonctions hydroxyles en position 2 et 3 qui persiste même en solution, la rendant rigide et empêchant son hydratation par les molécules d'eau [4].

1 : PIMM : Closed Shell p-SCF-LCAO-MO-Molecular Mechanics Program. Technische Hochschule Darmstadt, 1988.

La propriété majeure des CD est leur capacité à former des complexes d'inclusion [8] en milieu aqueux avec de nombreuses molécules organiques (molécules aromatiques, alcools, anions.....). La formation d'un complexe d'inclusion est principalement déterminée par :

- un facteur géométrique : le substrat (molécule "invitée") ou une partie de celui-ci doit posséder des dimensions qui s'adaptent à la cavité de la CD (molécule "hôte").
- l'hydrophobie de la molécule "invitée" : seules des molécules moins polaires que l'eau pourront être complexées.

Le complexe "hôte-invité" ("host-guest") ainsi formé est défini par le terme de supermolécule au sens de LEHN [9], il ne fait intervenir que des interactions faibles telles que : liaisons hydrogènes, liaisons de Van Der Waals et interactions hydrophobes. Lors de la complexation, le substrat va déplacer les molécules d'eau initialement présentes dans la cavité de la CD, ceci est d'autant plus facile que celles-ci sont dans un environnement hydrophobe et dans un état d'énergie supérieure à celles du solvant. L'inclusion est alors favorisée car elle permet de diminuer l'énergie totale du système.

Le phénomène de complexation est toujours une réaction équilibrée qui dépend de la molécule à complexer. Souvent c'est une réaction moléculaire et la stœchiométrie du complexe est 1:1 mais il existe aussi des stœchiométries plus élevées telles que 2:1 ou même 3:1 lorsque le substrat est trop grand pour la cavité ou inversement. La complexation se fait toujours de façon à avoir le maximum d'interactions c'est-à-dire la meilleure stabilité.

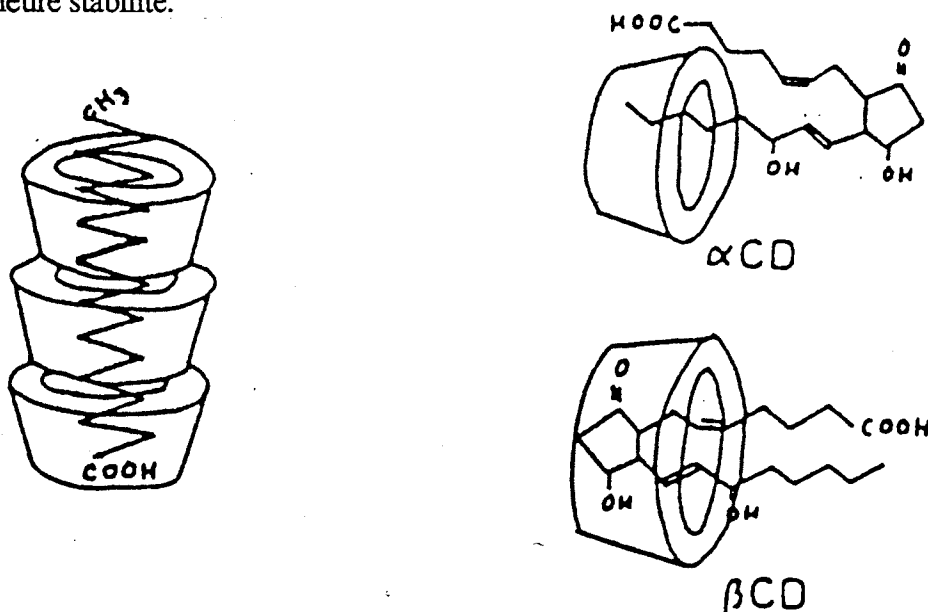


Figure 3 : Différents complexes de CDs

Les propriétés physico-chimiques de la molécule complexée et les caractéristiques spectroscopiques de la CD étant modifiées par rapport à celles des molécules libres du fait des interactions entre "hôte" et "invité", il existe différentes méthodes basées sur ces modifications permettant la détection des complexes. Les plus courantes sont :

- la RMN ^1H ,
- la spectroscopie UV pour les molécules possédant un chromophore,
- la spectroscopie de fluorescence pour les molécules possédant un fluorophore,
- les diagrammes de solubilité.

• Applications diverses

Les applications potentielles et effectives des CDs sont nombreuses du fait de leur capacité à complexer les molécules hydrophobes. Concernant les applications effectives, les CDs sont déjà utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, dans celle des cosmétiques mais aussi dans celle des parfums, des détergents et des insecticides. Les CDs natives ont aussi des applications dans l'industrie pharmaceutique sous la forme de complexes de médicaments. Une autorisation de mise sur le marché a notamment été obtenue, en France (1993) pour un complexe de β -CD avec un AINS, le pyroxicam, commercialisé sous le nom de CYCLADOL®.

En ce qui concerne les applications potentielles, c'est dans le domaine biologique et médical qu'elles sont les plus importantes [10, 11]. Citons à ce sujet qu'un brevet américain a été déposé en 1992 concernant les complexes de CDs comme vecteurs de médicaments (β -CD-IgG, complexe avec le méthotrexate) [12].

Partie 1 : Etude bibliographique : Méthodologies de fonctionnalisation des CDs

*Méthodologies de fonctionnalisation de la face des
hydroxyles primaires*

*Méthodologies de fonctionnalisation de la face des
hydroxyles secondaires*

Méthodes d'alkylation et d'acylation des CDs

Conclusion

Avant-propos :

Compte-tenu de l'importante documentation parue dans le domaine, nous avons décidé de présenter, ici une revue, des travaux antérieurs consacrée à la chimie et aux applications des CDs modifiées, couvrant volontairement la période la plus récente, c'est-à-dire les années 1990 et au delà, durant laquelle il a été enregistré des progrès considérables sur le plan de la synthèse de nouveaux dérivés de CDs. Toutefois, certaines références particulièrement marquantes, antérieures à cette période mais toujours d'actualité, ont été incluses à notre revue bibliographique.

Nous présenterons ces travaux en deux parties distinctes :

- une première partie consistera en une revue des différentes méthodologies de fonctionnalisation de la CD sur ses hydroxyles primaires et secondaires.
- une seconde partie consistera en une revue des principales applications potentielles (transporteurs, sondes froides, enzymes artificielles) des CDs.

Méthodologies de fonctionnalisation des fonctions hydroxyles primaires

La fonctionnalisation des fonctions hydroxyles primaires des CDs passe essentiellement par l'introduction sélective de groupes nucléofuges qui sont ensuite substitués par déplacement nucléophile. Nous allons ici présenter les différentes voies permettant d'accéder à ces dérivés.

I-Sulfonylations

Il existe de très nombreux dérivés sulfonylés des CDs dans la littérature. Ils servent essentiellement d'intermédiaires réactionnels à la synthèse d'autres dérivés par activation des hydroxyles de la CD. Ainsi, il existe des CD mono et polysulfonylés et des CDs dites "chapeautées".

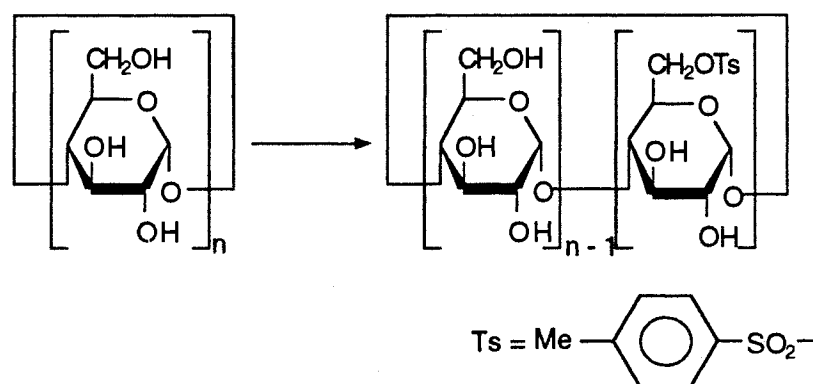
1- Monotosylation

Les dérivés tosylés sont parmi les premiers composés obtenus par modification chimique des CDs. Les méthodes de monotosylation de la CD sont nombreuses et souvent similaires. La réaction générale et les principales méthodes de tosylation sont présentées dans le tableau 2.

Partie 1 : Etude bibliographique : Méthodologies de monofonctionnalisation des CDs

La réaction de tosylation est la réaction initiale, la plupart du temps, nécessaire à la modification ultérieure des CDs. Le plus souvent, elle s'effectue dans la pyridine, à température ambiante ou à froid, bien qu'elle ait été aussi décrite en solution aqueuse alcaline [13, 14]. Les temps de réaction et les quantités de réactifs ainsi que leur mode d'addition sont très variables en fonction des méthodes utilisées. Il existe des additions uniques, multiples et/ou en solution. Dans tous les cas, les rendements ne sont jamais très élevés du fait de la multiplicité des fonctions hydroxyles primaires. Seul GAO indique un rendement supérieur à 30% [15]. Cette étape doit donc être considérée comme limitante dans les stratégies de synthèse.

Tableau 2 : Tosylation des cyclodextrines α , β et γ .



CD	n-1	Chlorure de tosylo (TsCl,éqs.)	Solvant	Conditions de réaction	Rdt	Réf.
α	5	excès	pyridine	40min.-t.a.	10%	[5, 16]
β	6	0,5	pyridine	2 jours / 5°C	NP	[17]
β	6	1,5 puis 1	pyridine	1h / t.a.	27%	[18]
β	6	large excès	pyridine	t.a.	3,4%	[19]
β	6	1	H ₂ O / NaOH	2h-t.a.	11%	[13]
β	6	0,83	H ₂ O / NaOH	2h-t.a.	17%	[14]
α	5	5,1	pyridine	-5°C puis 5h-t.a.	15,8%	[20]
β	6	5,1	pyridine	-5°C puis 5h-t.a.	NP	[20]
γ	7	5,1	pyridine	-5°C puis 5h-t.a.	NP	[20]
β	6	1,2	pyridine	20h-t.a.	19%	[21]
β		0,85	pyridine	2h-0°C puis 20h-t.a.	26%	[22]
β	6	1,2	pyridine	8h-0°C puis 48h-t.a.	38%	[15]

t.a. : température ambiante

NP : Non Précisé

Rdt : Rendement

Réf. : Référence

Les méthodes de purification de ces dérivés sont aussi très variées. Ils peuvent être purifiés par précipitation, à froid [13], par addition de solvants organiques [15] ou par acidification [14] suivie ou non d'une recristallisation dans l'eau [14, 17, 22]. La CLHP préparative à polarité de phase inversée est utilisée [18] de même qu'une colonne de charbon activé [20]. Une purification par chromatographie sur couche mince préparative [19] a même été décrite avec le mélange ammoniac / acétate d'éthyle / eau / 1-propanol : 3:3:2:5. Cette méthode de purification est intéressante, au niveau d'un laboratoire dans la mesure où elle est rapide mais le rendement en monotosyl- β -CD est très faible : 3,4%.

Une étude intéressante a été effectuée par TAKAHASHI *et al.* [23] sur la monotosylation de l' α - et la β -CD en fonction des conditions de réaction. Il apparaît qu'en fonction de ces conditions, la tosylation ne s'effectue pas sur les mêmes hydroxyles selon que l'on parte de l' α - ou de la β -CD. Ainsi, dans les conditions de tosylation décrites par MELTON et SLESSOR, la monotosylation s'effectue sur les hydroxyles primaires dans les deux cas. Dans le diméthylformamide (DMF) en présence d'un tampon pH10 et de *m*-nitro-phényltosylate, elle s'effectue sur les hydroxyles secondaires en position 2. Enfin, il est apparu qu'en solution aqueuse alcaline avec 6 éqs. de chlorure de tosyte, à température ambiante pendant une heure, la β -CD est tosylée en position 6 (Rdt : 28%) tandis que l' α -CD est tosylée en position 2 (Rdt : 16%). La réaction procède *via* la complexation du chlorure de tosyte dans la cavité des CDs, la position du réactif dans la cavité détermine la fonction qui va être tosylée. Ces dernières conditions constituent une méthode simple de tosylation sélective en fonction de la CD utilisée au départ. La structure des produits a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C . La position de substitution est confirmée par CLHP (grâce aux volumes de rétention des composés qui sont différents selon que le tosyte est en position 2 ou 6) et par hydrolyse acide (analyse des hydrolysats par chromatographie sur papier).

Les dérivés monotosylés ont aussi été acétylés [18] pour faciliter la purification de leurs produits de substitution. Une α - et une β -CD monotosylées et perméthylées ont aussi été décrites [24]. Elles sont obtenues par une synthèse multi-étapes comprenant la séquence : monotritylation, méthylation, détritylation puis monotosylation. Les conditions exactes de réaction et les rendements ne sont pas précisés par les auteurs.

2- Monomésylation

En 1989, S. COTTAZ, [25] synthétise une β -CD monomésylée et peracétylée par synthèse multi-stades à partir d'une monotrityl- β -CD et peracétylée. Après déprotection

de la fonction trityle, la β -CD peracétylée est mésylée dans la pyridine à -15°C (Rdt: 92% après purification chromatographique).

Ces intermédiaires ont été utilisés dans des synthèses de complexes métalliques [17], d'enzymes artificielles, de dimères de CDs [14, 19], de transporteurs de principes actifs [18, 25] ou de sondes fluorescentes [20].

3- Pertosylation et permésylation

Les dérivés persulfonylés ont été synthétisés pour les mêmes raisons que les dérivés monosubstitués c'est-à-dire pour servir d'intermédiaires de synthèse à la préparation d'autres dérivés principalement azidés et aminés dont nous parlerons dans la section suivante de cette étude mais aussi à la préparation des per-3,6-anhydro-CDs. Ces réactions sont délicates car l'encombrement stérique créé en particulier par les groupes tosyloxy augmente au fur et à mesure de la substitution des hydroxyles primaires de la CD et il devient alors possible qu'un groupe hydroxyle secondaire en position 2 puisse réagir plus vite que les derniers hydroxyles primaires à substituer.

La réaction générale de synthèse de ces dérivés et les principales méthodes permettant d'y accéder sont présentées dans le tableau 3.

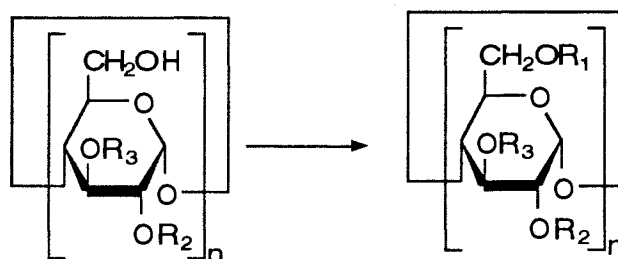
Les conditions de réaction de la pertosylation et de la permésylation sont similaires à celles de la réaction de monosubstitution, seule la quantité de réactif nécessaire est plus importante. La première synthèse d' α -et de β -CD pertosylées a été décrite par LAUTSCH *et al.* en 1954 [5]. Ces mêmes dérivés ont, par la suite, été synthétisés par d'autres auteurs par modifications de la méthode initiale, en particulier, en effectuant la réaction à froid ou avec un excès de chlorure de tosyloxy et en purifiant les produits par chromatographie. En effet, la pureté des produits obtenus par LAUTSCH avait été remise en question car sa méthode de purification n'impliquait pas de chromatographie. Ces mêmes dérivés, acétylés sur la face des hydroxyles secondaires de la CD, ont aussi été décrits en tant qu'intermédiaires de synthèse.

En présence d'un large excès de chlorure de tosyloxy, YAMAMURA *et al.* [26] ont montré qu'une tosylation en position 2 peut se produire bien que la réaction de tosylation dans la pyridine soit sélective des hydroxyles primaires. Ainsi, nous pouvons supposer que la tosylation en position 6 se fait d'abord, suivie de celle en position 2 du fait de l'acidité de cet hydroxyle. Les deux produits sont séparés par CLHP à polarité de phase inversée. Le dérivé monotosylé en position 2 est obtenu avec un rendement de 15%. La

structure de ces composés a été déterminée, par les auteurs, sur la base des spectres de masse et de RMN ^1H et ^{13}C [26].

En 1978, BOGER *et al.* [27] (tableau 3) réalisent une étude très complète sur la modification sélective de tous les hydroxyles primaires de l' α -et la β -CD et développent une stratégie de synthèse originale qui passe par l'estérification complète de l' α -CD (perbenzoylester) puis par la déprotection sélective de tous les hydroxyles primaires. La réaction de clivage a lieu avec l'isopropoxyde de potassium dans un mélange 2-propanol / benzène. L' α -CD ainsi obtenue (face supérieure libre, face inférieure benzoylée) est ensuite tosylée avec un rendement de 95%. La structure du dérivé a été étudiée et confirmée par RMN ^{13}C .

Tableau 3 : Pertosylation et permésylation des cyclodextrines α et β .



n	R ₂ = R ₃	R ₁ SO ₂ Cl	Solvant	Conditions	Rdt	Réf.
6	OH	TsCl-6éqs.	pyridine	t.a.	NP	[5]
7	OH	TsCl-7éqs.	pyridine	t.a.	NP	[5]
7	OH	TsCl-20éqs.	pyridine	5,5h-t.a.	24%	[26]
6	PhCO-	TsCl-10éqs.	pyridine	18h-t.a.	95%	[27]
6	OH	TsCl-6éqs.	pyridine	<0°C	NP	[5]
7	OH	TsCl-7éqs.	pyridine	<0°C	NP	[5]
6	OAc	TsCl-18éqs.	pyridine	-10°C-1h puis t.a.-1nuit	77%	[28]
6	OAc	MsCl-18éqs.	pyridine	-10°C puis 5°C- 1nuit	83%	[28]

Les permésyl- α - et β -CDs ont aussi été préparées par LAUTSCH *et al.* [5] dans la pyridine, à basse température. Du fait de problèmes lors de la purification, les auteurs

ont acétylé leurs dérivés dans la pyridine par l'anhydride acétique. D'autres auteurs [5] ont préparé ces mêmes dérivés (natifs ou acétylés) de manière analogue en vue d'autres réactions de substitutions.

Enfin, la synthèse des dérivés permésylés et pertosylés sur la face primaire et acétylés sur la face secondaire de l' α -CD a été décrite [28] en partant de l'hexakis(2,3-di-O-acétyl)- α -CD dans des conditions analogues à celles de LAUTSCH. Les rendements sont respectivement de 83 et 77% (tableau 3).

4- Les sulfonations régiosélectives

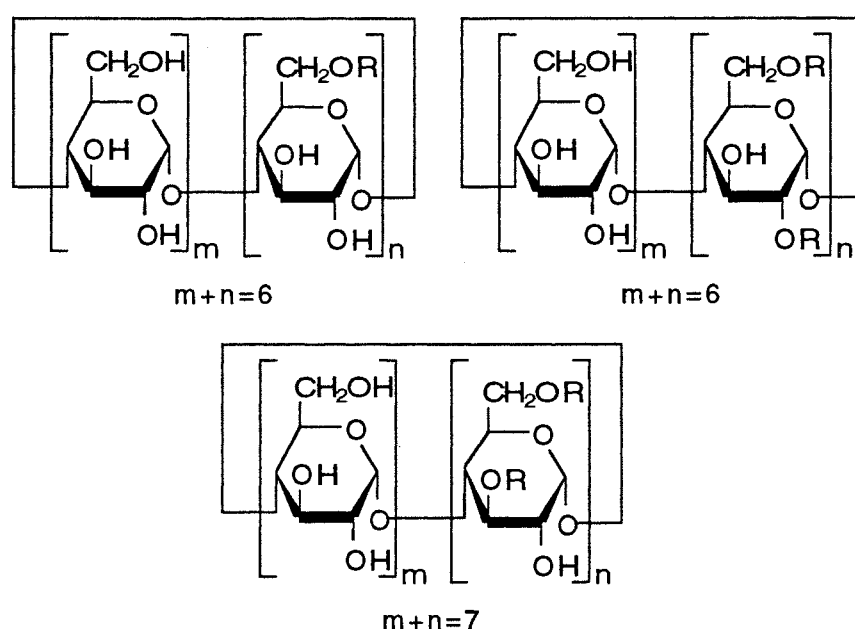


Figure 4 : Représentation générale de CDs polysulfonylés

Il existe de nombreux dérivés régiosélectivement sulfonylés [5]. Ce sont aussi des intermédiaires de synthèse. Leur préparation, qui donne souvent lieu à des mélanges d'isomères, a permis la séparation et la caractérisation de ces isomères.

Ainsi, entre 1986 et 1995 [29, 30, 31, 32, 33, 34], l'équipe de FUJITA a synthétisé différents mélanges d'isomères de l' α - ou de la β -CD substituée avec différents groupes sulfonyles. Par exemple, différents mélanges d'isomères de l' α -CD substituée par le groupe mésitylènesulfonyle ont été synthétisés [29]. Ici, la substitution se fait uniquement sur la face des hydroxyles primaires. Ces mélanges sont di, tri, tétra ou pentasulfonylés suivant la quantité de chlorure de mésitylène sulfonyle utilisée dans la réaction qui s'effectue toujours dans la pyridine et à température ambiante. Tous les isomères ont été purifiés et isolés par CLHP à polarité de phase inversée. Les positions respectives des substitutions ont été déterminées, pour les composés disubstitués, par

leur réduction par NaBH_4 et étude de leurs spectres de masse et de RMN ^1H . Les autres régioisomères ont été identifiés par rapport à leur temps de rétention en CLHP et par des réactions de sulfonylations successives des différents mélanges obtenus puis mesure de leur temps de rétention. Cette méthode permet de procéder par élimination, connaissant le nombre théorique d'isomères pouvant exister dans chaque mélange initial.

En 1988, ce même auteur [30] publie un travail similaire consistant à caractériser un mélange d'isomères d'une β -CD disubstituée par deux groupements sulfonyles différents en position 6. Cette fois, la caractérisation a été faite par étude RMN des produits de réduction puis d'hydrolyse enzymatique par la Taka amylase. Par la suite, FUJITA a poursuivi des travaux similaires notamment avec une β -CD substituée en position 3 et 6 [32, 33] et avec une α -CD substituée en 2 et 6 [34].

L'ensemble de ces travaux a été effectué dans le but d'obtenir des composés substitués de structure pré-définie pour la synthèse de dérivés plus élaborés.

5- Les CDs "chapeautées"

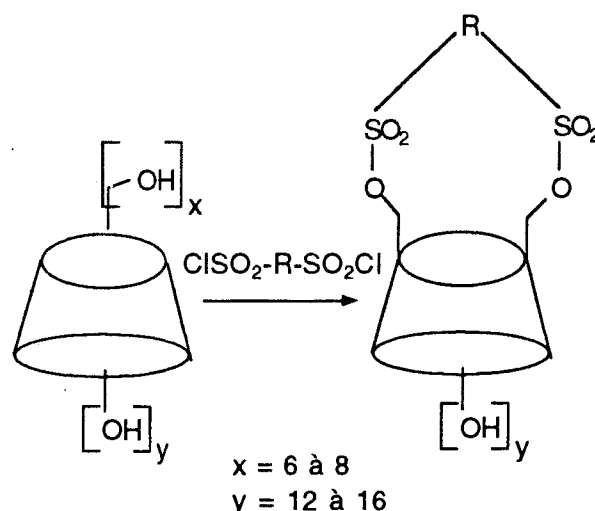


Figure 5 : Structure générale des CDs "chapeautées".

Ce sont des intermédiaires de synthèse nécessaires à l'obtention de CDs disubstituées, en position 6, sur des unités glucose définies. C'est la taille et la géométrie du réactif disulfonylé substituant ainsi que le type de CD utilisé au départ qui va définir la position de la substitution dans le produit de réaction. Ces molécules étant rigides, les deux groupements sulfochlorures réagissent et il est possible d'obtenir un isomère unique ou un mélange d'isomères suivant le type de réactif utilisé. D'une manière générale, ces dérivés sont synthétisés dans la pyridine, à température ambiante avec un chlorure de

disulfonyle (Figure 5). La figure 6 présente les différentes possibilités d'accrochage des substituants disulfonylés sur la β -CD.

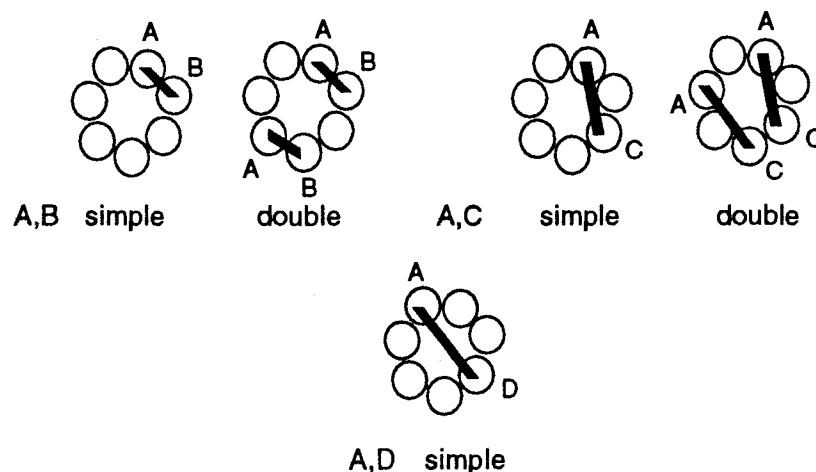
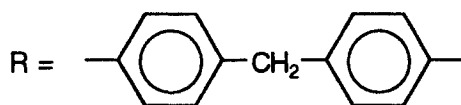
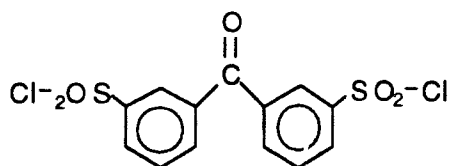


Figure 6 : Différentes possibilités d'accrochage des substituants disulfonylés sur la β -CD [16].

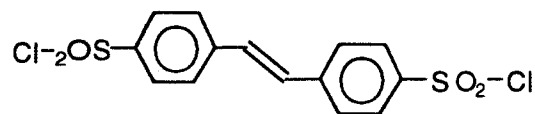
Les premiers exemples ont été rapportés par TABUSHI [5]. Il s'agissait de la synthèse de la 6^A, 6^C-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- α -CD et de la 6^A, 6^{C(D)}-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- β -CD dont il a étudié, par fluorescence, les complexes avec l'ANS. Ces dérivés ont aussi servi à la synthèse de CDs difonctionnalisées symétriquement. Le schéma suivant présente la structure du substituant de la 6^A, 6^C-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- α -CD et des 6^A, 6^{C(D)}-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- β -CDs.



En 1981, ce même auteur [5] a pu obtenir une substitution régiospécifique de la β -CD en 6^A,6^C et 6^A,6^D en utilisant respectivement le chlorure de 3,3'-disulfonyl benzophénone et le chlorure de 4,4'-disulfonyl-*trans*-stilbène.

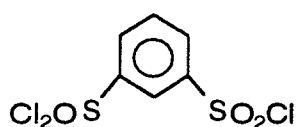


Chlorure de 3,3'-benzophénone disulfonyle

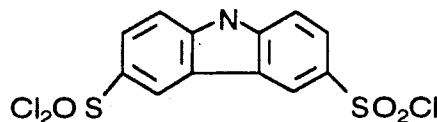


Chlorure de *trans*-stilbène-4,4'-disulfonyle

En 1989, Kuroda *et al.* [35] ont synthétisé deux types de β -CD "chapeautés" substituées respectivement en 6^A,6^B et 6^A,6^C pour obtenir les dérivés diiodés correspondants, utilisés ultérieurement dans une étude des paramètres de complexation de CDs mono et diammonium. Les réactifs utilisés sont les suivants :



Substitue en A,B



Substitue en A,C

En 1990, BRESLOW *et al.* [36] préparent un dérivé analogue (Rdt : 12%) lors de la synthèse d'une transaminase artificielle.

TABUSHI *et al.* [37] synthétisent parallèlement une β -CD "chapeauté" par un anion (Figure 7) pour étudier l'inclusion de molécules cationiques hydrophobes. En effet, la reconnaissance des substrats chargés est un phénomène très répandu et important chez les enzymes (ATPase, trypsine....).

Ce dérivé a été synthétisé par action du chlorure de 2,9-phénanthridinone disulfonyl sur la β -CD, dans la pyridine, à température ambiante. Le rendement est de 3%. Ce produit a été transformé en son dérivé diazidé pour confirmer définitivement sa structure.

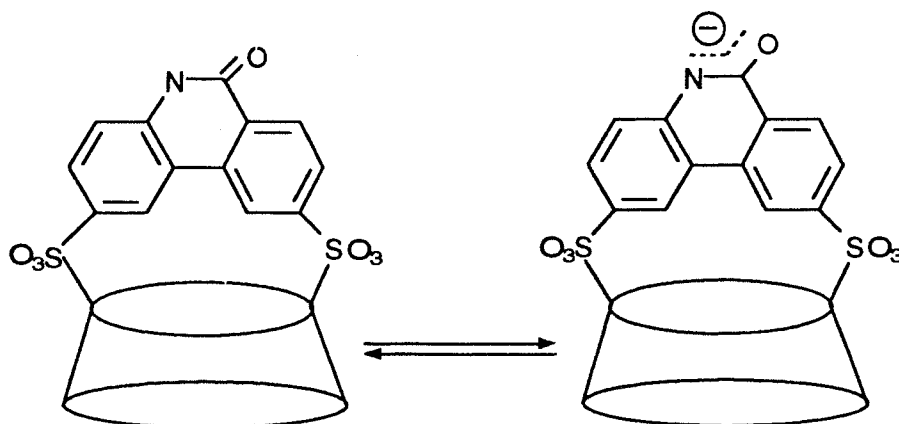


Figure 7 : β -CD "chapeauté" par un anion [37].

Enfin, Ueno *et al.* [38], synthétisent une γ -CD "chapeautée" par un groupe azobenzène-4,4'-disulfonyle et étudient les modifications de ces capacités de complexation en fonction de sa photoisomérisation (trans $\leftrightarrow$ cis) lorsqu'il est irradié par une lumière UV entre 310 et 390 nm.

Ce composé est synthétisé par réaction du chlorure de l'azobenzène disulfonyle sur la γ -CD, dans la pyridine à 60°C pendant 1h. Il est purifié par chromatographie sur colonne de Séphadex G-15. Le rendement est de 13% et le dérivé obtenu est un mélange des régioisomères A,D et A,E (6:94). Avec la β -CD, seul le régioisomère A,D est obtenu. Ce dérivé est aussi un intermédiaire de synthèse dans l'élaboration de sondes optiques [39].

II- Azidation et amination

D'une manière générale, les CDs aminées sont obtenues en deux étapes à partir des CDs tosylées ou plus rarement mésylées par déplacement nucléophile du sulfonate par l'ion azide puis réduction de l'azide obtenu.

1- Mono-azidation et mono-amination

Les CDs aminées constituent un synthon particulièrement important dans la chimie des CDs. Elles donnent accès à de très nombreux dérivés qui sont obtenus en particulier par couplage peptidique. Ceux-ci sont ensuite utilisés comme sondes dans les études de reconnaissance moléculaire, comme enzymes ou récepteurs artificiels ou bien encore comme vecteurs potentiels de molécules médicamenteuses.

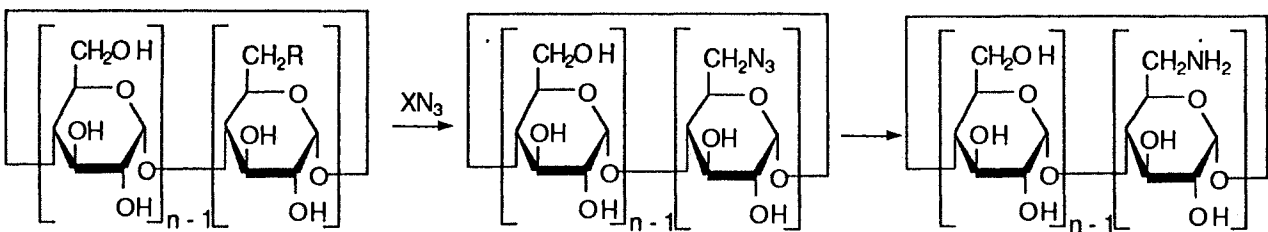
Le tableau 4 (p 18) présente les différentes méthodes de mono-azidation et de mono-amination.

Les méthodes de mono-azidation décrites dans la littérature sont similaires. En général, il est nécessaire d'utiliser un excès de sel d'azoture et de chauffer pour obtenir la substitution de la CD monotosylée. A notre connaissance, un seul exemple de mono-azidation est décrit au départ d'une CD mono-iodée [13] ce qui a l'inconvénient de demander une étape de synthèse supplémentaire pour un rendement en mono-azido-CD analogue. Dans tous les cas, les rendements sont très élevés.

JICSINSZKY [40] (Tableau 4) a préparé les dérivés mono azidés des α -, β - et γ -CDs par réaction des dérivés tosylés en solution dans trois fois leur masse de DMF avec 1,2 éqs. de NaN_3 à 100°C pendant 1h. Les produits sont précipités par addition d'acétone au mélange réactionnel et recristallisés dans un mélange eau-acétone (Rdts > 95%). Cette méthode a l'avantage d'être très rapide et presque quantitative. Elle

permet aussi de s'affranchir l'azoture de sodium en excès (principal contaminant des mono-azido-CDs[18,20]).

Tableau 4 : Mono-azidation et mono-amination des CDs.



Mono-azidation						Mono-amination à partir du dérivé mono-azidé			
CD (n)	R	Solvant	XN ₃ (éqs.)	Conditions	Rdt.	Solvant	Conditions	Rdt.	Réf.
α (5)	OTs	eau	X=Na	NP	NP	NP	H ₂ / Pd	NP	[5]
β (6)	OTs	DMF	X=Na (10)	0,5éq. KI-24h-65°C	88%	eau	H ₂ / Pd-C 12h-t.a.	57%	[13]
β (6)	I	DMF	X=Na (2,8)	24h-60°C	90%	eau	H ₂ / Pd-C 12h-t.a.	57%	
β (6)	OTs	eau	X=Li (13)	4h-90°C	84%	MeOH-HCl	H ₂ / Pd 5h-t.a.-10 Atm.	58%	[41, 43]
β (6)	OTs	DMF	X=Na (20)	12h-reflux	>90%	DMF	PPh ₃ -0°C-1h NH ₃ conc-12h-t.a.	95%	[18]
α (5)	OTs	eau	X=Na	5h-80°C	NP	DMF	PPh ₃ -NH ₃ conc-4h t.a.	22%	[20]
β (6)	OTs	eau	X=Na	5h-80°C	NP	DMF	PPh ₃ -NH ₃ conc-4h t.a.	22%	[20]
γ (7)	OTs	eau	X=Na	5h-80°C	NP	DMF	PPh ₃ -NH ₃ conc-4h t.a.	22%	[20]
α (5)	OTs	DMF	X=Na (1,2)	1h-100°C	>95%	MeOH-eau	H ₂ / Pd-C-formate d'ammonium-20min-reflux	>95%	[40]
β (6)	OTs	DMF	X=Na (1,2)	1h-100°C	>95%	MeOH-eau	H ₂ / Pd-C-formate d'ammonium-20min-reflux	>95%	[40]
γ (7)	OTs	DMF	X=Na (1,2)	1h-100°C	>95%	MeOH-eau	H ₂ / Pd-C-formate d'ammonium-20min-reflux	>95%	[40]

Les mono-amino-CDs sont obtenues sous forme de chlorhydrate ou sous forme neutre à partir des mono azides correspondants soit par hydrogénation [5, 13, 40] soit par la réaction de Staudinger [18, 20] et sont purifiés par chromatographie d'échange d'ions. Les conditions de réaction sont variables selon les méthodes.

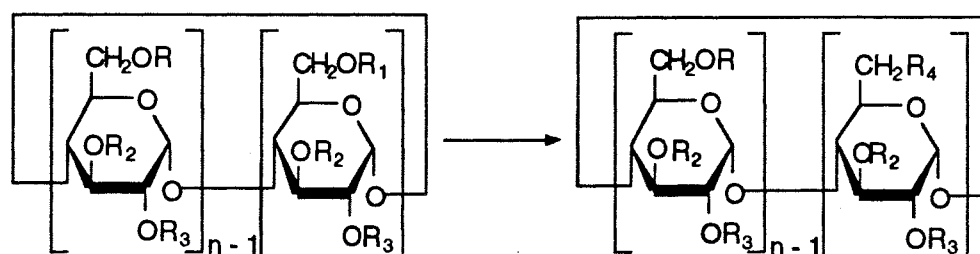
La seule méthode d'amination qui ne passe pas par un intermédiaire azide a été décrite en 1994 par BEESON et CZARNIK [42]. La mono-amino β -CD est synthétisée à partir de la monotosyl- β -CD par substitution directe en présence d'ammoniaque concentré, en tube scellé, à température ambiante, pendant quatre jours (Rdt : 13%, après purification).

La perméthyl-6-mono-amino- β -CD a été synthétisée par PARROT-LOPEZ *et al.* [41]. La méthode de synthèse implique d'abord la perméthylation de la mono-azido- β -CD avec un rendement de 32% après purification sur colonne de gel de silice puis sa réduction pour fournir le dérivé aminé sous sa forme chlorhydrate avec un rendement de 85%. Ce dernier composé, en présence d'hydroxyde de sodium fournit la mono-amino-perméthyl- β -CD avec un rendement de 58% . Cette amino-CD a ensuite été couplée à des acides aminés ou à un peptide [41, 43], la Leu-enképhaline, pour en faire potentiellement un transporteur de molécules biologiquement actives capable de protéger ces acides aminés ou ce peptide de l'hydrolyse.

- Alkyl amination et alkyl diamination

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour fonctionnaliser les CDs avec un ou des bras alkyl diamines. Nous commencerons par la présentation de ces méthodes (Tableau 5) puis nous poursuivrons par celles permettant d'accéder aux dérivés alkylamines.

Tableau 5 : Mono-alkyldiamination des CDs



CD (n-1)	R	R ₁	R ₂ =R ₃	R ₄	Conditions	Rdt %	Réf
β (6)	H	Ts	H	-HN-(CH ₂) ₂ -NH ₂	1,2-diamino éthane- 1h-70°C-N ₂	37	[17]
α (5)	Me	Ts	Me	-HN-(CH ₂) ₂ -NH ₂	NP	NP	[24]
β (6)	Me	Ts	Me	-HN-(CH ₂) ₂ -NH ₂	NP	NP	[24]
β (6)	H	H	H	-HN-(CH ₂) ₂ -NH ₂	1,2-diamino éthane- 7h-70°C-N ₂	39	[44]
β (6)	H	Ts	H	-(Y)N-(CH ₂) ₂ -N(X)	alkyldiamine-tube scellé 6-30h-75°C-N ₂	40 à 55	[42]
β (6)	H	Ts	H	-HN-(CH ₂) ₃ -NH ₂	1,5éq. 1,3-diamino propane-DMF-24h- t.a.	93	[45]

X=(CH₃)₂, Y=H

X=H₂, Y=H

X=(CH₃)₂, Y=Me

Les mono-aminoalkylamino-CDs sont, en général, synthétisées sans solvant, directement dans le réactif à partir de la monotosyl-CD [17, 42, 44]. Le plus souvent, ces protocoles sont des modifications de la procédure initiale de MATSUI [17]. Les rendements ne dépassent pas 55%. La purification des aminoalkylamino-CDs se fait par chromatographie d'échange d'ions (Carboxyméthylcellulose, Séphadex CM-25). Un seul exemple de recristallisation dans un mélange eau-acétone a été cité [45].

Tous ces composés ont donné lieu à différentes applications :

- Etude des potentialités de leur complexe de cuivre ou de nickel (reconnaissance moléculaire et propriétés catalytiques) [17, 44, 45],
- étude de leur capacité de transacylation [42],
- greffage sur des phases stationnaires pour la chromatographie liquide. [24].

En 1993, BONOMO *et al.* [44] synthétisent une β -CD substituée par un bras éthylène diamine (Tableau 5) et étudient leur composé en RMN ^1H ainsi que ses analogues mono et diprotonés. Il ressort de cette étude qu'une liaison hydrogène doit exister entre les deux azotes de la chaîne éthylène diamine; elle persiste malgré la protonation du groupe amine primaire qui s'effectue avant celle de l'amine secondaire. Par contre, cette liaison hydrogène est brisée lors de la protonation de l'amine secondaire.

L'éthylène diamine a aussi été utilisée pour préparer des CDs disubstituées et des dimères, nous décrivons deux exemples de synthèses et d'applications :

TABUSHI *et al.*, en 1979, [46] préparent, à partir de la 6^A, 6^{C(D)}-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- β -CD (**1**), une CD portant deux bras éthylène diamine (**2**) par réaction de (**1**), dans l'éthylène diamine, à 50°C pendant 3h. Le rendement de la réaction est de 80% après purification. Par la suite, les auteurs ont fait réagir (**2**) avec (**1**) dans un mélange DMF-Pyridine à chaud pendant trois jours pour obtenir un dimère de CDs "ponté" par deux bras éthylène diamine (**3**) (Figure 8). Ce dimère (**3**) est en réalité un mélange d'isomères, car la CD initiale nécessaire à sa synthèse est déjà un mélange de deux isomères. Une molécule avec trois sites de reconnaissance potentiels a été réalisée : deux sites hydrophobes (les cavités des CDs) et un site constitué par les bras espaceurs. Les capacités de liaison de cette molécule ont été testées. La coopérativité des sites de reconnaissance envers les molécules incluses a été également démontrée par les valeurs des constantes de complexation obtenues.

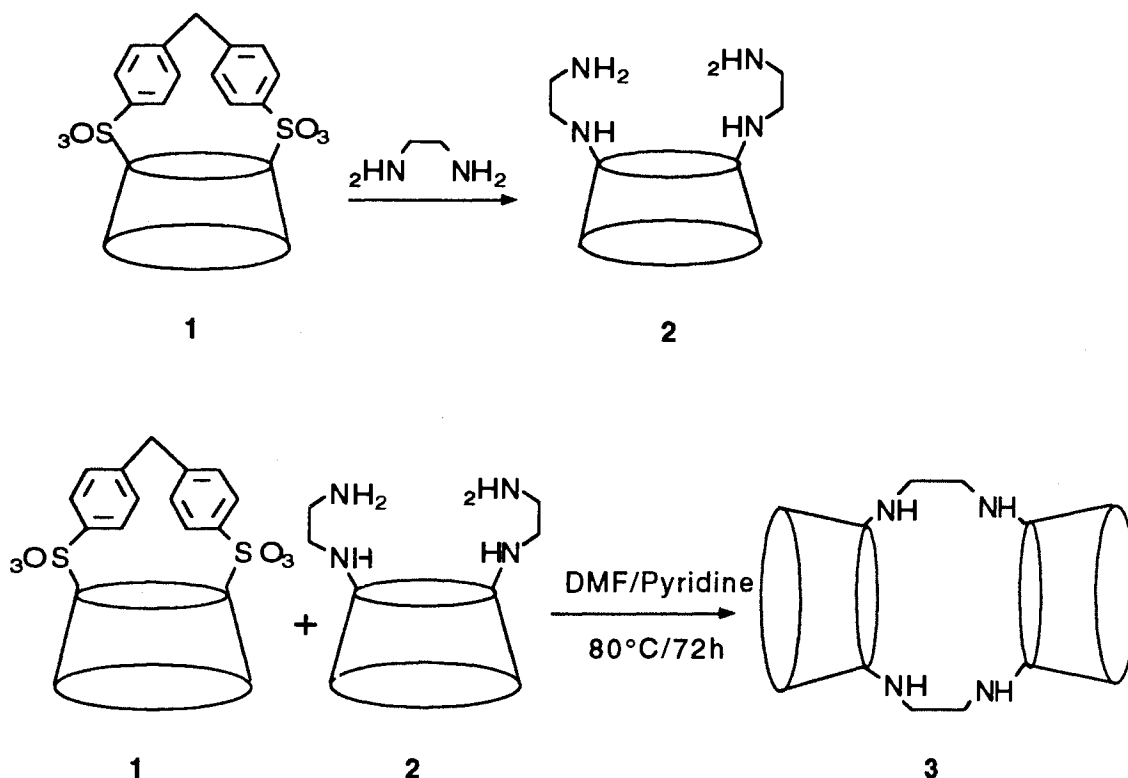


Figure 8 : Schéma de synthèse d'une CD "pontée" par deux bras éthylène diamine [46].

En 1994, BEESON et CZARNIK [42] synthétisent un dimère de β -CD "ponté" par un bras éthylène diamine à partir de la monotosyl- β -CD et de la β -CD substituée par une éthylène diamine. La réaction s'effectue dans le DMF, sous pression, à 80°C et en présence de carbonate de potassium (Figure 9), le rendement est de 34%. En dehors de leur capacité de transacylation, ces composés ont aussi été étudiés comme super oxyde-dismutase artificielle.

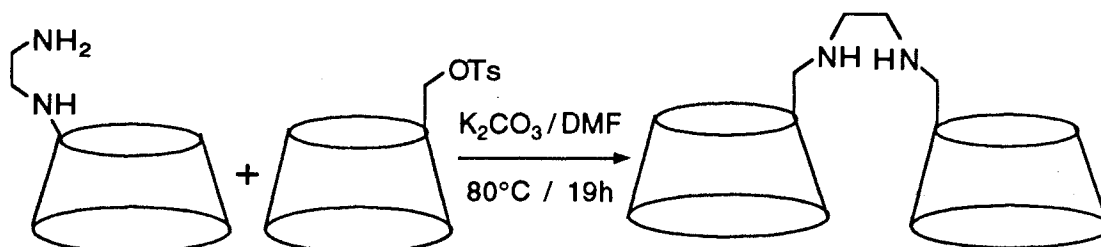


Figure 9 : Schéma de synthèse d'une CD "pontée" par un bras éthylène diamine [42].

En ce qui concerne les dérivés alkylamines, PETTER *et al.* [13] ont décrit la synthèse de plusieurs de ces dérivés (hexadécylamino, octylamino) lors de leur étude sur leur capacité à interagir avec des molécules aromatiques anioniques lorsqu'ils sont sous forme protonée. Ils ont ainsi mis en évidence un mécanisme de type allostérique par formation d'aggrégats. Ces dérivés ont été synthétisés à partir de la monotosyl- β -CD et de l'alkyl amine désirée, dans le DMF en présence de 4-diméthylaminopyridine et de KI. Après purification par chromatographie d'échange d'ions, les rendements varient de 7 à 25%.

Des dérivés N-méthylés et N-éthylés de la β -CD ont aussi été synthétisés de manière analogue [16] puis ont été transformés en dérivés formylés par action d'un mélange anhydride formique/ anhydride acétique pour obtenir des composés neutres et solubles dans l'eau.

Enfin, la synthèse d'une β -CD substituée par une triéthylène tétramine [47] a été décrite par réaction du dérivé monotosylé avec la triéthylène tétramine dans le méthanol à 75-80°C. Son complexe avec le sel de sodium de l'acide 4,4'-diaminostilbène-2,2'-disulfonique a été étudié dans le but d'améliorer la stabilité photochimique de ce composé, utilisé comme agent blanchissant dans l'industrie textile.

2-Perazidation et peramination

Les méthodes principales de peramination des CDs sont décrites par BOGER *et al.* en 1978 [27] dans leur étude sur la substitution sélective de tous les hydroxyles primaires de l' α - et de la β -CD. Pour cela, deux stratégies de synthèse différentes sont utilisées : une indirecte et une directe. Le schéma réactionnel conduisant à la peramino- α -CD par la voie indirecte est présenté dans la figure 10 :

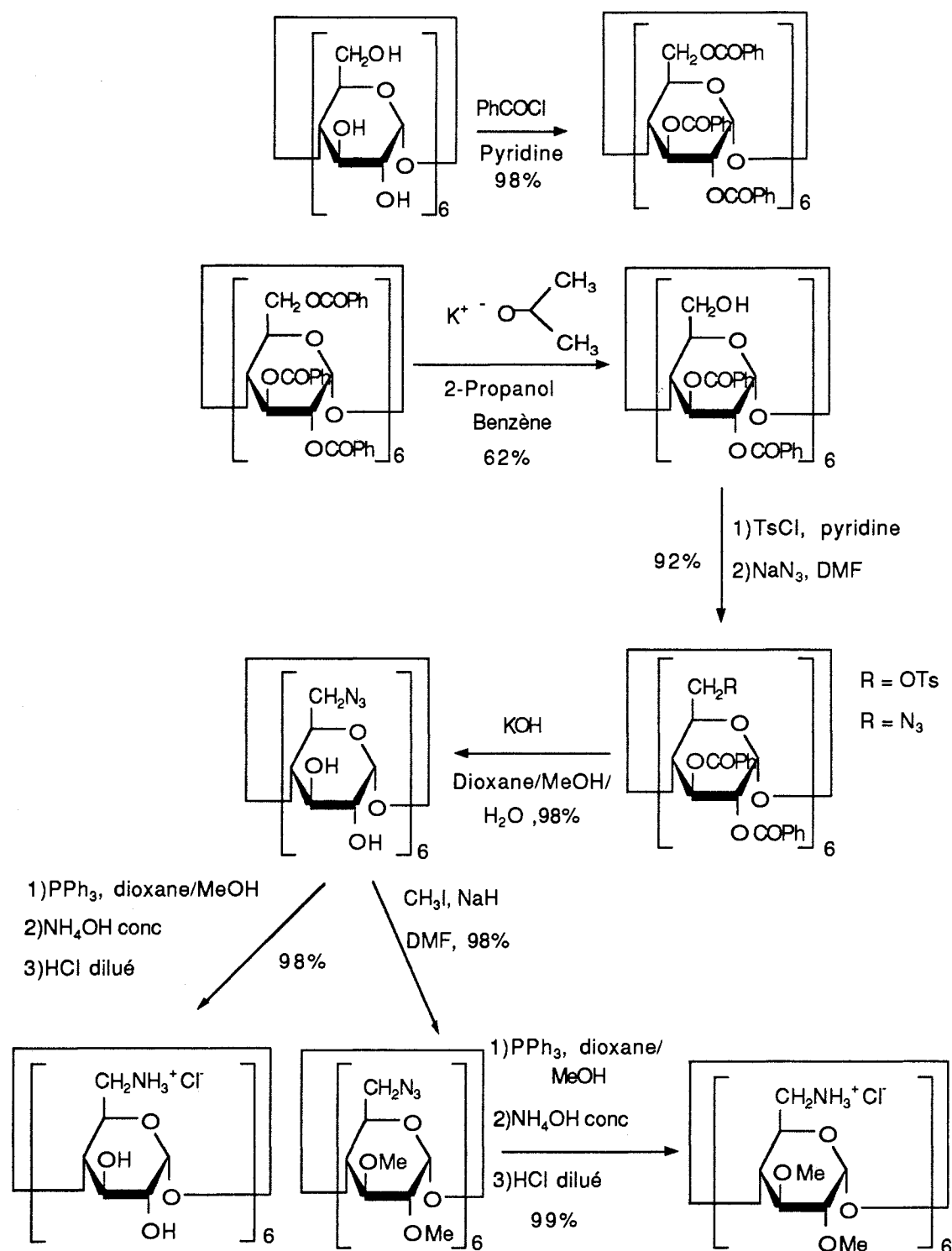


Figure 10 : Schéma de synthèse de la peramino- α -CD par la méthode indirecte [27].

L'intérêt de cette méthode réside dans son étape de déprotection sélective des hydroxyles primaires de l' α -CD perbenzoylée. Ainsi, un produit entièrement protégé sur ses hydroxyles secondaires, dont les hydroxyles primaires sont libres de réagir est obtenu. Le groupe benzoyle a été choisi en fonction de sa réactivité et de considérations d'ordre

stérique. En effet, les groupes benzoyles créent un encombrement stérique plus important sur la face des hydroxyles secondaires de la CD (diamètres des deux faces peu différents). La protection de tous les hydroxyles devrait encombrer la face supérieure beaucoup plus que la face inférieure de la CD. La déprotection des hydroxyles primaires devient dès lors de plus en plus facile si, par exemple, la première réaction de déprotection procède avec une certaine sélectivité. Donc les réactions suivantes sur la même molécule seront encore plus sélectives. Le choix du réactif de déprotection est aussi important. Les auteurs ont utilisé différentes conditions (solvant, base) pour effectuer leur déprotection. Ils ont trouvé que celle-ci était très efficace et rapide quand la réaction était menée avec l'isopropoxyde de potassium dans un mélange de 2-propanol et de benzène à 0°C pendant 12h.

Avec cette méthode, la peramino- α -CD est préparée en six étapes (perbenzoylation, déprotection sélective, pertosylation, perazidation puis réduction) à partir de l' α -CD native. Les rendements sont très élevés (>90%) à toutes les étapes de la synthèse.

Cette méthode a permis aux auteurs d'obtenir les dérivés perméthylés azidés et aminés de l' α -CD correspondants, avec de très bons rendements ainsi que des dérivés sélectivement perméthylés sur la face des hydroxyles primaires.

En ce qui concerne la stratégie directe, elle permet d'obtenir la peramino- α -CD en quatre étapes à partir de l' α -CD native comme le montre la figure 11 (p 26) :

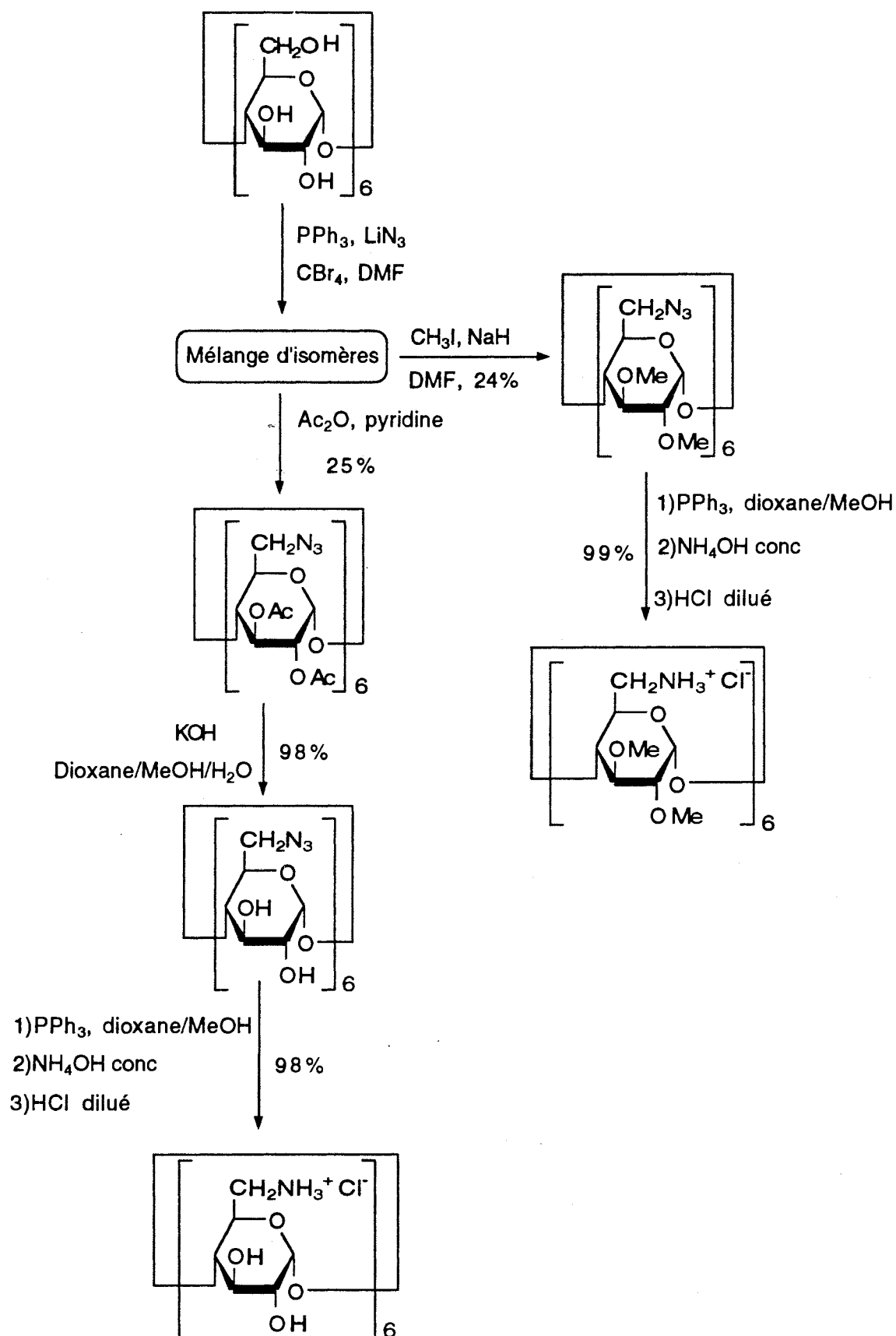


Figure 11 : Schéma de synthèse de la peramino- α -CD par la méthode directe [27].

Ici, la perazidation s'effectue directement sur la CD native, dans le DMF, à température ambiante avec la triphényl phosphine, l'azoture de lithium en excès et du tétrabromure de carbone. La réaction procède *via* l'activation progressive des hydroxyles sous forme de sels de phosphoniums suivie de leur déplacement nucléophile par l'azoture de lithium, ceci permet d'éviter un encombrement stérique trop important.

Cette méthode entraîne la formation d'un mélange d'isomères en plus du dérivé perazidé souhaité. Ce mélange est acétylé avant purification. Le dérivé perazidé est ainsi obtenu sous sa forme peracétylée avec un rendement de 25% donc très nettement inférieur à celui de la première méthode. La méthode de réduction de l'azide reste identique à celle décrite précédemment.

Ces deux stratégies ont aussi été appliquées à la β -CD. La stratégie indirecte n'a donné aucun résultat, les tentatives de déprotection sélective de la face primaire de la β -CD, dans les mêmes conditions que pour l' α -CD, ne fournissent qu'un mélange de produits. Ceci indique une mauvaise sélectivité qui pourrait s'expliquer par une diminution de l'encombrement stérique de la face des hydroxyles secondaires ou une approche favorisée des réactifs par l'intérieur de la cavité d'où un clivage non sélectif des esters.

La méthode directe, quant à elle, fournit de meilleurs rendements avec la β -CD (double pour la perazidation), la sélectivité pour les hydroxyles primaires est plus grande dans le cas de la β -CD. Ceci est imputé à un réseau de liaisons hydrogènes plus dense entre les hydroxyles secondaires de la β -CD les rendant moins réactifs.

Donc, les auteurs ont développé deux méthodes de persubstitution sélectives, chacune plus adaptée à un type de CD en fonction de la taille des cycles et des effets stériques des réactifs par rapport à la CD.

En 1995, un brevet canadien a été déposé [48] concernant la synthèse d' α -CD aminées dans des conditions identiques à celles décrites par BOGER dans sa méthode directe.

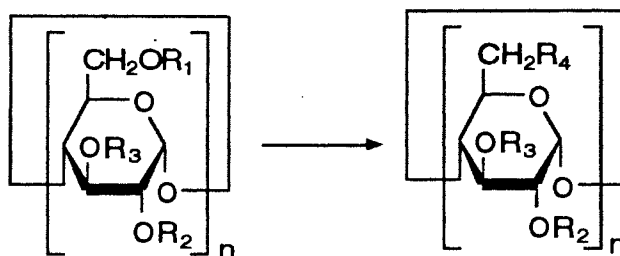
Il existe d'autres méthodes pour fonctionnaliser les CDs par les groupements azido ou amino, elles sont rassemblées dans le tableau 6.

L'hexakis(2,3-di-O-acétyl-6-azido)- α -CD [28] (tableau 6) a été préparée par une stratégie de synthèse différente de celles de BOGER. L'hexakis(6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)- α -CD a d'abord été synthétisée et acétylée puis désilylée. Enfin, la face des hydroxyles primaires a été mésylée ou tosylée.

D'après le tableau 6, il apparaît que le brome est suffisamment bon nucléofuge pour être déplacé par l'azoture de sodium bien que d'autres auteurs aient utilisé une periodo- β -CD [21], l'iode étant meilleur nucléofuge que le brome mais ceci implique une étape supplémentaire d'iodation de la perbromo- β -CD.

De plus si les dérivés azidés et acétylés peuvent facilement être déacétylés pour permettre une méthylation, ils peuvent être aussi réduits en amine [49]. Cette méthode constitue donc une bonne alternative à celle de BOGER pour les β -CD.

Tableau 6 : Perazidation et peramination des CDs



n	R ₁	R ₂ =R ₃	R ₄	Conditions	Rdt	Réf
6	OMs	Ac	N ₃	DMF-NaN ₃ 4 jours-100°C	84%	[28]
6	OTs	Ac	N ₃	DMF-NaN ₃ 4 jours-100°C	84%	[28]
7	Br	Ac	N ₃	DMF-NaN ₃ excès 36h-90°C	82%	[49]
7	Br	H	N ₃ , NH ₂	NaN ₃ puis PPh ₃ - NH ₃ aq.conc	93% (N ₃)	[50]
7	N ₃	CH ₂ Ph	NHBoc	PtO ₂ -(Boc) ₂ O- MeOH/dioxane-H ₂ -6,5h- 40/50°C	21%	[51]
7	I	H	N ₃ , NH ₂	DMF-NaN ₃ puis PPh ₃ - NH ₃ aq.conc	NP	[21]

Boc : Tert-Butoxycarbonyl

En 1992, PARROT-LOPEZ *et al.* [50] synthétisent une peramino- β -CD amphiphile substituée sur ses hydroxyles secondaires par des chaînes alkyléthers. Ce dérivé est synthétisé à partir de la perbromo- β -CD *via* le dérivé perazidé suivi de l'alkylation des hydroxyles secondaires et de la réduction des fonctions azides.

Il apparaît donc que ces fonctions permettent aisément la substitution sélective des hydroxyles de la face secondaire ce qui a l'avantage d'éviter une stratégie plus longue de protection-déprotection-substitution de la face des hydroxyles primaires.

3- Azidation et amination régiosélectives

En 1977, TABUSHI [52] décrit la synthèse de plusieurs α - ou β -CD fonctionnalisées par des groupements amines ou alkyl amines. Le produit de départ de la synthèse est la 6^A, 6^{C(D)}-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- α - ou β -CD. Elle réagit avec un large excès de nucléophile dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (pH 10), pendant 24h à 50°C pour fournir les composés désirés (diazido, diéthylamino, dimercaptoéthylamino) avec un rendement de 80%. Yi *et al.* [53] ont utilisé la 6^A, 6^C-O,O'-(4,4'-diphénylméthanesulfonyl)- β -CD décrite par TABUSHI, préalablement méthylée sur la face des hydroxyles secondaires pour préparer la 6^A, 6^C-diazido- 6^A, 6^C-didéoxy-heptakis(2,3-di-O-méthyl)- β -CD. La réaction s'effectue dans le DMF avec un excès d'azoture de sodium pendant 100 min à 120°C (Rdt : 81%). Les diazido-CDs peuvent être réduites par hydrogénation sur platine (50 atmosphères, t.a.) pour fournir le dérivé diaminé.

Les autres synthèses décrites [21, 35] passent toutes par une étape d'iodation avant l'étape d'azidation. Selon les positions de substitution sur la CD "chapeautée" initiale, il est possible d'obtenir des régioisomères différents de CDs aminées disubstituées ce qui peut être intéressant dans la conception d'enzymes artificielles.

Enfin, des dérivés polyaminés de β -CD sont obtenus, à partir des aldéhydes correspondants, par réduction au cyanoborohydrure de sodium dans l'eau [54]. Cette méthode permet d'introduire sept unités glucosamine sur la face supérieure de la β -CD.

4- Autres réactions d'amination

Dans cette section, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux CDs fonctionnalisées par des groupements hydroxylamines, oximes ou imines (bases de Schiff) et aux CDs substituées par des éthers-couronnes.

Les CDs fonctionnalisées par des groupements hydroxylamines ou oximes ont été obtenues par MARTIN et FIKES [55, 56].

Le dérivé portant une fonction hydroxylamine (Figure 12) est obtenu par réaction de l'hydroxylamine aqueuse sur la monotosyl- β -CD puis purifié par précipitation dans l'éthanol. Le dérivé portant une fonction oxime est préparé dans l'eau en présence d'ammoniaque concentré à partir du dérivé hydroxylamine suivi d'une oxydation à l'air [56]. Il peut aussi être préparé à partir de la monotosyl- β -CD *via* le monoaldéhyde [56, 57] dans l'hydroxylamine aqueuse. Un mélange des deux isomères (Z et E) est obtenu (Figure 12).

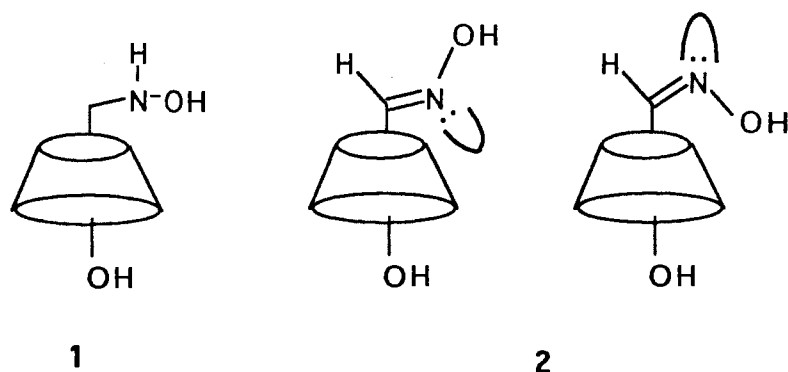


Figure 12 : Structure de la β -CD hydroxylamine **1** et isomères Z et E de la β -CD mono-oxime **2**.

Une synthèse de CD portant une ou sept fonctions imines a été décrite [58]. Elle est obtenue par action de la mono- ou de la peramino- β -CD avec le salicylaldéhyde dans un mélange eau / éthanol. Les complexes de cuivre(II) de ces dérivés ont également été étudiés (Figure 13) [59].

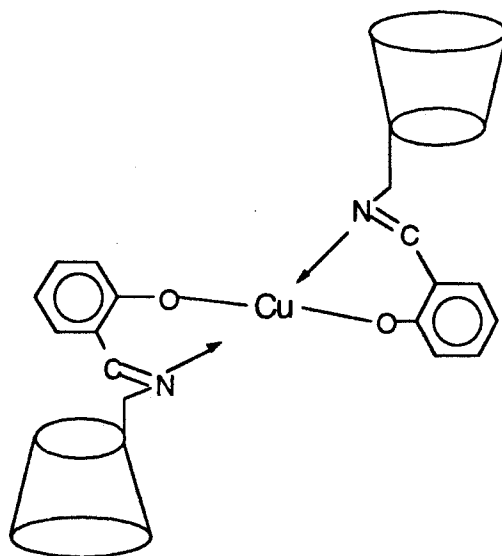


Figure 13 : Représentation schématique de la structure supposée du complexe [59].

Enfin, il existe un exemple de β -CD substituée par un éther-couronne (le 1,4,10,13-tétraoxa-7,16-diazacyclo-octadécane) par un ou deux points d'ancrages [60, 61]. La réaction procède, selon les cas, *via* le dérivé monotosylé ou le dérivé diiodé, dans le DMF, entre 55 et 80°C, avec un large excès d'éther-couronne.

Ces molécules sont intéressantes car elles comportent deux sites de reconnaissance moléculaire : un site hydrophobe (la CD) et un site complexant de cations (l'éther-couronne) (Figure 14). Les capacités de complexation des *p*-nitrophénolates de

métaux alcalins [60] et l'euprium [62] ont été étudiées sur le composé de la figure 14. Dans les deux cas, la complexation d'un noyau aromatique dans la cavité de la CD facilite la complexation du cation dans l'éther-couronne. Une coopérativité entre les sites est également constatée puisque les constantes de complexation sont fortement augmentées par rapport à celles obtenues avec la β -CD native. Enfin, l'émission de fluorescence de l'ion euprium est fortement augmentée par l'inclusion du benzène dans la CD ce qui traduit l'existence d'un processus de transfert d'énergie (A.E.T.E.) du noyau aromatique vers l'ion euprium (effet d'antenne).

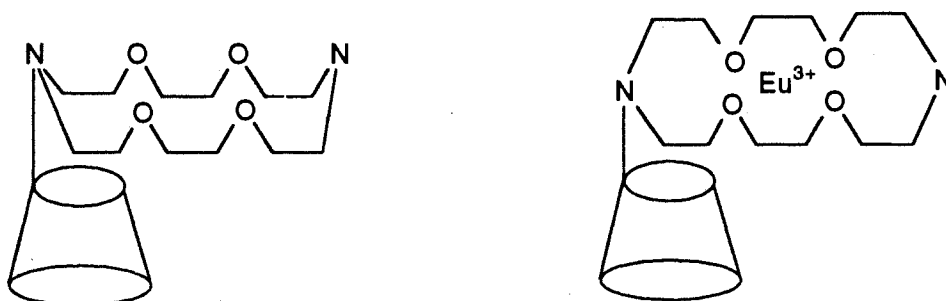


Figure 14 : Schéma d'une CD substituée par un éther-couronne et de son complexe d'Euprium (III)[60].

III- Halogénéation

Les dérivés halogénés servent d'intermédiaires de synthèse pour la préparation de dérivés de CDs plus complexes ou portant une autre fonction du fait de leur bonne réactivité envers les nucléophiles. Ils peuvent aussi être réduits pour fournir les 6-déoxy-CDs. Nous allons ici décrire les différentes méthodes permettant de les obtenir.

1- Mono-halogénéation

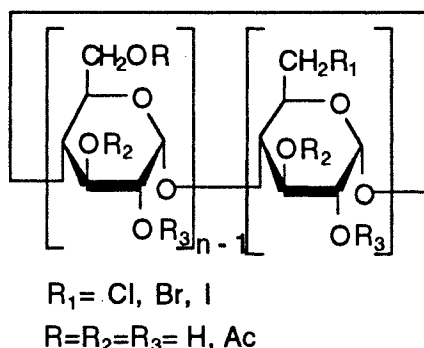


Figure 15 : Structure générale des CDs mono-halogénées

D'une manière générale, ils sont obtenus à partir du dérivé monotosylé ou monomésylé correspondant.

Les dérivés monochlorés et monobromés de l' α -CD ont été obtenus par MELTON et SLESSOR [5, 16] en faisant réagir la monotosyl- α -CD avec le chlorure de tétraméthylammonium ou le bromure de lithium respectivement, dans le DMF, à chaud. Les dérivés mono et périodés sont issus de la réaction du dérivé tosylé correspondant avec l'iodure de sodium dans l'eau.

Le dérivé peracétylé mono-iodé de la β -CD décrit par CRAMER [5] est obtenu à partir du dérivé monomésylé par action de l'iodure de sodium. Celui-ci a aussi été décrit par COTTAZ [25], lors d'une synthèse multi-stades comprenant les étapes de tritylation, acétylation, détritylation, mésylation puis iodation par l'iodure de sodium, dans le DMF, à 100°C. Le rendement, après purification par chromatographie sur gel de silice est de 87%. Ce composé a ensuite été couplé à des monothiosaccharides. Ce dérivé a aussi été synthétisé [18] en trois étapes à partir de la monotosyl- β -CD. Le groupe tosyl est alors substitué par l'iodure de sodium en excès dans l'anhydride acétique à reflux. Cette méthode a l'avantage d'économiser deux étapes et de ne pas nécessiter l'emploi de méthodes chromatographiques pour la purification des produits. Les deux voies donnent de très bons rendements (>80%).

Enfin, signalons que la mono-iodo- β -CD a aussi été obtenue par réaction de la monotosyl- β -CD en présence d'un large excès d'iodure de potassium dans le DMF [14, 63].

2-Per-halogénéation

La première β -CD périodée (et peracétylée sur la face des hydroxyles secondaires) a été synthétisée par CRAMER *et al.* à partir du dérivé permésylé correspondant avec l'iodure de sodium dans l'anhydride acétique. MELTON et SLESSOR ont préparé les dérivés perchlorés et périodés de l' α -CD à partir de la pertosyl- α -CD dans les conditions décrites plus haut pour les dérivés mono-halogénés. Le dérivé périodé est ainsi obtenu avec un rendement de 50% après recristallisation [5].

Les principales méthodes de per-halogénéation des CDs sont décrites dans le tableau 7.

Il existe deux méthodes générales de per-halogénéation des CDs natives qui utilisent un complexe de type Vilsmeier-Haack (processus général d'activation des alcools) pour le déplacement nucléophile. Le mécanisme de la réaction est présenté dans la figure 16.

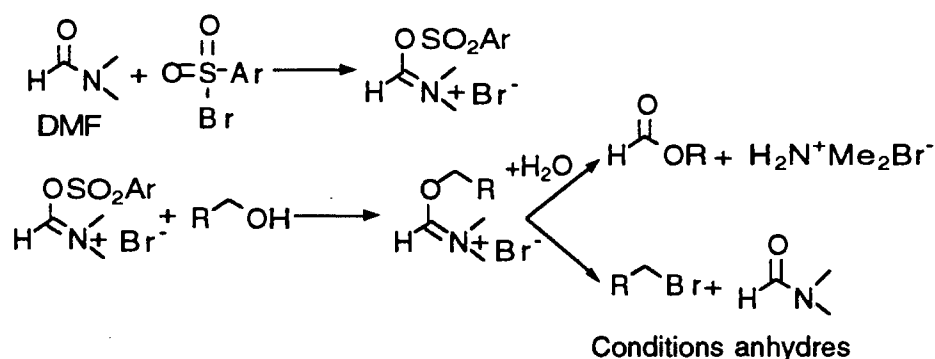


Figure 16 : Mécanisme d'activation des alcools par formation d'un complexe type Vilsmeier-Haack.

La réaction procède *via* la formation *in situ* d'un bromure de diméthylammonium bromé, les méthodes sont les suivantes (tableau 7) :

- celle développée par TAKEO *et al.* [64] qui utilise un halogénure de méthane sulfonyle,
- celle développée par GADELLE *et al.* [65] qui utilise un halogène et de la triphénylphosphine.

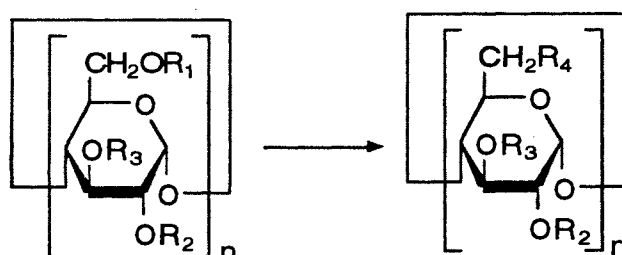
Les esters de formates formés sont détruits par addition de méthanolate de sodium.

La procédure de GADELLE a, par la suite, été modifiée notamment au niveau de la purification, les rendements sont aussi supérieurs, de l'ordre de 93% [66]. Une modification de ce protocole a permis récemment la synthèse de l'heptakis(2-O-méthyl-6-déoxy-6-iodo)- β -CD à partir du dérivé 2-O-méthyl correspondant issu lui-même d'une synthèse multi-stades à partir de la β -CD silylée en position 2 et 6 [67].

Les réactions de per-halogénéation peuvent aussi s'effectuer sur des CDs déjà fonctionnalisés [28, 68] sur la face des hydroxyles primaires et/ou secondaires. Dans ce cas, l'agent d'halogénéation est un sel d'halogénure (chlorure de lithium, bromure et iodure de sodium, tableau 7).

D'autres auteurs [69] (tableau 7) ont décrit la synthèse de CDs alkylées sur la face des hydroxyles secondaires par une stratégie multi-étapes de protection-déprotection. L'intermédiaire-clé de cette synthèse est une CD protégée par des éthers silylés sur sa face primaire. Il s'agit d'alkyler les hydroxyles secondaires de cette CD puis de déprotéger les hydroxyles primaires que l'on peut alors fonctionnaliser.

Tableau 7 : Per-halogénéation des CDs



n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Agent d'halogénéation	Conditions	Rdt (%)	Réf
6	Ts	H	H	Cl	(CH ₃) ₄ N ⁺ Cl ⁻	DMF	NP	[5]
6	H	H	H	Br	CH ₃ SO ₂ Cl (30éqs)	DMF-18h-65°C MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	>95	[64]
6	H	H	H	Cl	CH ₃ SO ₂ Cl (30éqs)	DMF-18h-65°C MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	>95	[64]
7	H	H	H	Br	CH ₃ SO ₂ Br (35éqs)	DMF-18h-65°C MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	>95	[64]
7	H	H	H	Cl	CH ₃ SO ₂ Cl (35éqs)	DMF-18h-65°C MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	>95	[64]
6	Ts	Ac	Ac	Cl	LiCl	DMF-3 à 5h-100°C	>80	[28]
6	Ms	Ac	Ac	Br	NaBr	DMF-3 à 5h-100°C	>80	[28]
6	Ms	Ac	Ac	I	NaI	DMF-3 à 5h-100°C	>80	[28]
6	H	H	H	Br	Br ₂	PPh ₃ -DMF-15h-80°C, MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	88	[65]
7	H	H	H	I	I ₂	PPh ₃ -DMF-15h-80°C, MeO ⁻ Na ⁺ , Méthanol	88	[65]
7	Cl	H	Me	I	NaI	Butanone-3 jours-reflux	70	[68]
7	H	H	H	Cl	CH ₃ SO ₂ Cl (15éqs)	Imidazole-DMF-24h-70°C NaOH aq.-2h	90	[70]
6,7 8	H	C ₅ H ₁₁	I	I	I ₂	PPh ₃ -Imidazole-Toluène-70°C	NP	[69]

En 1994, KHAN et D'SOUZA [70] (tableau 7) décrivent la synthèse de la perchloro-β-CD *via* un complexe de type Vilsmeier-Haack qui permet d'éviter la formation de produits formylés secondaires. Le β-CD réagit à 70°C, avec un mélange équimolaire de chlorure de méthane sulfonyle et d'imidazole dans le DMF. Le même

dérivé est obtenu, dans les mêmes conditions, à partir des chlorures de benzène sulfonyle et de β -naphtalène sulfonyle. Le mécanisme de la réaction est présenté dans la figure 17:

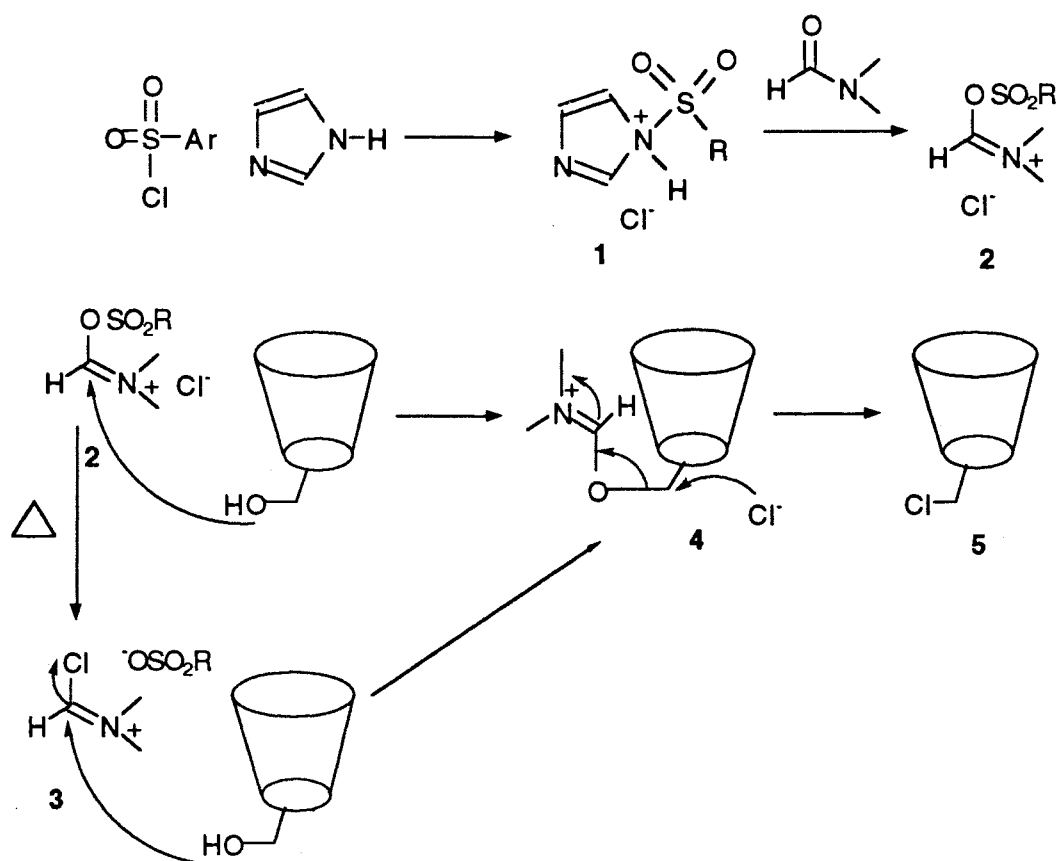


Figure 17 : Mécanisme de la réaction de chloration [69].

L'imidazole est destiné à former avec le chlorure de sulfonyle le complexe (1) qui réagit avec une molécule de DMF pour former un adduit (2) de Vilsmeier-Haack. Cet adduit réagit soit directement, soit subit un réarrangement thermique qui fournit (3). Les intermédiaires (2) et (3) réagissent ensuite avec un alcool primaire pour donner un halogénure d'alkyle *via* l'intermédiaire (4). Le carbone 6 de la CD dans (4) est ainsi activé et peut donc subir un déplacement nucléophile par l'ion Cl^- pour donner l'halogéno-CD (5). Il est suggéré que l'utilisation de l'imidazole permet d'éviter les réactions secondaires de sulfonation et de formylation de la CD.

Enfin, des dérivés régiosélectivement diiodés ont aussi été synthétisés comme intermédiaires réactionnels à partir de CD "chapeautées" d'une manière analogue à celle décrite pour la synthèse de la mono-iodo- β -CD [21, 35]. Un exemple est donné par la figure 18 :

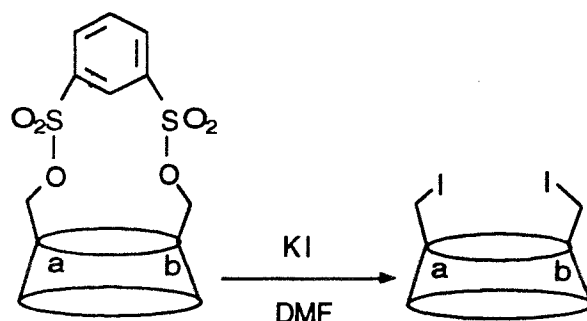


Figure 18 : Synthèse d'une CD diiodée [35].

IV- Oxydation et carboxylation.

Plusieurs CDs fonctionnalisées, en position 6, par des chaînes comportant une fonction aldéhyde ou acide ont été décrites [5]. Par contre, peu de méthodes existent pour accéder à la fonction aldéhyde ou acide directement sur la CD. Ce sont ces dernières méthodes que nous allons présenter.

1- Oxydation

MELTON et SLESSOR [5] ont décrit la première synthèse d'une α -CD fonctionnalisée par une fonction aldéhyde. Celle-ci est obtenue *via* la déamination oxydative de la mono-amino- α -CD par la nynydrine dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ou par photolyse du mono-azide.

D'autres synthèses, beaucoup plus rapides, ont depuis été décrites dans la littérature et sont présentées dans le tableau page 37.

MARTIN et CZARNIK [71] (Tableau 8) ont utilisé la réaction de Nace (oxydation par l'intermédiaire du DMSO) (Figure 19), pour préparer la CD mono-aldéhyde. La collidine, base non nucléophile, neutralise l'acide formé pendant la réaction et empêche ainsi la décomposition de l'aldéhyde.

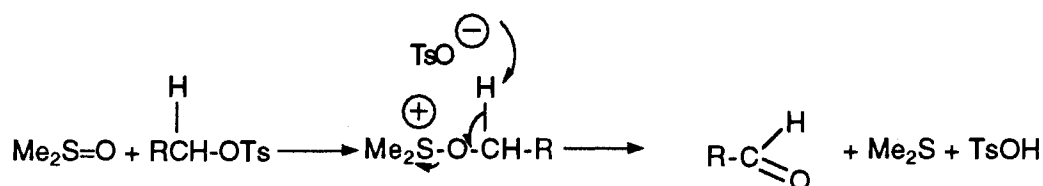
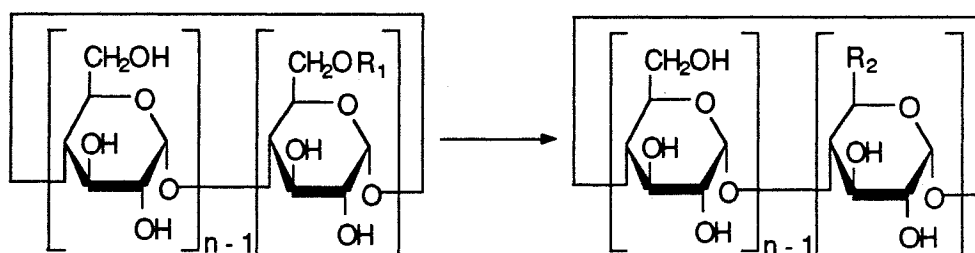


Figure 19 : Mécanisme de la réaction de Nace [72].

En utilisant la même réaction, les auteurs ont synthétisé une β -CD portant deux fonctions aldéhydes (isomère A,D) en partant de la biphenyl-4,4'-disulfonyl- β -CD [57].

Tableau 8 : Mono-oxydation des CDs.



n-1	R ₁	R ₂	Conditions	Rdt	Réf
6	Ts	CHO	DMSO, collidine- 90min.-135°C	64%	[71]
6	Ts	CHO	DMSO, diisopropyléthylamine (cat.) 3jours-80°C	85%	[73]
5,6,7	H	CHO	DMSO ou DMF- PDM (2éqs.)- 1h-t.a.	85 à 100%	[74]

Une méthode analogue de synthèse de la β -CD mono aldéhyde a également été publiée par HUFF et BIENIARZ [73]. L'addition d'eau au mélange réactionnel entraîne la formation de l'hydrate correspondant.

L'étude des conditions de réaction met en évidence qu'un excès de base aboutit à la formation exclusive d'un aldéhyde oligosaccharidique linéaire α , β insaturé. Ils ont démontré également que le même résultat peut être obtenu en utilisant des bases particulières comme la triméthylamine N-oxyde. La réaction d'élimination semble procéder *via* la complexation de la base dans la cavité de la CD.

Enfin, un protocole menant directement aux α -, β - et γ -CDs mono-aldéhyde à partir des CDs natives a été décrit [74] (Tableau 8). Il utilise le periodinane de Dess-Martin (PDM). Le mécanisme de la réaction est présenté dans le schéma suivant (Figure 20) :

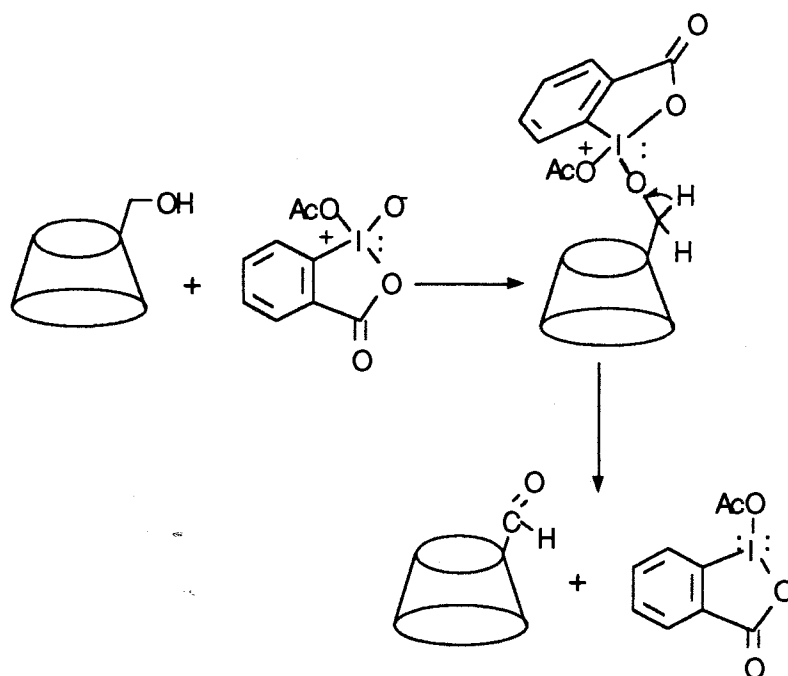


Figure 20 : Mécanisme de la réaction d'oxydation par le PDM [74].

Cette réaction a l'avantage d'être simple et rapide. Son rendement est très bon (85 à 100%) mais peut varier en fonction de la qualité du PDM utilisé. Son désavantage réside dans la difficulté à éliminer le periodinane et les solvants complexés dans la cavité de la CD. Ceci nécessite plusieurs précipitations successives suivies d'une lyophilisation.

Ces dérivés monocarboxaldéhyde ont plusieurs avantages :

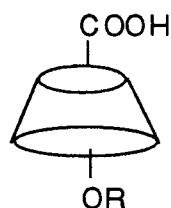
- ils sont très solubles dans l'eau
- ils peuvent aisément être couplés aux protéines ou aux biomolécules dans des conditions douces *via* la formation de bases de Schiff ou d'hydrazones suivie de leur réduction.

Notons que la β -CD peraldéhyde en position 2,3 a été décrite *via* l'oxydation periodique de la β -CD native dans l'eau [16, 54]. L'unité glucose est alors ouverte entre les positions 2 et 3 et un cycle linéaire est obtenu.

2- Carboxylation.

Il existe plusieurs dérivés de CDs portant des groupes carboxyles (Figure 21) mais, le plus souvent, ce sont des mélanges de composés de degrés de substitution différents [5, 75]. Les voies permettant d'accéder aux dérivés mono ou régiosélectivement fonctionnalisés par des fonctions carboxyles sont rares. Ces dérivés sont intéressants car ils peuvent permettre un couplage peptidique ultérieur et donnent

ainsi accès à d'autres molécules telles que transporteurs, enzymes artificielles ou bien sondes optiques.



R=H, Me

Figure 21 : Structure générale d'une CD carboxylée.

Les dérivés α - et β -CDs percarboxylés (5-carboxy-6-déoxy-CDs) ont été préparés par CASU *et al.* en 1978 [16] par oxydation catalytique sur platine des CDs natives avec, comme oxydants, le tétra-oxyde de diazote ou le dioxygène.

En 1989, KURODA *et al.* ont synthétisé les dérivés 5^A,5^D-dicarboxy- β -CD (native et perméthylée) [76]. La réaction procède *via* la photo-décomposition de la diazido-CD correspondante par irradiation avec une lampe à mercure moyenne pression, à température ambiante suivi d'un traitement avec l'hypochlorite de sodium (NaOCl) qui permet l'oxydation complète de la fonction aldéhyde. Le rendement est de 61% pour la CD non protégée et de 68% pour la CD perméthylée. Le dichlorure d'acide de ce dérivé [77] est également préparé pour la synthèse d'une molécule "sandwich" dans laquelle une porphyrine est liée à deux CDs (Figure 22).

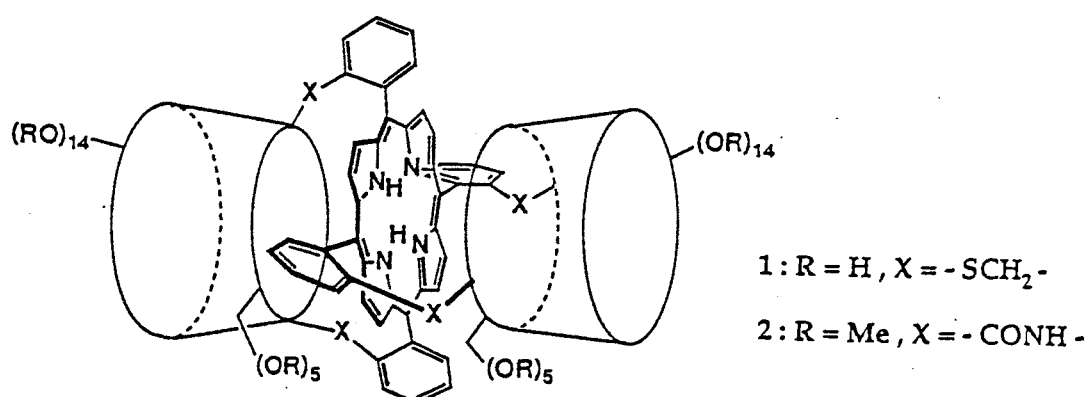


Figure 22 : Représentation d'une molécule "sandwich" [77].

Cette méthode est générale et peut être utilisée avec tous les dérivés de CDs portant une fonction azide. De plus, la réduction des fonctions acides carboxyliques donnent accès à des dérivés perméthylés possédant des fonctions alcools primaires libres capables de subir d'autres modifications (*e.g.* sulfonylation).

Le même dérivé a été préparé en 1995 [57] à partir du dialdéhyde correspondant, dans un tampon phosphate (pH 6) par le dibrome. La réaction dure cinq jours à température ambiante et à l'obscurité. Le rendement est de 20% après purification. La β -CD monocarboxylée en position 6 a été obtenue dans les mêmes conditions avec un rendement de 24%.

Enfin, des CDs substituées par une ou plusieurs fonctions thioglycoliques ont été décrites. Ce sont des intermédiaires de synthèse pour diverses applications : enzymes artificielles [78], assemblages supramoléculaires organisés par paires d'ions (hétérodimères) [79] (Figure 23), synthèse d'hétérodimère d' α - et de β -CD [80].

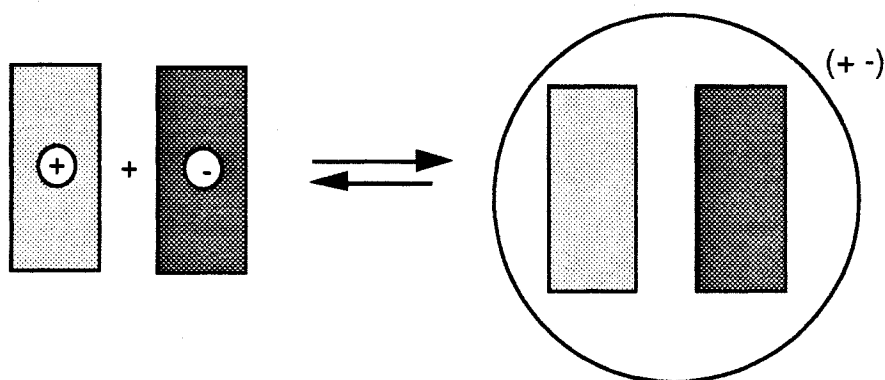


Figure 23 : Formation supposée d'un hétérodimère par interactions entre deux CDs portant des charges opposées [79].

V- CDs sulfatées et phosphorylées

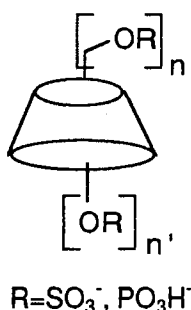


Figure 24 : Représentation schématique de CDs anioniques

Les CDs polysulfatées et polyphosphorylées (Figure 24) sont le plus souvent des mélanges de produits [81] de différents degrés de substitution, les deux faces de la CD étant modifiées indifféremment. Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthodes de synthèse permettant d'accéder à des composés régiosélectivement substitués. Ils ont, malgré tout des applications potentielles intéressantes, notamment dans le traitement du

SIDA en tant qu'inhibiteurs de la replication du virus [82, 83, 84, 85, 86]. C'est, à notre connaissance, le seul exemple de CDs modifiées possédant une activité pharmacologique intrinsèque établie. D'autres applications potentielles ont été décrites pour les thérapies anti-cancéreuses [87] ou les dysfonctionnements d'ordre immunologique [16].

Ces dérivés peuvent être obtenus par deux voies :

- soit par réaction de la CD avec l'acide chloro-sulfonique dans la pyridine [5, 54, 81],
- soit par utilisation directe du complexe trioxyde de sulfure-pyridine dans la pyridine [82, 83, 84].

Ces dérivés peuvent aussi être synthétisés par la chimie des micro-ondes en milieu organique ou aqueux [16].

A notre connaissance, le seul exemple de mono-6-sulfo- β -CD décrit dans la littérature a été préparé à partir du dérivé monocarboxaldéhyde correspondant par réaction avec NaHSO_3 dans l'eau [57].

Des dérivés sufoalkyléther de la β -CD ont aussi été préparés puis caractérisés par électrophorèse capillaire [88]. Ils sont préparés à partir de la CD native et d'alkyl sultone en solution aqueuse alcaline, à chaud. Les degrés moyens de substitution varient de quatre à sept en fonction de la stœchiométrie des réactifs. La préparation d'un mélange de CDs substituées par des chaînes sulfoéthyléther a aussi été rapportée par réaction de la β -CD avec le 2-chloro-éthanesulfonate en présence de pyridine dans le toluène [5].

En ce qui concerne les CDs substituées par des phosphates, CRAMER et HENNRICH [5] ont préparé un mélange de 2-O et 3-O-phosphoryl- β -CDs par réaction de diarylpyrophosphates avec la β -CD native. SIEGEL *et al.* ont ensuite préparé ces mêmes dérivés [16] par réaction du bis-(*m*-nitrophényl) phosphate sur la β -CD en milieu alcalin, pendant plusieurs jours (Figure 25). Les deux dérivés ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions.

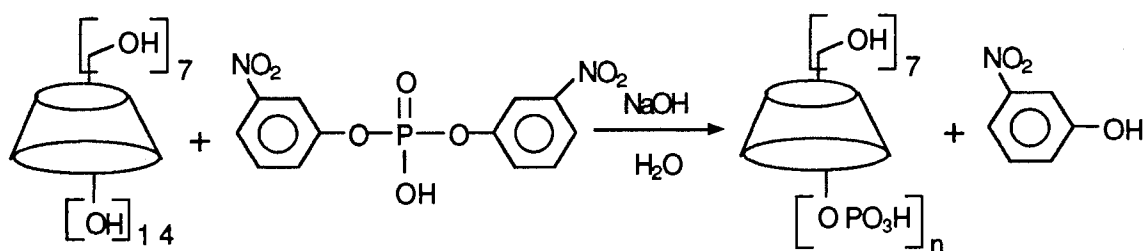


Figure 25 : Schéma de la réaction de phosphorylation de SIEGEL.

Ces auteurs ont aussi préparé la mono-6-O-phosphoryl- β -CD par réaction de la β -CD avec le diphénylphosphorochloridate dans la pyridine suivie de l'hydrogénation sur platine, dans l'éthanol, du dérivé mono-(6-O-diphénylphosphoryl)- β -CD. La même réaction, en large excès de diphénylphosphorochloridate, permet la préparation du dérivé persubstitué [5].

Une autre méthode d'introduction de groupes phosphates sur les β -CDs natives et alkylées [54] utilise le triphénylphosphate en solution aqueuse alcaline et permet d'accéder à des composés de différents degrés de substitution en fonction de la quantité de réactif ajouté.

Enfin, la synthèse de dérivés polyphosphatés de la β -CD a été décrite par la réaction de l'oxychlorure de phosphoryle avec la β -CD dans la pyridine à température ambiante [84]. Le degré de substitution des composés obtenus est supérieur si l'on utilise le dioxane tout en allongeant le temps de réaction [54].

VI- Les mercapto-cyclodextrines.

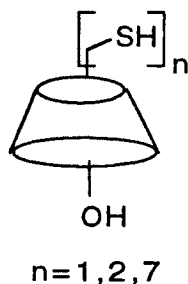


Figure 26 : Structure générale des mercapto-CDs

A notre connaissance, il n'existe qu'une seule méthode permettant d'accéder aux CDs fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions thiols libres (Figure 26). Elle procède *via* un intermédiaire isothiuronium qui est hydrolysé pour fournir la fonction thiol libre.

Ainsi, la mono-6-mercapto- β -CD a été synthétisée à partir du dérivé monotosylé par réaction avec la thiourée suivie d'une hydrolyse basique du sel d'isothiuronium intermédiaire [5]. De la même façon, il est possible d'obtenir le dérivé persubstitué (sept fonctions thiols) en partant des β -CD périodée ou perbromée précédemment décrites.

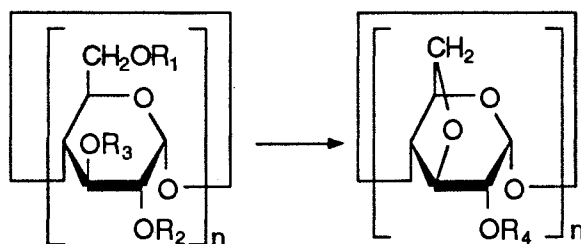
TABUSHI décrit la synthèse d'une β -CD portant deux fonctions thiols [52] avec une réaction analogue en partant d'une CD "chapeautée". L'intermédiaire isothiuronium est décomposé par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium, à 50°C. La dimercapto- β -CD est ensuite purifiée par chromatographie.

VII- Déshydratation et réduction des CDs

1- Déshydratation

Les 3,6-anhydro-CDs forment un nouveau type de récepteurs moléculaires de par leur structure. En effet, la liaison en 3,6 conduit les hydroxyles en position 2 de la CD à s'orienter en position axiale, vers l'intérieur de la cavité. La densité électronique est donc augmentée et, par conséquent, les propriétés de complexation de ces molécules sont modifiées par rapport à celles des CDs natives. De plus, ces composés sont plus solubles dans l'eau que les CDs natives. D'une manière générale, ces dérivés sont obtenus par l'attaque nucléophile de l'hydroxyle en position 3 sur les fonctions sulfonylées ou iodées présentes en position 6 (tableau 9).

Tableau 9 : Déshydratation des CDs.



n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Conditions	Rdt	Réf
7	OTs	H	H	H	NaOHaq.-2 jours-60°C	44%	[89]
6	OTs	PhCO	PhCO	H	Triéthylamine-MeOH-H ₂ O-4 jours-reflux	22%	[89]
6	OTs	H	H	H	H ₂ O-Ba(OH) ₂ (sat.)-3,5 jours-40°C	75%	[26]
7	OTs	H	H	H	MeOH-H ₂ O-KOH(1M)-2h-60°C	96%	[26]
6,7	I	H	H	H	DMSO-NaOH(1M)-6h-60°C	>75%	[65]
7	I	Me	H	Me	MeOH-H ₂ O-KOH(1M)-2 jours-60°C	98%	[67]

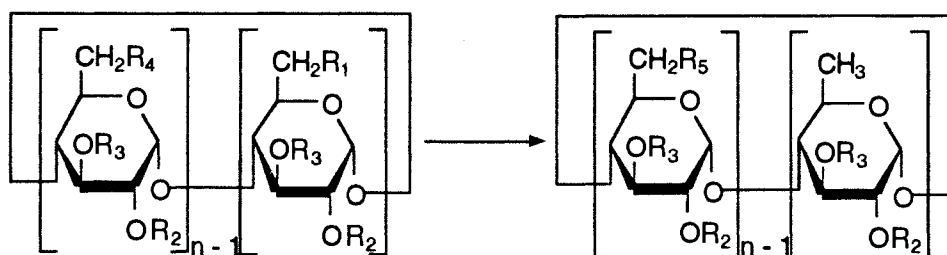
D'une manière générale, les per-3,6-anhydro-CDs sont obtenues en milieu alcalin, à chaud avec des rendements moyens à très bons (tableau 9). Elles sont purifiées par

CLHP [89] ou par ultrafiltration [65]. Plusieurs études en RMN ^1H ont été effectuées sur ces produits [65, 89] ce qui a permis de mettre en évidence le changement de conformation des unités glucose de la CD qui sont maintenant $^1\text{C}_4$ et non plus $^4\text{C}_1$ comme dans la β -CD native.

Enfin, dans une publication récente [90], YAMAMURA rapporte la synthèse de la pentakis(3,6-anhydro)- α -CD à partir du dérivé pentatosylé correspondant dans les conditions qu'il a utilisées pour la synthèse de l'heptakis(3,6-anhydro)- β -CD [26].

2- Réduction des CDs : Obtention de 6-déoxy-CDs

Tableau 10 : Méthodes de réduction des CDs : Obtention des 6-déoxy-CDs



n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Agent réducteur	Conditions	Rdt	Réf
6	I	H	H	OH	OH	H ₂ / Ni raney	pyridine-eau	Faible	[5, 16]
7	I	H	H	OH	OH	hydrure d'étain	réaction radicalaire H ₂ O	76%	[91]
7	I	Ac	Ac	I	H	Bu ₃ SnH	réaction radicalaire toluène-45min.	81%	[66]
6,7, 8	Br	Ac	Ac	Br	H	NaBH ₄	DMSO-70°C	~90%	[64]
6	Br/I	H	H	Br/I	H	NaBH ₄	DMSO-100°C-24h	86%	[66]
7	Br/I	H	H	Br/I	H	NaBH ₄	DMSO-100°C-24h	92%	[66]
7	SPh	Ac	Ac	SPh	H	H ₂ / Ni raney 25-30 KPa	oxolane-3-4 jours puis réacétylation	88%	[66]
6	I	Ac	Ac	I	H	H ₂ / Pd-C	MeOH-Dioxane- triéthylamine-t.a.	90%	[28]
6	Br	Ac	Ac	Br	H	Poudre de zinc	acide acétique- 70°C-2h	NP	[16]

D'une manière générale, les 6-déoxy-CDs sont obtenues par hydrogénation des halogéno-CDs. La réaction peut avoir un mécanisme radicalaire (tableau 10). Un seul exemple de per-6-déoxy- β -CD a été décrit à partir de la réduction d'une perthiophényl- β -CD par hydrogénation sur nickel de Raney dans l'oxolane [66] (tableau 10).

Les rendements de ces réactions sont toujours très élevés (>75%) que ce soit pour les mono- ou les per-6-déoxy-CDs.

VIII- Silylation et tritylation.

1- Silylation

La protection des alcools par des éthers silylés est une méthode répandue et très utile dans la chimie des "sucres" donc dans celle des CDs. En effet, elle permet, en particulier, d'obtenir des CDs dont tous les hydroxyles primaires sont protégés ce qui autorise la réaction exclusive des hydroxyles secondaires lors de modifications chimiques ultérieures et rend, également, la molécule soluble dans les solvants organiques. De plus, ce type de protection permet aux CDs silylées de réagir dans presque toutes les conditions employées, sans danger de déprotection accidentelle.

Le tableau 11 présente les méthodes permettant d'accéder à ces dérivés. Les CDs protégées par des éthers silylés sur leurs fonctions alcools primaires sont purifiées par chromatographie sur gel de silice [28, 92] ou par recristallisation [93, 94]. Elles sont utilisées comme intermédiaires dans la fonctionnalisation ultérieure des hydroxyles secondaires. Ainsi, elles peuvent être acétylées [28, 92, 94], ou méthylées [28]. Ce type d'intermédiaire a été utilisé lors de la synthèse de la 6-O- α -D-glucopyranosyl- α -CD [28].

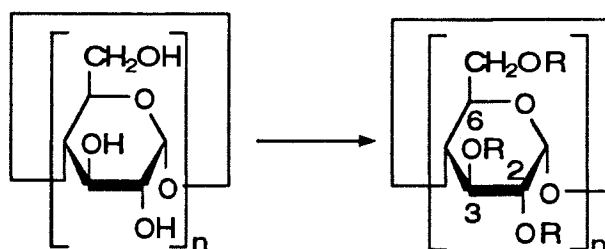
Il existe aussi des dérivés CDs polysilylés dont les isomères ont été isolés et caractérisés. A titre d'exemple, nous citerons les travaux récents de TANIMOTO *et al.* [95] qui ont préparé une γ -CD disilylée, séparé les isomères et ont utilisé ceux-ci dans la synthèse de 6¹,6ⁿ-di-O-(α -D-glucopyranosyl)- γ -CDs (n=2-5).

Les éthers silylés sont communément déprotégés dans les conditions suivantes :

- fluorure de tétrabutylammonium, dans le THF [96, 97] ou l'oxolane [28] à reflux, suivi d'une précipitation des CDs déprotégées dans le méthanol,
- étherate de trifluorure de bore, dans le chloroforme à température ambiante suivi d'une purification par chromatographie sur colonne [98],
- récemment, DIENST *et al.* [97] ont utilisé un mélange acide acétique / THF / H₂O, à chaud pour désilyler leurs composés suivi d'un traitement dans le méthanol saturé à 50% par l'ammoniac.

- le fluorure d'ammonium a aussi été utilisé [53].

Tableau 11 : Méthodes de silylation des CDs.



n	Position de substitution (R)	Réactif de silylation	Conditions	Rdt	Réf
7	2,3 et 6	Chlorure de triméthylsilyle	pyridine	NP	[5]
6	2,3 et 6	tétraméthylidisililazane Diméthylchlorosilane	pyridine	NP	[5]
6	6	Chlorure de tert-butyl triméthylsilyle (6,6éqs.)	DMF-imidazole 2h-t.a.	75%	[28]
7,8	6	Chlorure de tert-butyl triméthylsilyle (1,1éqs. par unité glucose)	pyridine-3h-0°C puis 12h-t.a.	>80%	[92]
7	2,6	Chlorure de tert-butyl triméthylsilyle	DMF- imidazole-90°C	66%	[92]
7	6	Chlorure de Diméthylhéxylsilane (7,7éqs.)	pyridine-2h-0°C puis 35-40h-t.a.	85%	[94]
7	2,6	Chlorure de Diméthylhéxylsilane	DMF-pyridine- 48h-95°C	66%	[94]
7	6	Chlorure de tert-butyl triméthylsilyle(7,35éqs.)	pyridine-18h- t.a.	73%	[99]

2- Tritylation

Le groupe trityl est utilisé pour la protection des fonctions alcools primaires en particulier lorsque le composé doit subir des modifications ultérieures en milieu fortement alcalin. Il constitue un groupe protecteur de choix dans la chimie des CDs notamment quand une méthylation est nécessaire.

Il n'existe pas de CDs dont la face des hydroxyles primaires soit entièrement tritylée. La formation d'un tel composé est rendue impossible par l'encombrement

stérique que créent les groupes trityls. Par contre, il existe des CDs polytritylés (di, tri et tétra) (Figure 27) mais ce sont des mélanges d'isomères de position souvent difficiles à séparer [5, 100].

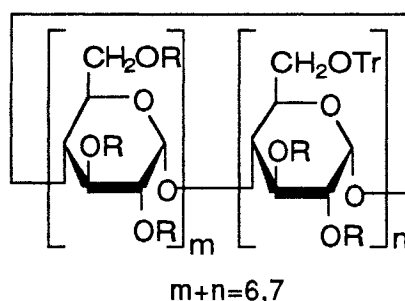


Figure 27 : Structure générale des CDs polytritylés.

Les 6-O-monotrityl-CDs ont été préparées par MELTON et SLESSOR [5] puis par TANAKA [24] par réaction de la CD avec le chlorure de trityle dans la pyridine. Cette méthode est à rapprocher des monotosylations de CDs que nous avons présentées au paragraphe I.

En 1989, COTTAZ [25] a préparé la mono-6-O-trityl- β -CD par une méthode similaire (1 éq. de chlorure de trityle est ajouté, à température ambiante, en deux fois, à cinq jours d'intervalle à une solution de β -CD dans la pyridine). La réaction dure une semaine puis le composé est acétylé directement à partir du milieu réactionnel par addition d'anhydride acétique et d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine à 60°C. Le rendement en dérivé ainsi acétylé est de 49%.

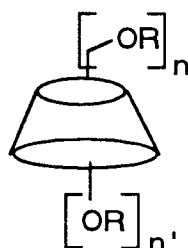
Un brevet japonais a été déposé en 1986 concernant la mono et la ditritylation de la β -CD. La réaction est similaire à celle de MELTON et SLESSOR mais les produits sont purifiés par précipitation dans des mélanges alcool / eau [101].

Enfin, il existe différentes CDs polytritylés synthétisées dans des conditions similaires à celles précédemment décrites [5, 102, 103, 103a]. Après caractérisation, les différents isomères servent d'intermédiaires pour la synthèse d'autres molécules comme des CDs polyglucosylées [95].

IX- Carbamoylation et carbonatation

Jusqu'à une période relativement récente, les CDs portant des fonctions carbamates étaient des mélanges de composés de degrés de substitution différents [5] (Figure 28). Seul un dérivé persubstitué, l'heptakis(2,3,6-tri-O-(N-phénylcarbamoyl))- β -CD, avait été obtenu par réaction de la β -CD avec le phényl isocyanate ($\text{Ph-N}=\text{C}=\text{O}$).

En 1992, TAKEICHI *et al.* [104] préparent des dérivés carbamates de β -CDs (Figure 28) comme phases stationnaires chirales pour la chromatographie capillaire en phase gazeuse. Ces composés sont obtenus par réaction de la 2,6-di-O-pentyl- β -CD avec un isocyanate (n-propyl, isopropyl ou phénylisocyanate), à reflux, dans la pyridine pendant deux jours. La substitution a lieu en position 3. Les carbamates obtenus sont des huiles.



$R = -CONHR'$

$R = -CO-OR'$

$R' = \text{alkyl, phényl}$

$n, n' : \text{nombre de substitutions}$

Figure 28 : Structure générale des CDs portant une fonction carbamate ou carbonate.

En 1993, GAHM *et al.* [105] étudient la régiosélectivité de la réaction de carbamoylation de la β -CD avec le 1-(1-naphtyl)éthyl isocyanate en fonction des conditions de réaction. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12.

Dans la pyridine, à reflux, c'est la substitution en position 6 qui prédomine tandis que dans le DMF, c'est la substitution en position 2. Dans la pyridine, la réaction est indépendante du temps mais, dans le DMF, la substitution se fait majoritairement en position 2 pour des temps de réaction courts puis, devient moins sélective lorsque le temps de réaction augmente.

En présence d'une quantité stœchiométrique d'hydruure de sodium, les proportions relatives de chaque régioisomère varient en fonction du temps de réaction quelque soit le solvant. De plus, le dérivé substitué en position 2 se réarrange pour fournir le dérivé substitué en position 6, thermodynamiquement plus stable, en présence d'une base (tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentages de chaque régioisomère en fonction des conditions de réaction.

Solvant	Conditions	position de substitution	Pourcentage relatif de chaque isomère
Pyridine	4h-reflux	O-2	11,3
		O-6	84,9
		O-3	4,8
DMF	0,5h-reflux	O-2	83
		O-6	< 1
		O-3	16
DMF	4h-reflux	O-2	56,6
		O-6	9,6
		O-3	33,8
DMF	5h-t.a.-NaH	O-2	88,2
		O-6	5,3
		O-3	6,5
DMF	307h-t.a.-NaH	O-2	9,7
		O-6	86,7
		O-3	3,6
Pyridine	5h-t.a.-NaH	O-2	86,9
		O-6	6,5
		O-3	6,5
Pyridine	162h-t.a.-NaH	O-2	46,5
		O-6	37,0
		O-3	15,5
DMF	0h-t.a.-NaOH	O-2	96,8
		O-6	< 1
		O-3	3,2
DMF	1h-t.a.-NaOH	O-2	52,7
		O-6	34,9
		O-3	12,4
DMF	3h-t.a.-NaOH	O-2	42,6
		O-6	46,0
		O-3	11,4
DMF	7h-t.a.-NaOH	O-2	< 1
		O-6	>98
		O-3	< 1

Des dérivés carbonates de la β -CD ont été obtenus par TROTTA *et al.* [106] par une méthode qui aboutit à des mélanges de degrés de substitutions différents. Cette méthode passe par l'obtention d'intermédiaires alkyloxycarbonylimidazoles. Il s'agit d'activer un alcool par le carbonyl diimidazole puis de faire réagir l'alkyloxycarbonylimidazole obtenu sur la β -CD. Le schéma de synthèse général est présenté dans la figure 29.

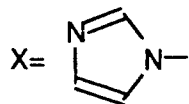
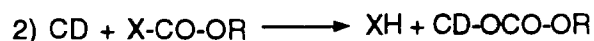


Figure 29 : Schéma de synthèse général des carbonates de β -CD [106].

L'étape (1) d'activation des alcools est rapide et quantitative. La réaction avec la β -CD (2) se déroule dans la pyridine, à 60-80°C, pendant 30 min. à 4,5h suivant les carbonyl diimidazoles utilisés. Les dérivés β -CDs sont des huiles lorsque le nombre de carbone de la chaîne alkyle de la fonction carbonate est inférieur à huit sinon, ce sont des solides. Le degré de substitution obtenu dépend du temps de réaction, de la température et de la quantité de réactif utilisé. D'une manière générale, plus la longueur de la chaîne augmente, plus le degré de substitution diminue du fait de l'encombrement stérique. Enfin, tous ces dérivés sont de bons tensio-actifs.

Méthodologies de fonctionnalisation des fonctions hydroxyles secondaires

La face secondaire de la CD est plus ouverte que la face primaire ce qui détermine un sens plus favorable à la complexation des molécules. Malheureusement, il est beaucoup moins facile de fonctionnaliser cette face et ceci pour plusieurs raisons :

- les hydroxyles sont moins réactifs que ceux de la face primaire. De plus, il existe une liaison hydrogène entre les hydroxyles en position 2 et 3 qui réduit leur réactivité. Dans tous les cas, les hydroxyles en position 3 sont les moins acides et les hydroxyles en position 2 les plus acides, donc les plus réactifs.

- il y a 12, 14 et 16 hydroxyles secondaires sur la face de l' α -, la β - et la γ -CD respectivement ce qui rend une monosubstitution plus difficile que sur la face supérieure. Les réactions aboutissent souvent à des mélanges complexes d'isomères.

La méthode générale permettant de fonctionnaliser la face secondaire passe par la mono ou la pertosylation des hydroxyles en position 2 puis par l'époxydation correspondante. Dans l'étape suivante, les époxydes sont ouverts par différents nucléophiles. Il n'existe, à notre connaissance que très peu de méthodes directes de fonctionnalisation des hydroxyles secondaires, à partir d'une CD non substituée.

Lors de la formation de l'époxyde, nous pouvons aboutir à deux configurations différentes (Figure 30) selon la position initiale du groupe sulfonylé. Si le sulfonyle est en position 2, c'est le 2,3-*manno*-époxyde qui sera formé par substitution nucléophile intramoléculaire de l'oxygène en position 3. Par contre, si le sulfonyle est en position 3, alors c'est le 2,3-*allo*-époxyde qui sera obtenu. De plus, la réaction du 2,3-*manno*-époxyde avec un nucléophile provoque son ouverture *via* la formation d'une unité altrose qui sera substituée en position 3. La conformation de la chaise passe de 4C_1 à 1C_4 .

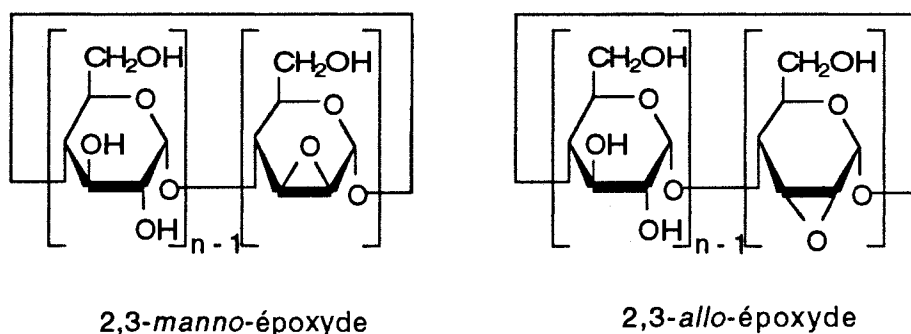


Figure 30 : Configurations possibles de l'époxyde [100].

Ces réactions peuvent avoir lieu sur les CDs natives ou les CDs dont les hydroxyles primaires ont été préalablement protégés. Ces méthodes sont présentées ci-après.

I- Fonctionnalisations à partir des CDs natives

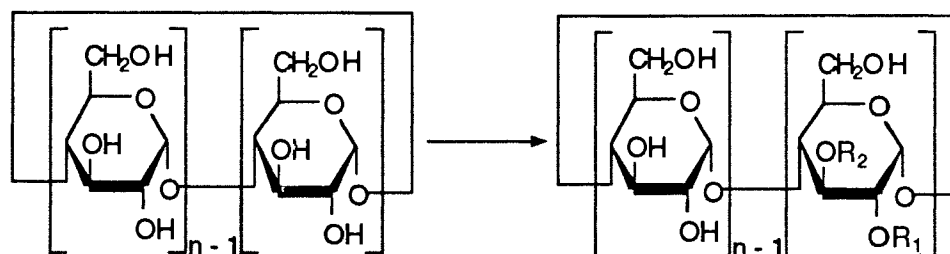
1- Sulfonylation et époxydation.

Il existe plusieurs méthodes de tosylation de la position 2 des CDs, elles sont rassemblées dans le tableau 13.

En 1982, UENO et BRESLOW [107] publient les premiers la synthèse de la mono-2-O-tosyl- β -CD (tableau 13). Les auteurs ont montré que ce dérivé était plus soluble dans l'eau que son analogue en position 6 mais surtout ils ont fait une étude très détaillée des modifications du spectre RMN ^{13}C induites par la substitution en position 2. Cette étude sert aujourd'hui de référence pour caractériser les CDs substituées en position 2 par RMN ^{13}C . Ainsi, il apparaît que le pic correspondant au carbone substitué (C2) est fortement déplacé vers les champs faibles tandis que les autres carbones de l'unité substituée (C1, C3, C4) sont déplacés vers les champs forts. Parmi ces derniers, le déplacement du carbone 3 est le plus important.

BRESLOW [112] a, par la suite, utilisé cet intermédiaire pour synthétiser une transaminase artificielle : une β -CD substituée en position 3 par une thiopyridoxamine. La 2-monotosyl- β -CD réagit dans l'eau avec du bicarbonate d'ammonium à 60°C pour former le 2,3-*manno* époxyde qui réagit ensuite avec la pyridoxaminethiol à 60°C. L'analyse RMN montre que le substituant est axial et orienté vers l'intérieur de la cavité. JIANG *et al.* [113] ont utilisé une méthode similaire pour synthétiser un dimère de CDs liées par leurs faces secondaires par une 3,5-pyridinyl méthane-thiol. Le rendement global de la réaction est de 29%. Les capacités de complexation de ces dimères ont été étudiées en utilisant des colorants tels que le rouge de méthyle.

Tableau 13 : Tosylation des hydroxyles secondaires des CDs.



n	R ₁	R ₂	Réactif	Conditions	Rdt	Réf
7	Ts	H	3-nitrophényl tosylate	DMF-Tampon carbonate (pH 9,9)-1h-60°C	10%	[107]
6	H	Ts	Chlorure de tosyile	Solution aqueuse alcaline (pH12) saturée en CD-t.a.	17%	[108]
6, 7 8	Ts	H	Chlorure de tosyile	Di-n-butyl étain-triéthyl amine-DMF	~30%	[109]
7	Ts	H	Chlorure de tosyile	NaH-DMF-t.a.	~70%	[110]
6	Ts	H	Chlorure de tosyile	Milieu alcalin-0°C-5h	NP	[111]

En 1984, FUJITA *et al.* [108] (tableau 13) décrivent une synthèse permettant d'obtenir majoritairement la mono-3-O-tosyl- α -CD en milieu alcalin (Figure 31). Dès que le pH de la réaction est acide, le milieu réactionnel est filtré et les produits purifiés par CLHP à polarité de phase inversée. Les rendements sont de 17% pour la CD tosylée en position 3, 6% pour la CD tosylée en position 2 et 2% pour la CD tosylée en position 6. Les auteurs ont montré que lorsque le pH était maintenu constant par l'utilisation d'une solution tampon pH12 (nécessaire au départ pour permettre l'ionisation de l'hydroxyle), la CD substituée en position 3 n'était pas isolée. En effet, celle-ci se transforme, par une réaction SN_2 , en époxyde correspondant. Cette méthode nécessite donc des conditions de réaction et de traitement très strictes en fonction de la position de substitution désirée sur la CD. Dans des conditions similaires, TAKAHASHI *et al.* [23] ont mis en évidence que la β -CD était tosylée en position 6 et non en position 2.

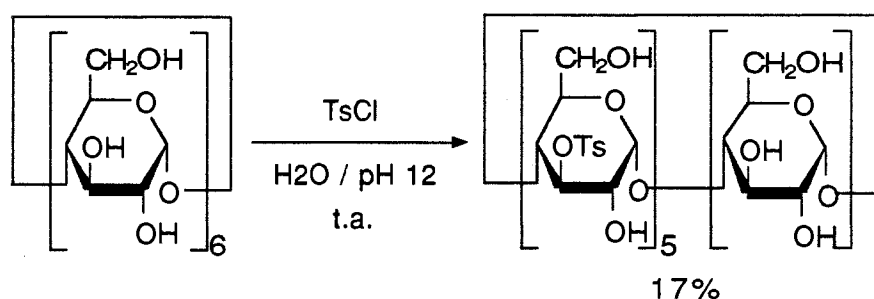


Figure 31 : Réaction de tosylation en position 3.

En 1987, MURAKAMI *et al.* [109] (tableau 13) ont publié une méthode permettant de tosyler en position 2 l' α -, la β - et la γ -CD (tableau 13) (Figure 32).

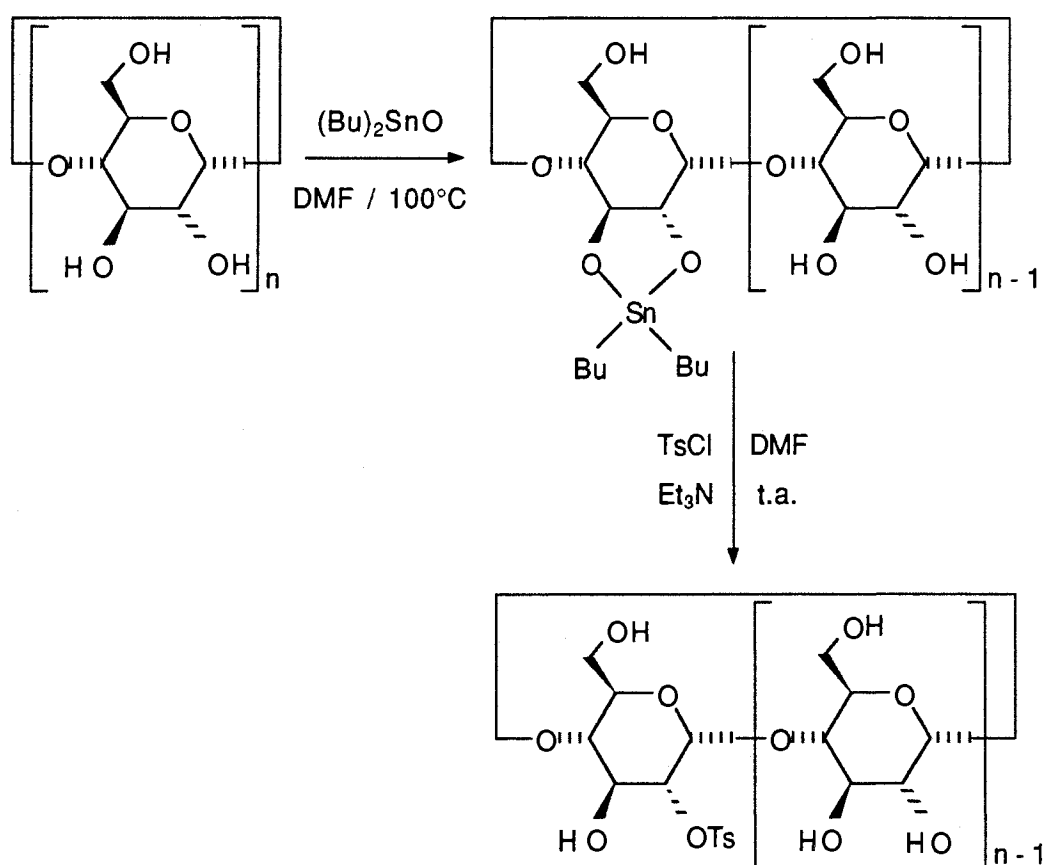


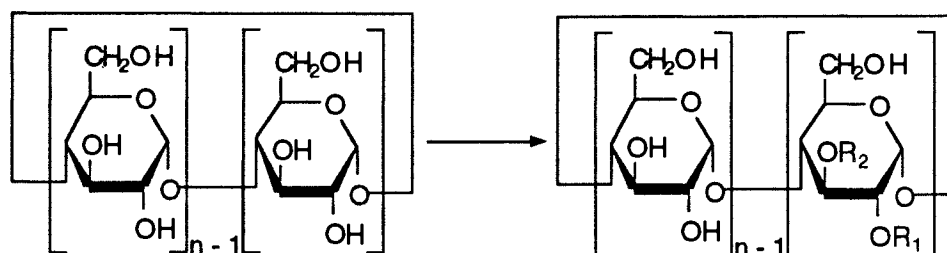
Figure 32 : Schéma de synthèse des 2-O- monotosyl-CDs [109].

D'après les auteurs, la réaction procède *via* un intermédiaire alkoxyde d'étain instable et la formation d'une liaison de coordination entre l'étain et l'oxygène anomérique qui favorise la tosylation du carbone 2.

Partie 1 : Étude bibliographique : Méthodologies de monofonctionnalisation des CDs

Les rendements en dérivés monotosylés sont de l'ordre de 30% pour les trois CDs après purification et les seuls produits secondaires observés sont les CDs natives et ditosylées en position 2.

Tableau 13 : Tosylation des hydroxyles secondaires des CDs



n	R ₁	R ₂	Réactif	Conditions	Rdt	Réf
7	Ts	H	3-nitrophényl tosylate	DMF-Tampon carbonate (pH 9,9)-1h-60°C	10%	[107]
6	H	Ts	Chlorure de tosyte	Solution aqueuse alcaline (pH12) saturée en CD-t.a.	17%	[108]
6, 7 8	Ts	H	Chlorure de tosyte	Di-n-butyl étain-triéthyl amine-DMF	~30%	[109]
7	Ts	H	Chlorure de tosyte	NaH-DMF-t.a.	~70%	[110]
6	Ts	H	Chlorure de tosyte	Milieu alcalin-0°C-5h	NP	[111]

En 1990, D'SOUZA et RONG [110] (tableau 13) mettent au point une nouvelle stratégie générale de fonctionnalisation des hydroxyles secondaires, en position 2 de la β -CD. Elle permet d'accéder aux dérivés mono et persubstitués. La stratégie employée consiste à former l'alcoolate en position 2 par ionisation de l'hydroxyle à l'aide d'hydrure de sodium. Cet anion réagit ensuite avec un électrophile pour fournir le dérivé substitué en position 2. Le degré de fonctionnalisation est contrôlé par la quantité d'hydrure de sodium mise en réaction. La réaction procède dans le DMF à température ambiante par addition d'une solution de β -CD et d'hydrure de sodium à une solution d'électrophile. Le rendement en mono-2-O-tosyl- β -CD est estimé par les auteurs à 70% d'après le spectre RMN ^1H du dérivé brut.

Par cette méthode, les auteurs ont synthétisé une β -CD méthylée sur toutes les positions 2 avec un rendement de 83%. Utilisant les mêmes conditions, RONG *et al.* [114] ont synthétisé une β -CD substituée par un noyau riboflavine en position 2 catalysant des réactions d'oxydo-réduction (modèle d'oxydo-réductase artificielle).

La même année, IKEDA *et al.* [111] préparent les dérivés monotosylé en position 2 (tableau 13) et mono-aminé en position 3 de l' α -CD. La réaction de tosylation s'effectue en milieu alcalin à 0°C pendant 5h et l'époxyde correspondant est obtenu par traitement du dérivé tosylé en milieu alcalin, 48h, à température ambiante. La mono-3-déoxy-3-amino- α -CD est obtenue après ouverture de l'époxyde par l'ammoniaque concentré dans l'eau à 60°C pendant 24h. Elle est purifiée sur Séphadex (C-25 et G-10). Par la même méthode, en partant de l'époxyde, les auteurs ont synthétisé une α -CD substituée par une histidine en position 3 comme modèle d'hydrolase. Ils ont aussi préparé les mêmes dérivés, issus de la β -CD [115].

Enfin, FUJITA [116] a effectué sur des CDs polysulfonylées en position 3, le même travail d'isolement et de caractérisation des isomères que celui effectué sur les dérivés polysulfonylés en position 6. Son but est toujours d'obtenir des composés de structure bien caractérisée pouvant servir à la synthèse d'enzymes ou de récepteurs artificiels dont la position des substituants doit être bien définie. Les produits sont préparés par réaction de la β -CD avec le chlorure de naphthylsulfonyl dans un mélange acétonitrile / tampon phosphate (pH 12) à 40°C. La réaction est stoppée dès que le pH est acide et les différents isomères sont séparés par CLHP à polarité de phase inversée. Les poly-*allo*-époxydes correspondants ont également été préparés dans un mélange éthanol / eau en présence d'hydroxyde de baryum.

2- Autres méthodes de fonctionnalisation

Une méthode originale de fonctionnalisation sélective de la face des hydroxyles secondaires a été développée par PALMER *et al.* [117]. Elle passe par l'ouverture d'une N-tosyl aziridine (NTA) qui est un bon électrophile pouvant réagir avec les ions alkoxydes de la β -CD. La figure 33 présente le schéma réactionnel. Le mécanisme de la réaction passe par l'inclusion du groupe *p*-toluène sulfonyl dans la cavité de la CD qui provoque l'activation de l'aziridine et l'ouverture de son cycle. Le rendement de la réaction avec l'aziridine est faible (7,5%) mais l'intérêt de cette méthode est de placer sur la face secondaire une chaîne éthylamine fonctionnalisable à son tour. Pour cela, il suffit de détosyler la fonction amine en bout de chaîne pour obtenir un site nucléophile qui permettra la formation de liaisons imines ou amides. Les auteurs ont ainsi synthétisé la mono-2-O-(2-picolylaminoéthyl)- β -CD et ont testé les capacités de la 2-O-(2-aminoéthyl)- β -CD en tant que protéase artificielle.

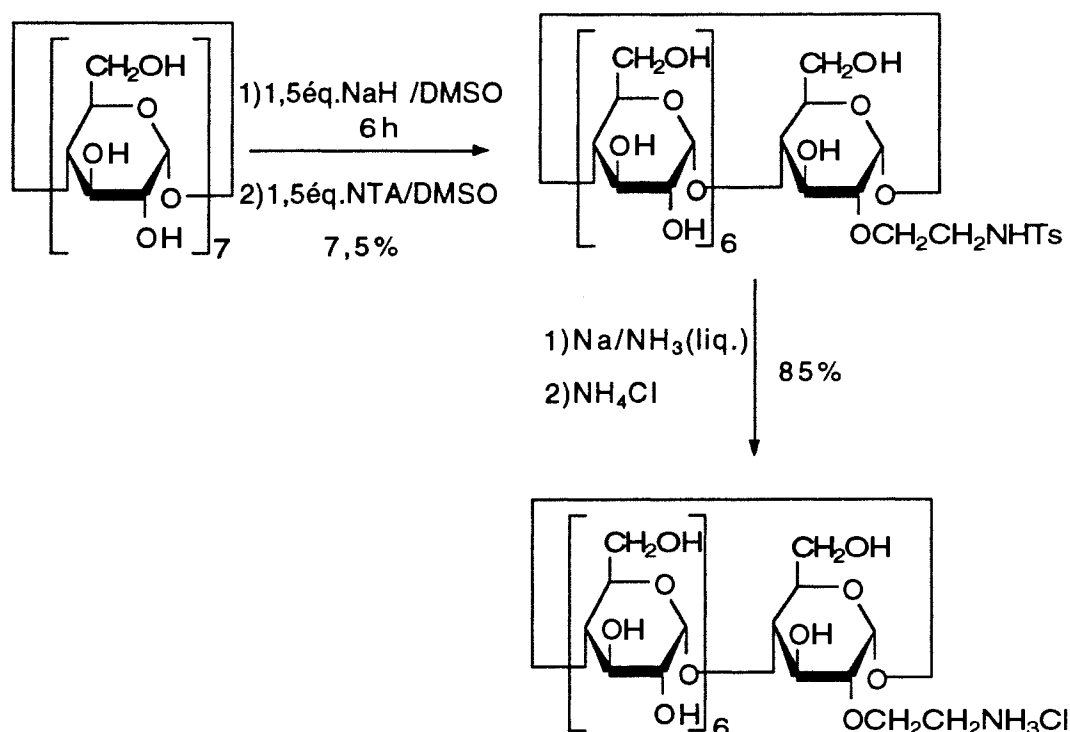


Figure 33 : Schéma réactionnel de fonctionnalisation par les NTAs [117].

En 1995, MARTIN *et al.* [56] préparent plusieurs dérivés aminés de la β -CD sur la face secondaire comme modèles de transacylase (Figure 34).

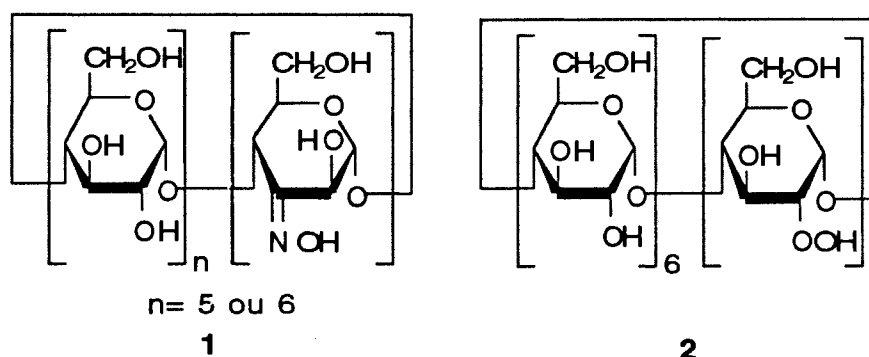


Figure 34 : Structure de la 3-déoxy-3-oxo- β -CD oxime (1) et de la 2-déoxy-2-hydroperoxy- β -CD (2).

La 3-déoxy-3-(N-hydroxylamino)- β -CD est obtenue par réaction de la β -CD-2,3-*manno*-époxyde avec l'hydroxylamine aqueuse. Ce dérivé réagit avec l'ammoniaque concentré pour former un mélange de mono- et di-3-déoxy-3-oxo- β -CD oxime (1) avec un rendement de 98%. Enfin, ils ont préparé la 2-déoxy-2-hydroperoxy- β -CD (2) par réaction de la β -CD avec le peroxyde d'hydrogène à chaud pendant 72h. (Figure 34). Ce composé se décompose, au cours du temps, en aldéhyde correspondant.

Plusieurs dimères liés par des liaisons thioéthers ont aussi été préparés. Deux voies sont possibles à partir de la β -CD 2,3-*manno*-époxyde:

1- l'époxyde est ouvert par le benzyl mercaptan qui est ensuite réduit par le sodium et l'ammoniac liquide pour fournir la 3-mercapto-3-déoxy- β -CD. Cet intermédiaire par oxydation spontanée fournit un dimère de β -CDs lié par un bras dithioéther ("tail to tail")[118]. La 3-mercapto-3-déoxy- β -CD a aussi été utilisée dans la synthèse d'hétérodimères dont les points d'ancrage se situent en position 3 sur une CD et en position 6 sur l'autre. Un exemple de synthèse de tels dérivés est présenté dans la figure 35 [119].

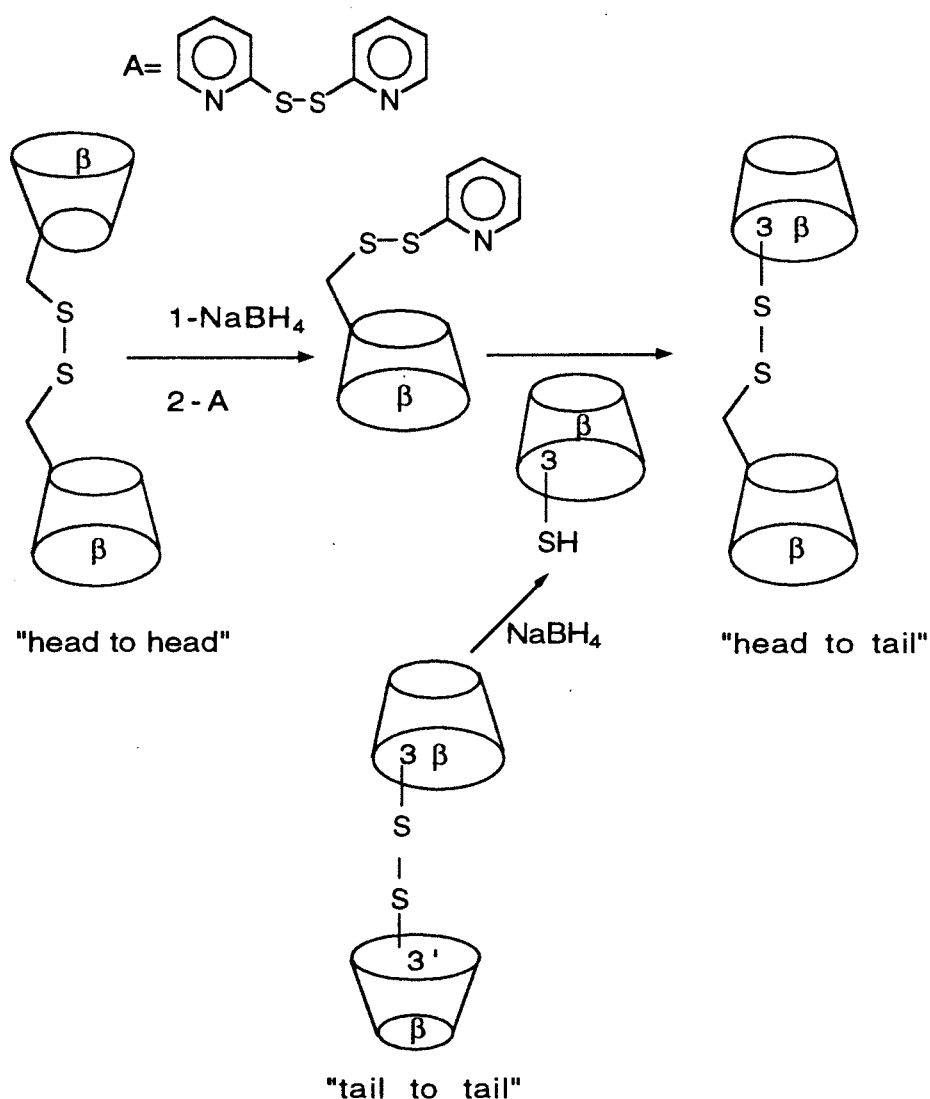


Figure 35 : Schéma de synthèse d'un dimère [119].

La 3-mercapto-3-déoxy- β -CD a aussi été utilisée dans la synthèse d'un tétramère de CD [120]. Il s'agit en fait de l'alkylation de trois molécules de 3-mercapto-3-déoxy-

β -CD par une unique molécule tétraiodée aromatique. Le schéma de synthèse de ce tétramère est présenté dans le schéma suivant (Figure 36) :

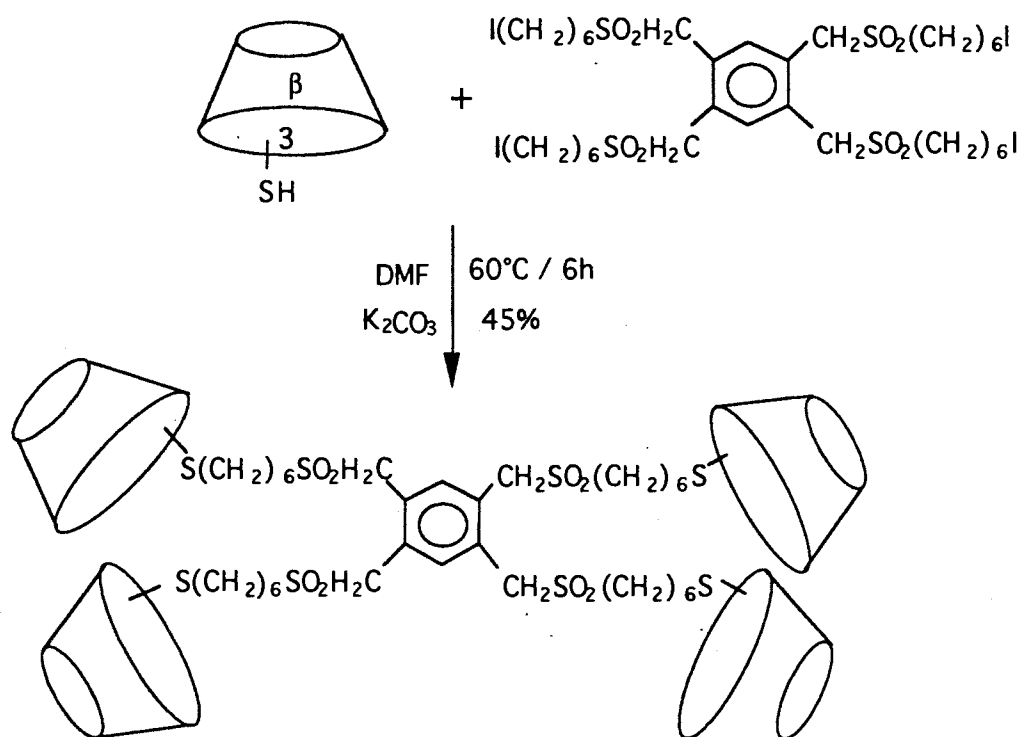


Figure 36 : Schéma de synthèse du tétramère de β -CD [120].

Les auteurs ont montré par RMN et modélisation moléculaire que ce tétramère formait un complexe 1:1 avec les porphyrines, les quatre noyaux phényles substituant la porphyrine s'incluant chacun dans une cavité de CD (Figure 37). La constante d'affinité est quatre fois plus grande qu'avec le dimère correspondant (elle n'est pas précisée par les auteurs).

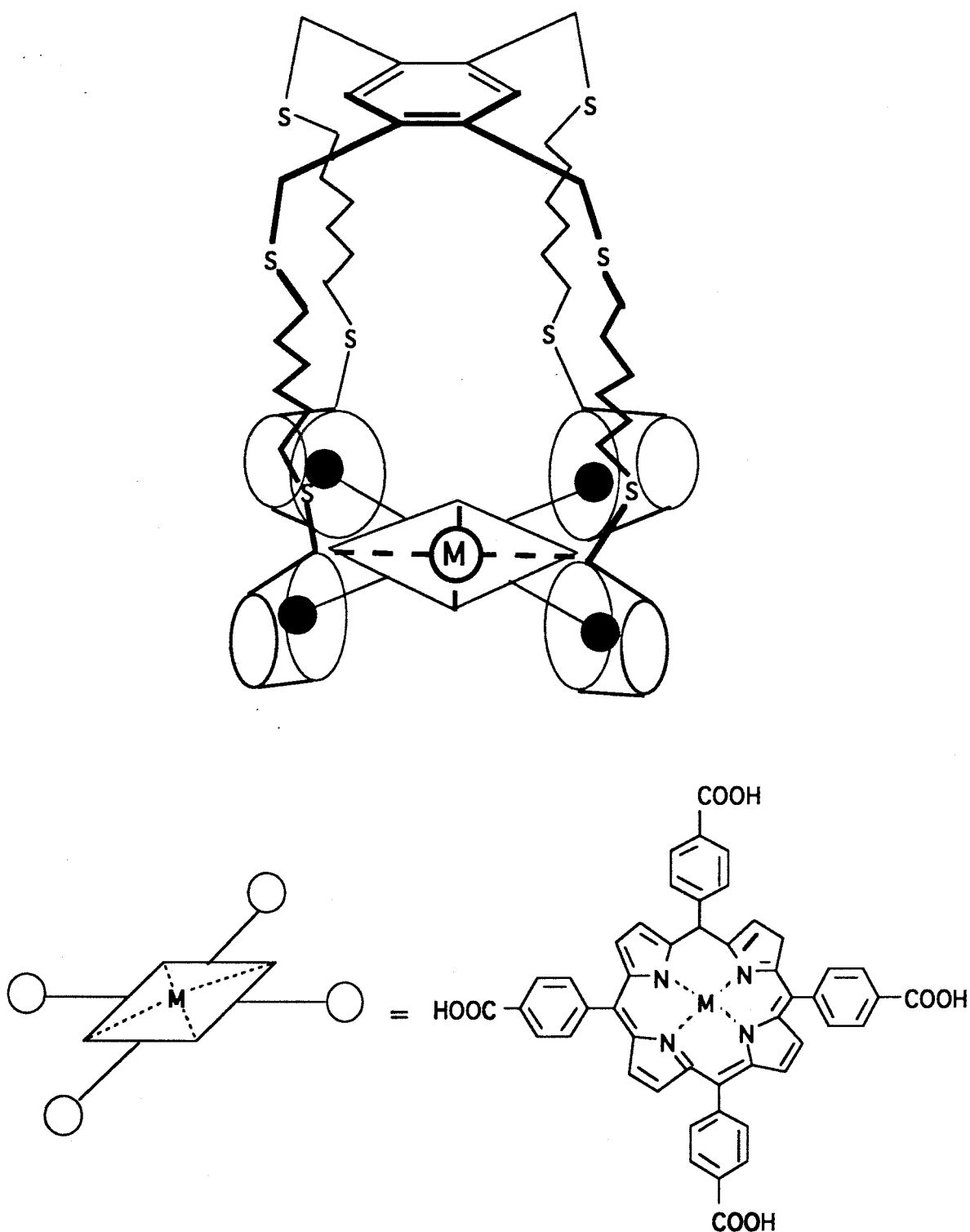


Figure 37 : Structure du complexe entre une porphyrine et le tétramère de CDs.

2- l'époxyde est directement ouvert par un dithiol tel que la 3,5-pyridyl diméthanethiol [113]. Le dimère obtenu dans ce cas a une grande affinité pour les

métallo-porphyrines car l'ion central de la porphyrine se coordine avec l'azote de la pyridine [113, 121].

II- Fonctionnalisation à partir des CDs protégées sur la face des hydroxyles primaires.

La protection des hydroxyles primaires dans ce cas utilise principalement les éthers silylés ce qui permet d'obtenir des composés solubles en milieu organique facilitant les purifications. Les stratégies de synthèse utilisent donc toutes la séquence protection-déprotection ce qui implique deux étapes supplémentaires.

A notre connaissance, PREGEL *et al.* [99], en 1991, sont les premiers à avoir décrit la tosylation en position 2 de la β -CD silylée sur les hydroxyles primaires. La réaction s'effectue dans le chloroforme, à reflux pendant 6h en présence de 1,5 éqs. de N-tosylimidazole et de méthanolate de sodium. Après purification sur colonne de gel de silice, le rendement de la réaction est de 22%. Le mono-*manno*-époxyde est obtenu par action de l'éthanolate de potassium sur le dérivé monotosylé à reflux pendant 70 min. dans l'éthanol (Rdt : 87%) (Figure 38).

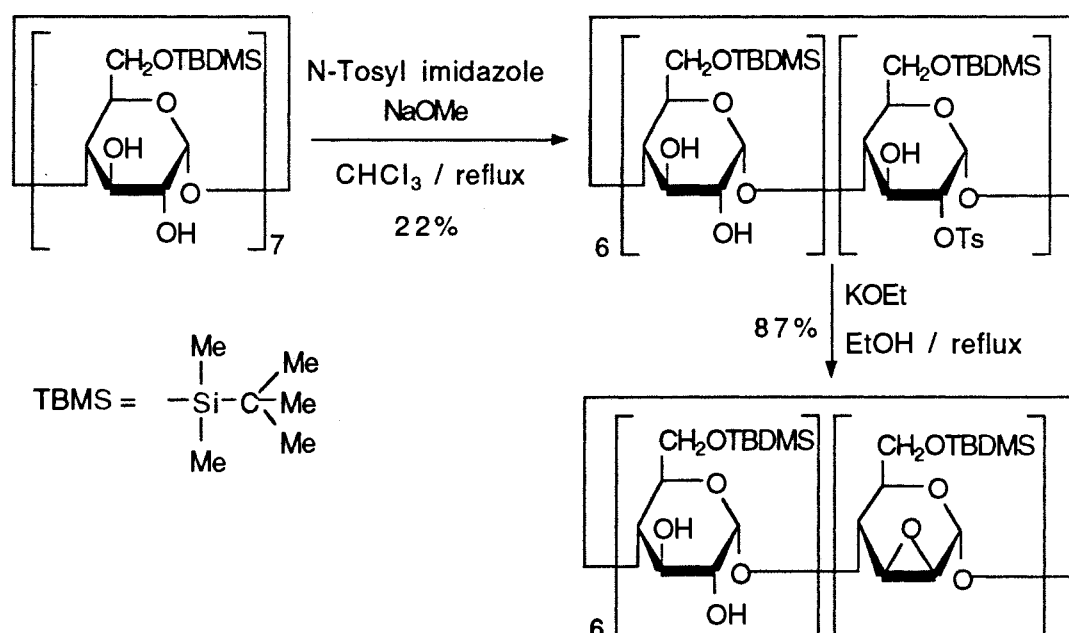


Figure 38 : Schéma de synthèse du mono *manno*-époxyde de la β -CD [99].

En 1992, KHAN *et al.* [96] préparent une β -CD silylée sur la face des hydroxyles primaires et fonctionnalisée par sept époxydes sur la face secondaire directement, le dérivé pertosylé étant formé *in situ*. La réaction s'effectue dans le DMF à température

ambiante avec 30 éqs. d'hydruure de sodium et 8,4 éqs de chlorure de benzène sulfonyle. Le mécanisme de la réaction est identique à celui d'une mono-époxydation c'est-à-dire que le chlorure de benzène sulfonyle réagit avec les alcoolates en position 2 pour former l'heptakis(2-O-benzène-sulfonyl-6-O-tert-butylidiméthylsilyl)- β -CD, les sulfonates sont ensuite déplacés par les alcoolates en position 3 pour former l'époxyde. Par la suite, les auteurs [122] ont utilisé cet intermédiaire, désilylé, pour préparer une β -CD dont toutes les positions 3 sont fonctionnalisées par un groupe amine primaire. L'ouverture de l'époxyde et la fonctionnalisation sont obtenues par traitement dans l'ammoniaque pendant six jours à température ambiante. Il apparaît que sous certaines conditions de pH, cette molécule peut s'auto-associer pour former un dimère.

COLEMAN *et al.*[98, 123] ont aussi décrit la synthèse de cet époxyde avec l' α -, la β - et la γ -CD dans le but d'étudier ses capacités de complexation. Leur stratégie de synthèse est décrite dans le schéma ci-dessous (Figure 39) :

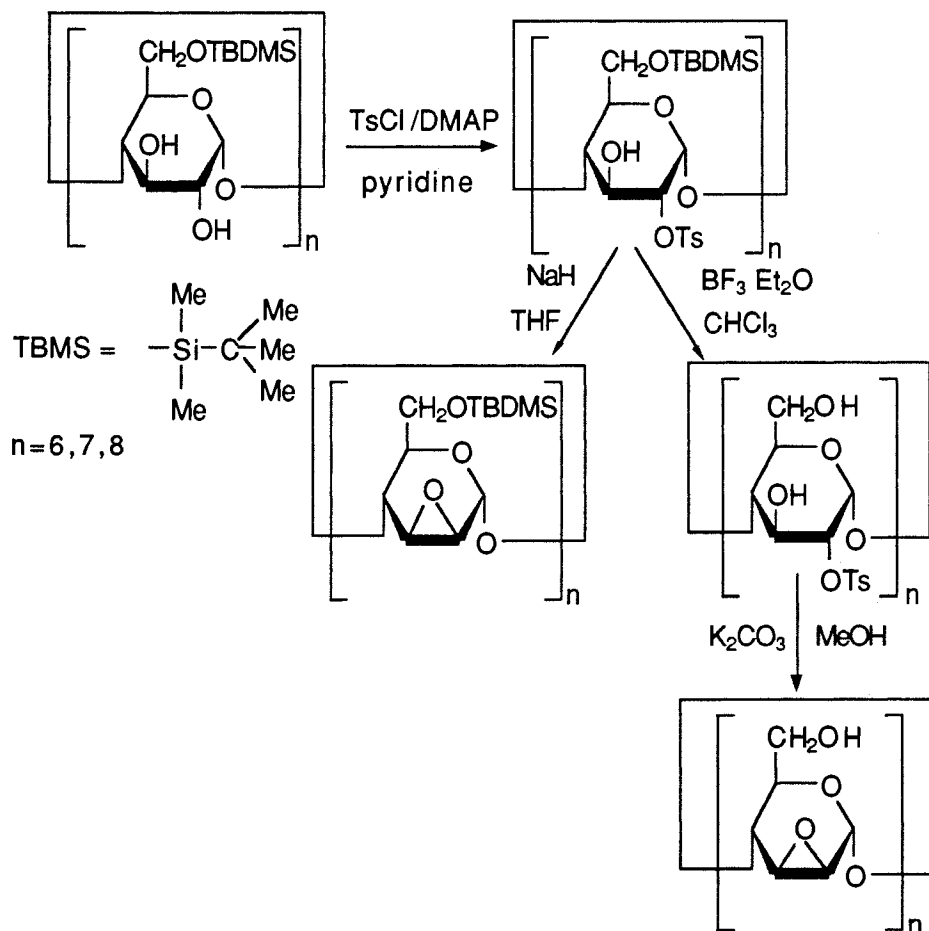


Figure 39 : Schéma de synthèse des CDs per époxyde [98].

Ici, le dérivé pertosylé est isolé. Il est préparé par réaction de la CD silylée avec le chlorure de tosyle, dans la pyridine en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) à 50°C. Le rendement, après purification, est de 55-60%. Les époxydes sont préparés, après désilylation, par substitution intramoléculaire catalysée par le carbonate de potassium, à 60°C, dans le méthanol (rendements > 90%). Ils peuvent aussi être préparés sans déprotection préalable des dérivés pertosylés par action de l'hydruure de sodium dans le tétrahydrofurane (THF) à 60°C (Rdt : 75%).

VENEMA *et al.* [97, 124, 125] ont réalisé un travail important sur la monofonctionnalisation sélective de la face des hydroxyles secondaires de la β -CD silylée dans le but de préparer des dimères possédant des sites métalliques (*e.g.* bipyridine) induisant potentiellement des propriétés de complexation et de catalyse. Leur travail ouvre la voie à de nombreuses synthèses car les fonctionnalisations sont diverses et les rendements de réaction sont élevés.

Ainsi, ils ont préparé le dérivé monotosylé en position 2 par réaction de la β -CD silylée avec le chlorure de tosyle et l'hydruure de sodium dans le THF à reflux avec un rendement de 34%. Ce composé est converti en mono-époxyde par l'éthanolate de sodium dans l'éthanol à reflux. Cet époxyde est ensuite ouvert par l'éthanol saturé en ammoniac sous deux atmosphères à 70°C pendant deux jours. Le dérivé mono-aminé en position 3 est obtenu avec un rendement de 83%. Il peut aussi être ouvert *via* le dérivé azidé (LiN_3 , éthanol à reflux) qui est ensuite réduit mais le rendement est alors beaucoup plus faible (48%).

Les dimères [124] sont préparés à partir du dérivé aminé en position 3 par réaction avec des esters activés d'acides dicarboxyliques en excès dans le THF (Figure 40). Les dimères sont ensuite désilylés et leurs capacités de complexation étudiées.

Enfin, récemment, ces auteurs [97] ont préparé, par cette méthode, une série de dérivés différemment fonctionnalisés. Tous s'obtiennent *via* l'ouverture du dérivé silylé mono-époxyde par un nucléophile. Les positions 2 des autres unités glucose peuvent être méthylées ou pas. Dans ce cas, la réaction de méthylation s'effectue à partir du dérivé monotosylé en position 2 par traitement avec le diméthyl sulfate en présence d'oxyde et d'hydroxyde de baryum. Les dérivés préparés et les conditions de réaction sont réunis dans le tableau 14.

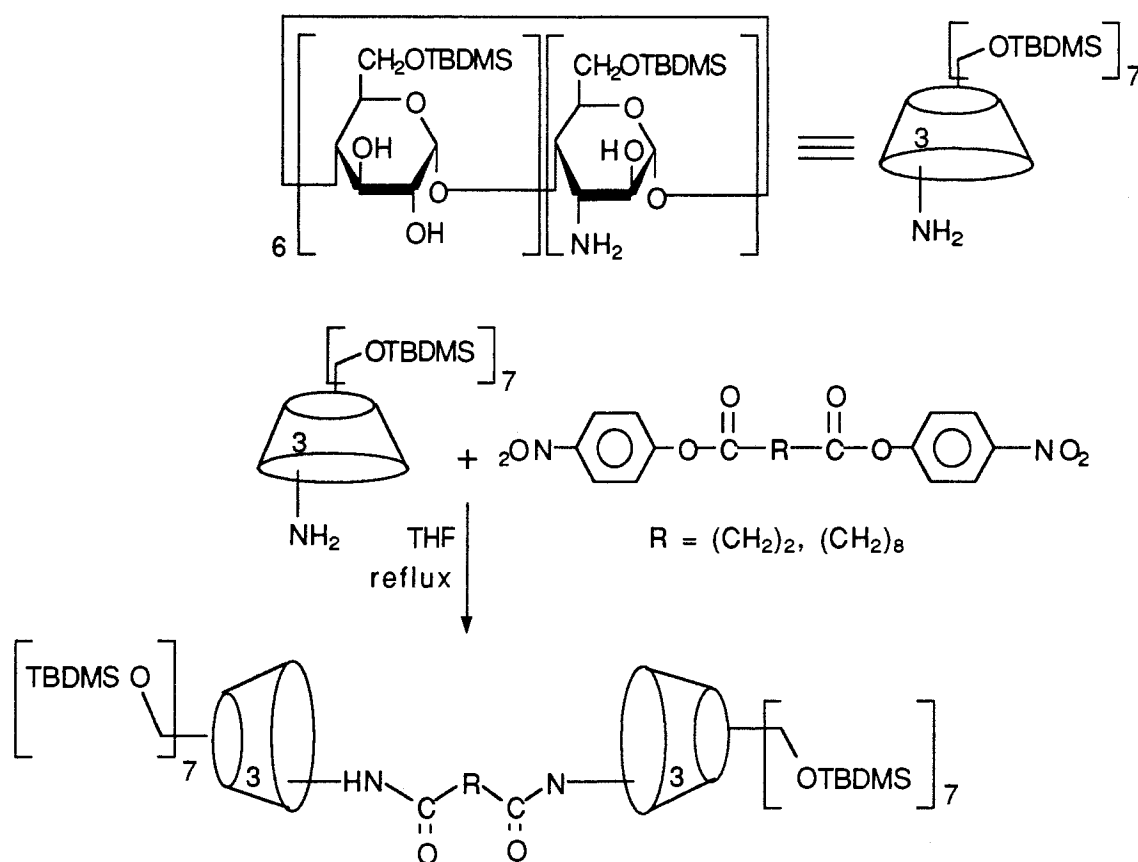


Figure 40 : Synthèse d'un dimère de β -CDs lié par la face des hydroxyles secondaires [124].

Tableau 14 : Conditions des différentes monofonctionnalisations [97].

Dérivé	Monosubstitution en position 3	Position 2 (autres unités)	Conditions de réaction	Rdt
1	NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	OH	éthylènediamine-reflux-16h	98%
2	N ₃	OH	LiN ₃ -éthanol-4jours-reflux	100%
3	NH ₂	OH	Bu ₃ SnH-AIBN-reflux-1h	85%
3	NH ₂	OH	Ethanol saturé en ammoniac 70°C-48h	83%
4	NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	OMe	éthanol-éthylène-diamine-16h-reflux	75%

Les auteurs ont aussi préparé des composés monosubstitués en position 2 et des dimères reliés par les hydroxyles secondaires en utilisant la réaction directe de la CD silylée avec les composés bromés (e.g. α -bromo-*o*-toluonitrile, β,β' -dichloro-xylène)

correspondants en présence d'hydruire de sodium. Les substituants greffés permettent des fonctionnalisations ultérieures. En se servant d'un bras ainsi réalisé, ils ont pu coupler un calixarène sur un hydroxyle secondaire de la β -CD silylée [97]. Une fois désilylée, cette molécule est très soluble dans l'eau et possède des capacités de complexation fortement augmentées par rapport à la CD native.

L'utilisation d'une méthode similaire [126] ($\text{BaO}/\text{Ba}(\text{OH})_2$, 8 H_2O , DMSO-DMF, dérivé bromé) a permis de coupler un macrobicyclique à une α -CD silylée sur la face des hydroxyles primaires mais, dans ce cas, le rendement est inférieur à 1%, après déprotection (Figure 41).

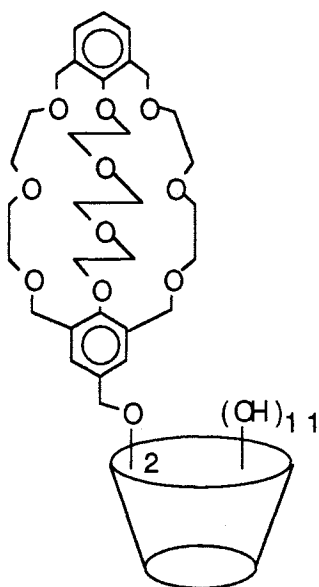


Figure 41 : Structure d'une α -CD couplée à un éther-couronne bicyclique en position 2 [126].

Les méthodes de fonctionnalisation présentées ici sont générales et ouvrent de nombreuses voies à la monofonctionnalisation sélective de la face des hydroxyles secondaires des CDs.

Enfin, un exemple de CD polysilylée uniquement sur la face des hydroxyles secondaires a été décrit [127]. Cette protection est intéressante car, au contraire des précédentes, elle peut permettre les modifications sélectives de la face des hydroxyles primaires. Malheureusement, elle conduit à un mélange de dérivés de degrés de substitution différents car le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle provoque un encombrement stérique important qui empêche la substitution complète de tous les carbones 2 de plus, elle est inapplicable sur l' α -CD dont la taille est plus petite.

Méthodes d'alhylation et d'acylation des CDs

Il existe un très grand nombre de CDs acylées et alkylées. Ces réactions sont les premières modifications effectuées sur les CDs. Toutes ont d'abord été préparées dans un but de purification des mélanges de CDs [5].

Différents exemples de préparation de ces dérivés ayant déjà été décrits dans cette section, nous nous intéresserons principalement aux méthodes de perméthylation et aux réactions d'acylation sélectives récentes.

I- Méthylation

Il existe trois méthodes générales permettant la méthylation complète des CDs natives ou déjà fonctionnalisées qui permettent d'éviter la formation de mélanges de degrés de méthylation différents.

BOGER [27] et SZEJTLI [128] ont préparé ces dérivés, dans le DMF, à température ambiante par réaction des CDs natives ou déjà fonctionnalisées avec un excès d'hydruide de sodium et d'iodure de méthyle. Les produits ne nécessitent pas de purification particulière et les rendements sont de l'ordre de 90%. Le dérivé perméthylé de la β -CD peut aussi être obtenu en utilisant le DMSO mais le rendement est alors inférieur, de plus le DMSO est moins pratique d'utilisation que le DMF.

Les CDs peuvent être méthylées en utilisant le diméthyl sulfate [129] en présence d'oxyde et d'hydroxyde de baryum, dans le DMF. Cette méthode utilise des conditions faiblement basiques et permet donc la méthylation (ou la benzylation), sans risques de modifier les fonctions éventuellement déjà présentes sur les hydroxyles secondaires. Par contre, en utilisant cette méthode, il peut se former des mélanges de produits de degrés de méthylation différents.

Une méthode similaire a été utilisée pour produire l'heptakis(2,6-di-O-méthyl) β -CD [128] dans un mélange DMF-DMSO.

Enfin, une troisième méthode utilise une réaction par transfert de phase solide-liquide [41]. La réaction s'effectue avec le diméthyl sulfate en présence d'hydroxyde de sodium et de chlorure de triméthyl octyl ammonium à 20°C pendant 4h. Le rendement en produit méthylé est dans ce cas de 32%.

de la mono-amino- β -CD par un groupe tert-butyloxycarbonyl, développée par DE ROBERTIS, pourrait être utile dans l'élaboration de stratégies visant à obtenir des CDs polyfonctionnelles. Le développement des réactions de fonctionnalisation par les amines a permis l'interaction entre deux domaines de la chimie supramoléculaire, celui des coronands (molécules synthétiques) et celui des CDs (molécules naturelles). Les propriétés de complexation de ces composés sont complémentaires et il a ainsi pu être mis en évidence un phénomène d'additivité et de coopérativité des sites entre les deux unités au cours des réactions de complexation.

L'apparition récente de plusieurs méthodes originales d'oxydation des CDs devrait permettre le couplage de leur composé d'oxydation aux biomolécules (protéines) et l'étude du comportement de ces entités dans le milieu biologique. Ces méthodes constituent aussi une bonne alternative à la photo-décomposition des azido-CDs dans l'obtention des carboxy-CDs. En effet, elles peuvent permettre d'obtenir des CDs mono et dicarboxylées de façon rapide et avec des rendements acceptables. C'est aussi une voie ouverte à de nouveaux couplages qui pourraient utiliser la carboxy-CD comme synthon.

Les méthodes d'obtention des CDs disubstituées ont principalement été développées par TABUSHI et KURODA à partir des CDs "chapeautées". Différentes régiosubstitutions peuvent être obtenues en fonction des réactifs utilisés. Ces composés disubstitués sont à l'origine de nombreux dérivés et représentent une voie pour la synthèse de polymères de CDs. Certains de ces polymères, fonctionnalisés, ont été greffés sur des phases stationnaires pour la chromatographie, d'autres, biocompatibles, ont été préparées comme vecteurs potentiels de principes actifs.

Le cas des CDs sulfatées et des mercapto-CDs est particulier. Les premières, sont pratiquement les seules à ce jour, à posséder une activité pharmacologique intrinsèque. Les mercapto-CDs, quant à elles, sont utilisées dans des domaines tels que l'électrochimie ou dans l'élaboration de "biosensors".

Toutes ces méthodes ont permis le développement d'un grand nombre de dérivés dont les applications potentielles sont importantes dans des domaines des sciences biomédicales, la pharmacie, la médecine, la biologie.

Malgré cela, comme on peut le voir tout au long de cette revue, il reste un facteur limitant à la chimie des CDs, celui de la monofonctionnalisation qui est souvent délicate du fait du nombre d'hydroxyles des CDs et dont le rendement reste très moyen. Il serait nécessaire d'imaginer d'autres méthodes directes de monofonctionnalisation autres que la tosylation qui permettent l'obtention quantitative d'intermédiaires-clés utilisables dans les différentes stratégies de synthèse. Il est aussi possible d'imaginer d'autres voies que celles de la chimie organique pour accéder à ce type de produits. La voie enzymatique par

exemple qui a déjà été utilisée pour la synthèse de CDs glycosylées ou l'utilisation des micro-ondes encore relativement peu répandue.

Enfin, la complexité grandissante des dérivés synthétisés, conduira le chimiste à faire de plus en plus appel à toutes les techniques chromatographiques et spectroscopiques à sa disposition, pour une caractérisation des produits toujours plus pointue. Ces méthodes devront être utilisées en parallèle, de manière courante. En cela, le développement important, depuis une dizaine d'années, des méthodes bidimensionnelles de RMN à haut champ et les avancées techniques en spectrométrie de masse (ES-MALDI) lui apporte une réponse partielle à ce problème.

Partie 2 : Etude bibliographique : Applications potentielles

*Transport et vectorisation de principes actifs par les
CDs*

Les CDs : Sondes fluorescentes

CDs et chimie biomimétique

Les nombreuses applications des CDs proviennent essentiellement de leur cavité interne hydrophobe capable de complexer la plupart des petites molécules organiques. Nous aborderons, dans une première partie, le problème du transport et de la vectorisation de molécules, en particulier les oligonucléotides. Dans une deuxième partie, nous traiterons de la reconnaissance moléculaire à l'aide des sondes utilisant la fluorescence comme méthode de détection. Dans une troisième partie, nous traiterons de la synthèse et des applications des CDs en chimie biomimétique. Cette dernière partie sera plus spécialement consacrée aux nucléases artificielles.

Transport et vectorisation de principes actifs par les CDs

I- Les CDs et le transport de médicaments : généralités

C'est en se complexant avec les médicaments que les CDs les transportent. Il existe une littérature abondante à ce sujet, à titre d'exemple, nous citerons la revue d'UEKAMA [10].

La complexation d'un principe actif avec une CD apporte les avantages suivants:

- amélioration de la solubilité de médicaments peu hydrosolubles,
- amélioration de la stabilité chimique envers l'hydrolyse, l'oxydation,
- amélioration de l'absorption et de la biodisponibilité de composés faiblement hydrosolubles donc meilleure efficacité,
- diminution des effets secondaires,
- protection contre le goût ou l'odeur déplaisante d'un médicament,
- éviter certaines incompatibilités médicamenteuses en complexant l'une des substances à la CD.

Il existe néanmoins des restrictions à la complexation des médicaments avec les CDs :

- tous les médicaments ne peuvent pas former de complexes d'inclusion avec les CDs parce que leur taille n'est pas adaptée à la cavité de celle-ci ou bien leur hydrophilie est trop importante,
- la complexation peut avoir lieu mais la constante de complexation est trop importante pour permettre la libération complète du principe actif ou trop faible et le complexe est instable, le principe actif est libéré trop tôt ou non protégé. Selon les auteurs, [4] l'échelle des constantes de complexation utilisables pour une application pharmaceutique, varie globalement de 100 à 5000M^{-1} ,
- les médicaments dosés à plus de 50mg ne peuvent pas être complexés car la quantité de complexe serait alors trop importante pour un usage thérapeutique [4].

La première application commerciale de ce type de complexe a été autorisée au Japon : il s'agit du complexe de la PGE₂ avec la β -CD (Prostarmon®).

II- CDs et transport d'oligonucléotides - Interactions avec les acides nucléiques.

La thérapie génique est actuellement une voie de recherche en plein développement. Les résultats sont déjà très prometteurs et des essais cliniques sont en cours [135]. Il ne s'agit plus, ici, de transporter une molécule de synthèse mais une structure biologique (gène ou oligonucléotide) [136] jusqu'à son site d'action (noyau cellulaire ou cytoplasme). Le but est de modifier ou d'inhiber l'expression d'un gène d'une protéine cellulaire ou d'une protéine virale. Au contraire, il est possible de favoriser la synthèse d'une protéine particulière bénéfique à la vie de la cellule ou capable de modifier son dysfonctionnement. Les applications en thérapeutique des oligonucléotides antisens concernent surtout les maladies virales telles que le SIDA [137] et le traitement des cancers.

Après une brève présentation, nous aborderons les différents systèmes permettant le transport des nucléotides puis plus spécifiquement, les systèmes de transport impliquant les CDs. Nous porterons une attention particulière aux CDs permettant un ciblage des structures de surface des cellules.

1- Présentation : les oligonucléotides antisens

Définition : Les oligonucléotides antisens (Figure 42) sont de petits segments d'acide nucléique, simple brin, chimiquement synthétisés. Ils possèdent une affinité particulière pour les acides nucléiques qui sont leurs cibles et dont ils sont complémentaires. Ils sont capables d'inhiber sélectivement l'expression d'un gène qui code une protéine d'où leur intérêt en tant qu'agent thérapeutique.

Mécanismes d'action possibles [1, 138] : Ces oligonucléotides pénètrent dans la cellule par un mécanisme mal défini mais il est probable que ce soit par endocytose récepteur-dépendante. Ils s'hybrident avec leur acide nucléique cible *via* des liaisons hydrogène entre les paires de base des deux entités. Plusieurs mécanismes d'action sont alors possibles :

- inhibition de la replication de l'ADN ou de l'ARN,
- inhibition de la transcription du gène : il y aurait, dans ce cas, formation d'une triple hélice (triplex) entre l'ADN double brin et l'oligonucléotide ou d'une simple hélice avec un ARNg, ce qui empêche la synthèse de l'ARN messenger,

- inhibition de la traduction c'est-à-dire inhibition de la synthèse de protéines : l'oligonucléotide forme une double hélice avec l'ARN messager que les ribosomes ne peuvent pas traduire correctement et/ou que la RNase H détruit : la synthèse de la protéine codée est impossible ou incomplète selon le site d'intervention,
- ces oligonucléotides peuvent aussi se lier à des protéines extracellulaires et inhiber leur activité enzymatique.

Modifications chimiques [1, 135], l'utilisation des oligonucléotides en thérapeutique a mis en évidence un inconvénient dû à leur structure : ces molécules sont naturellement solubles dans les milieux biologiques et ont une grande affinité pour leur cible mais elles sont rapidement dégradées par les enzymes (nucléases) de la cellule et du sérum ce qui limite leur biodisponibilité. Pour palier à ces inconvénients, il est possible de les utiliser à de très fortes concentrations ou de modifier chimiquement leur structure tels qu'ils deviennent plus stables. Cette dernière voie a été largement développée car c'est la plus rationnelle pour privilégier leur utilisation thérapeutique *in vivo*. Il a donc été préparé des méthyl phosphonates, des phosphorothioates, des phosphoramidates et des α -oligonucléotides. Les phosphorothioates oligonucléotides restent les plus largement utilisés [135]. Les structures sont présentées dans la figure 42.

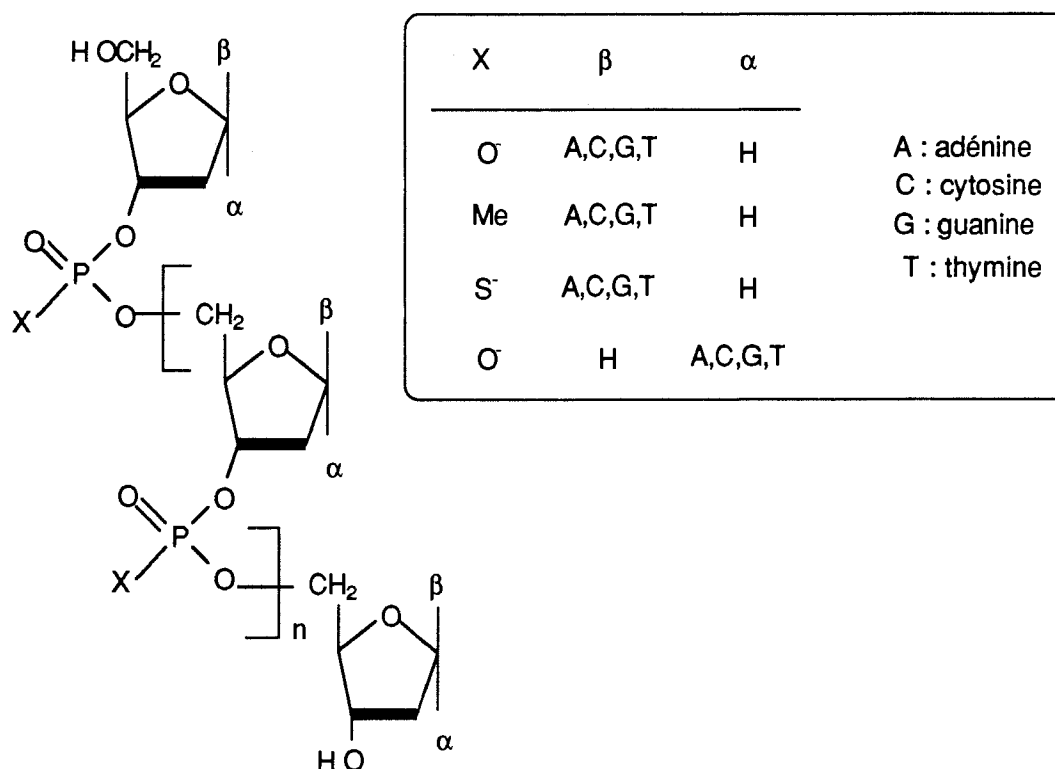


Figure 42 : Structures des principaux oligonucléotides modifiés

Il a été montré que pour qu'un oligonucléotide soit spécifique de sa cible, il devait contenir de quinze à dix-huit nucléotides, car statistiquement, toute séquence de dix-sept bases n'apparaît qu'une seule fois dans le génôme humain [138].

Applications thérapeutiques particulières :

- dans les maladies virales, il s'agit d'inhiber l'expression d'un gène codant pour une protéine intervenant dans le cycle de replication viral,
- dans les cancers, il s'agit d'inhiber les oncogènes, principaux responsables du mécanisme de la cancérisation ou de supprimer l'expression d'un gène particulier à la cellule cancéreuse. D'autres recherches sont faites pour supprimer les gènes de multi-résistance aux chimiothérapies anti-cancéreuses.

2- Systèmes de transport des oligonucléotides

Les facteurs limitants à l'utilisation des oligonucléotides sont leur grande sensibilité aux nucléases et leur capacité restreinte à entrer dans la cellule et à accéder au noyau car ce sont des composés ioniques qui traversent mal la membrane cellulaire. La modification de ces dérivés n'a pas d'incidence sur leur spécificité mais certains auteurs ont noté, avec les phosphorothioates, une inhibition non spécifique *in vivo* c'est-à-dire non liée à l'activité anti-sens de l'oligonucléotide [139]. Pour palier à cet inconvénient, il est nécessaire de trouver d'autres moyens que la modification chimique pour protéger les acides nucléiques contre les nucléases et en améliorer la pénétration cellulaire, par exemple en vectorisant ces actifs.

a- Autres que les CDs

Il existe déjà différents types de composés utilisés pour le transport et le ciblage des nucléotides ou oligonucléotides anti-sens (Tableau 15)

Tableau 15 : Différents systèmes de transport des oligonucléotides.

Transporteur	Molécule transportée	Caractéristiques	Réf
Liposomes Lipides cationiques (Fig. 43)	oligonucléotides	molécules lipidiques amphiphiles	[1, 140, 141, 142]
Polymères glycosylés	oligonucléotides	Dérivés poly-L-lysine glycosylés	[142a]
Nano-particules	oligonucléotides	polymères	[143]
acridine, alcaloïdes (Fig. 44)	oligonucléotides	sondes pour suivre la distribution de l'oligonucléotide	[2, 144]
Porphyrines fonctionnalisées et leurs complexes métalliques (Fig. 45)	nucléotides	très lipophiles, peuvent transporter le nucléotide de la phase aqueuse vers le milieu organique.	[145, 146]
Polyamines cationiques (Fig. 46)	nucléotides	forment des complexes 1:1 stables avec les nucléotides	[146, 147, 148]

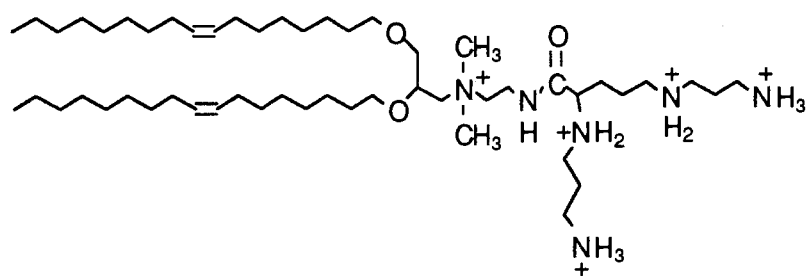


Figure 43 : Exemple de lipide cationique [138].

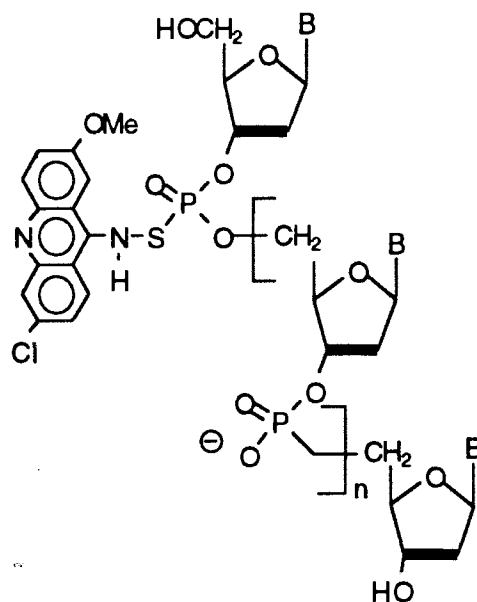


Figure 44 : Exemple de conjugué oligonucléotide-acridine [144].

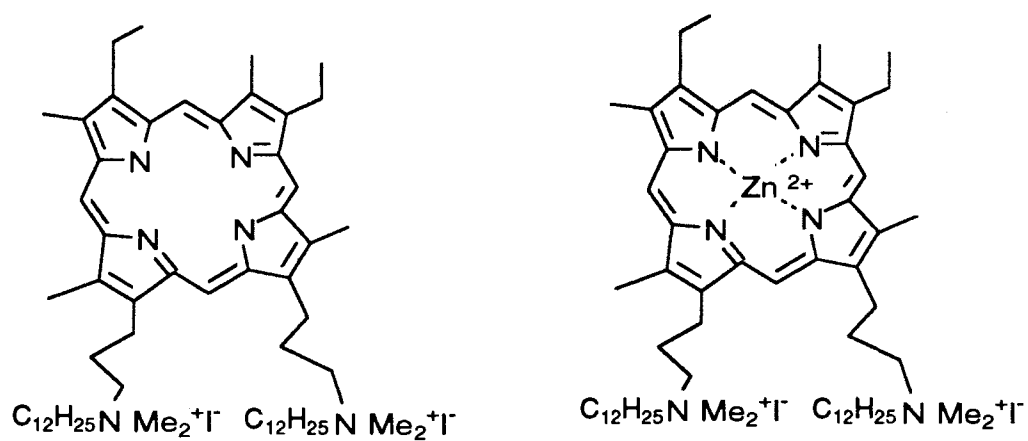


Figure 45 : Exemple de porphyrine fonctionnalisée et son complexe de zinc (II) [145].

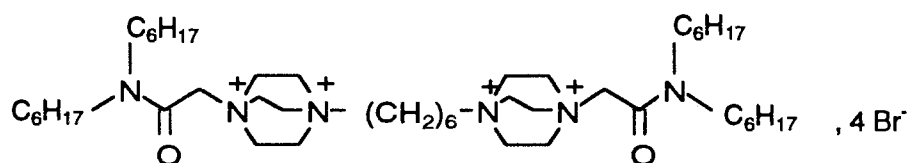


Figure 46 : Exemple de polyamine cationique [147].

b-CDs : Transporteurs de nucléotides

L'une des premières études, consacrée à la complexation des nucléotides par la β -CD a été réalisée par HOFFMAN et BOCK [149] en 1970. Par spectrophotométrie (UV-vis.), les auteurs mettent en évidence les complexes [CD-adénine], [CD-hypoxanthine], les bases pyrimidiques apparaissent ne pas participer à la complexation. La complexation de la base libre avec la CD provoque un effet hypochrome tandis que la complexation de la CD avec une base d'un oligonucléotide provoque au contraire un effet hyperchrome. D'autres études ont montré depuis que toutes les bases nucléiques pouvaient interagir avec la CD mais que les bases puriques et notamment l'adénine étaient mieux reconnues.

ANDERSON *et al.* [150, 151] étudient dès lors l'inclusion des nucléosides puriques avec différentes CDs natives et modifiées. Ces travaux portent principalement sur les dérivés déoxy ou didéoxy et montrent que la 2',3'-didéoxyadénosine (DDA) forme un complexe 1:1 avec l'hydroxypropyl- β -CD et la β -CD. La molécule est ainsi protégée contre l'hydrolyse acide. Il existe deux possibilités de complexation suivant que l'adénosine est sous sa forme neutre ou protonée sur l'azote en position 1 (Figure 47).

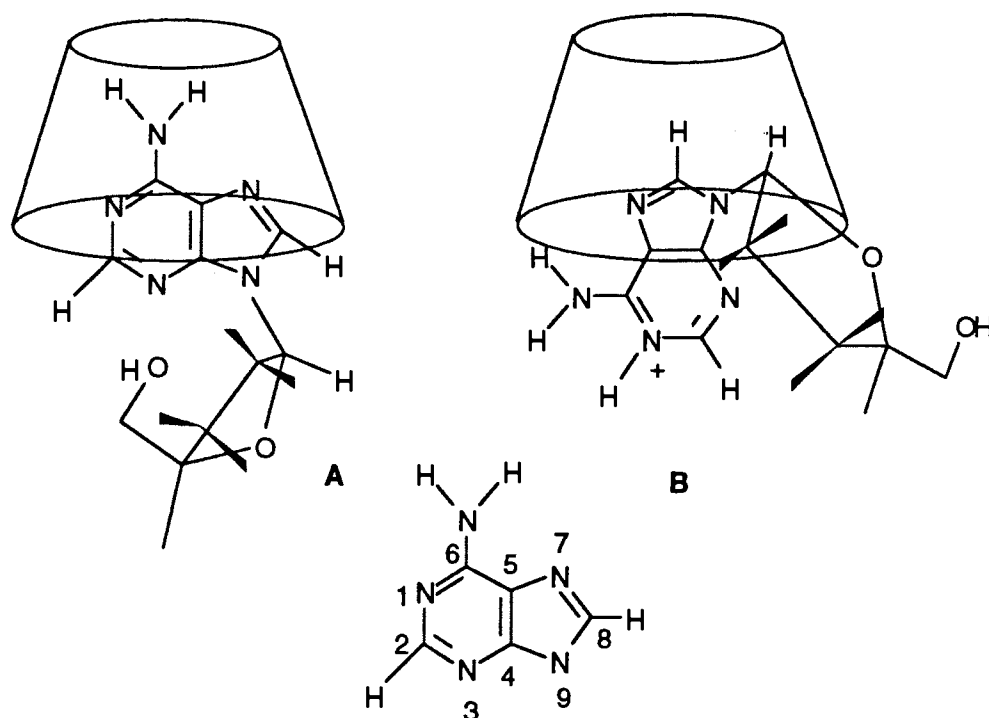


Figure 47 : Inclusions possibles de la DDA dans l'hydroxypropyl- β -CD. A : forme neutre, B : forme protonée [150].

L'inclusion du noyau purine dans la cavité de la CD empêche la protonation de l'azote en position 7, état de transition nécessaire à l'hydrolyse de la liaison C-N. Une telle protonation est déstabilisée dans le complexe. Les auteurs ont ensuite étendu leur étude aux autres nucléosides puriques et CDs. Il apparaît, d'une part, que l' α -CD du fait de sa cavité plus petite, ne peut pas complexer l'adénine (constante de complexation = $3,2 \text{ M}^{-1}$) et, d'autre part, que les constantes de complexation des purines avec la β -CD et l'hydroxypropyl- β -CD sont similaires.

La formation du complexe a été mise en évidence par l'observation d'une diminution de l'intensité du pic d'absorbance du nucléoside à 260 nm par addition de CDs. Ceci traduit le changement d'environnement du nucléoside et la perte de liaisons hydrogènes. La complexation a été confirmée par RMN ^1H . L'étude des modifications des déplacements chimiques et du taux d'échange proton-deutérium dans la molécule d'adénine a permis de caractériser le type de complexe formé à savoir, le complexe A (Figure 47).

En 1995, GORECKA *et al.* [152] étudient les effets d'une β -CD sulfobutyléther sur la solubilité et la stabilité de la O⁶-benzylguanine. Les structures des deux composés sont présentées dans la figure 48 :

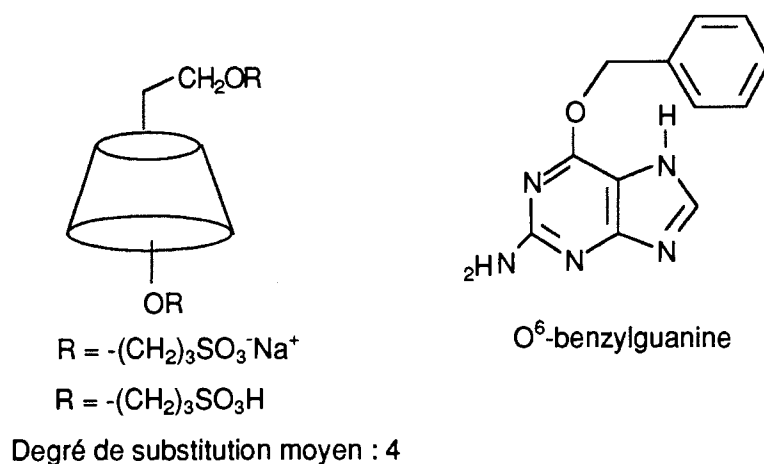


Figure 48 : Schéma de la sulfobutyléther β -CD et de la O⁶-benzylguanine [153].

La O⁶-benzylguanine potentialise les effets des agents alkylants anti-tumoraux qui réagissent avec la position 6 des résidus guanine de l'ADN. Elle est hydrolysée en guanine et alcool benzylique en milieu aqueux. Il était donc intéressant de savoir si sa complexation dans une CD pouvait la protéger afin d'augmenter sa demi-vie. Il apparaît que le taux de dégradation de la O⁶-benzylguanine est fortement ralenti en présence de la sulfobutyléther β -CD quelque soit le pH et que la solubilité de la molécule "invitée"

est améliorée jusqu'à vingt et une fois en fonction de la concentration de la CD. Par contre, la solubilité de la guanine n'est pas modifiée en présence de CD indiquant une faible interaction (constante de complexation = $3,5 \text{ M}^{-1}$) ce qui permet de supposer que dans le cas de la benzylguanine, c'est le noyau phényle qui se complexe à la CD. Ceci a d'ailleurs été confirmé par la RMN ^1H du complexe.

Dans les études précédentes, la complexation avec la CD avait toujours lieu avec la base du nucléoside ou du nucléotide. ELISEEV a montré le premier que la partie "sucre" (ribose) plus hydrophile pouvait être complexée dans une CD. Il a d'abord étudié la complexation d'anions pyrocatecholates carboxyliques avec des CDs mono ou poly ammonium [153]. Il a ainsi démontré que la liaison de ces anions à des amino-CDs était bien plus forte qu'avec les CDs natives car en plus des interactions hydrophobes, il se crée des interactions électrostatiques entre la fonction carboxylate et les groupes ammonium de la CD-hôte. En général, plus le nombre de groupes ammoniums sur la CD est important plus l'interaction avec l'anion "invité" est forte. Il a aussi montré que la stabilité du complexe dépendait du nombre de liaisons hydrogènes susceptibles de se former entre les deux entités. Des travaux plus anciens [154] avaient déjà montré l'importance de l'intervention des charges en présence dans le phénomène de complexation. L'amino-CD utilisée montrait une sélectivité de complexation du benzyl phosphate à pH 7. La dissociation du complexe était fortement dépendante du pH, donc de l'état d'ionisation des deux espèces en présence. La coopérativité de deux types d'interactions faibles (hydrophobes et électrostatiques) était mise en évidence.

Par la suite [155, 156], ELISEEV a utilisé des dérivés di et hépta-ammonium de la β -CD pour étudier la complexation de nucléotides phosphates mono ou poly anioniques notamment par RMN ^1H et par DSC. La structure du complexe avec le 5'-AMP est présentée dans la figure 49 :

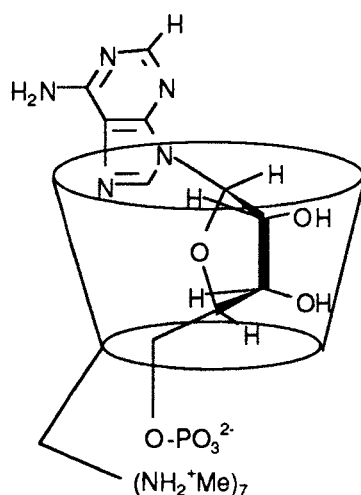
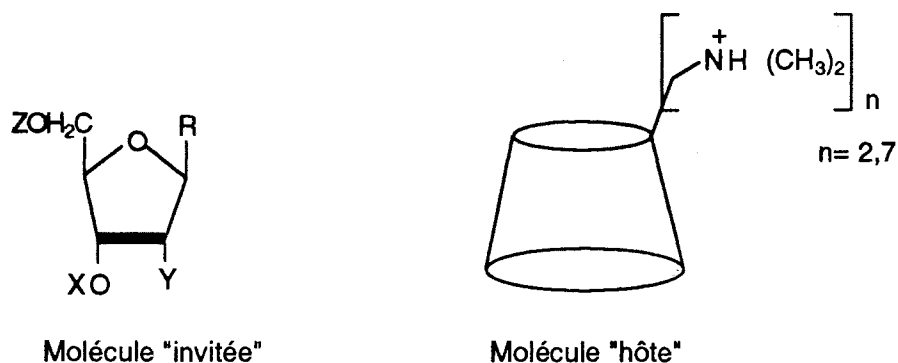


Figure 49 : Représentation schématique du complexe hepta amino- β -CD-5'-AMP [156].

Le tableau 16 présente les différents composés utilisés dans cette étude.

Tableau 16 : Structures des composés utilisés pour la formation des complexes "hôtes-invité".



Composés	R	X	Y	Z
5'-AMP	Adénine	H	OH	PO ₃ ²⁻
3'-AMP	Adénine	PO ₃ ²⁻	OH	H
5'-ATP	Adénine	H	OH	P ₃ O ₇ ⁴⁻
d-5'-AMP	Adénine	H	H	PO ₃ ²⁻
5'GMP	Guanine	H	OH	PO ₃ ²⁻
d-5'GMP	Guanine	H	H	PO ₃ ²⁻
5'CMP	Cytosine	H	OH	PO ₃ ²⁻
Cytidine	Cytosine	H	OH	H
d-5'-CMP	Cytosine	H	H	PO ₃ ²⁻
5'UMP	Uracile	H	OH	PO ₃ ²⁻
d-5'UMP	Uracile	H	H	PO ₃ ²⁻
Ribose-5-phosphate	OH	H	OH	PO ₃ ²⁻
d-Ribose-5-phosphate	OH	H	H	PO ₃ ²⁻

Dans ce cas, comme le montre la figure 49, c'est le ribose et non la base qui est inséré dans la cavité de la CD. Il apparaît que les constantes de complexation dépendent du nombre d'interactions par paires d'ions possibles (donc du nombre de charges sur le nucléotide et sur la CD).

Le dérivé disubstitué montre une spécificité prononcée pour les nucléotides puriques (AMP, GMP) par rapport aux dérivés pyrimidiques. Ceci peut s'expliquer par la plus grande hydrophobie des bases puriques par rapport aux bases pyrimidiques mais surtout par le fait que la base nucléique peut former des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles secondaires de la CD car les interactions électrostatiques entre phosphate et groupe amino sont relativement faibles. La différenciation entre nucléotides puriques et pyrimidiques serait le résultat de la plus grande surface π des purines (adénine) permettant une plus grande polarisabilité et donc une interaction plus forte. Ce dérivé différencie aussi les positions du phosphate (3' ou 5') (Tableau 17). L'hepta-amino-CD par contre, est capable d'établir des interactions très fortes avec le phosphate ce qui pousse le nucléotide plus loin à l'intérieur de la cavité de la CD et diminue les contacts entre la base nucléique et la CD. La représentation schématique de la figure 50 montre ces différences dans la complexation.

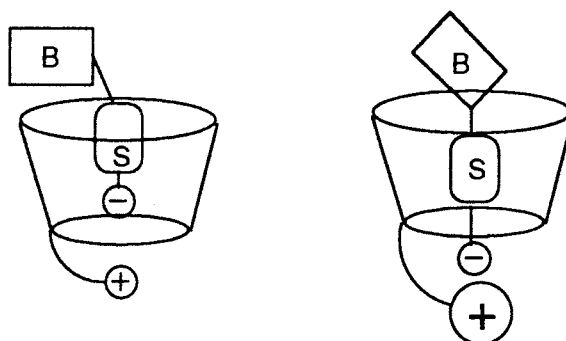


Figure 50 : Influence des interactions électrostatiques entre le phosphate et la β -CD di- ou hepta-ammonium [156].

Les auteurs ont aussi montré que le ribose-5'-phosphate et le déoxyribose-5'-phosphate se complexaient mieux aux deux amino-CDs étudiées que le nucléoside et le déoxy nucléotide monophosphate ce qui traduit des interactions spécifiques entre les CDs et le sucre. D'après la modélisation moléculaire du complexe entre la diamino- β -CD et le ribose phosphate (Figure 51), la complexation du ribose dans la CD met en jeu des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

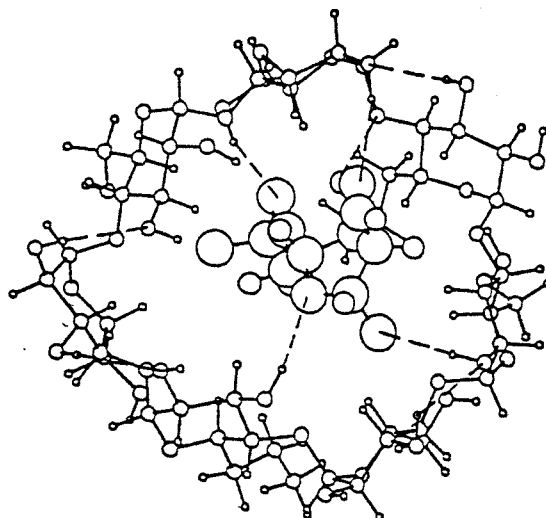


Figure 51 : Structure du complexe entre la diamino- β -CD et le ribose phosphate obtenu par modélisation moléculaire² [156].

Ces liaisons hydrogènes permettent à la diamino-CD d'établir une discrimination entre les 2'-oxy et 2'-déoxy ribose. Le ribose, bien que plus hydrophile est beaucoup mieux reconnu que le 2'-déoxyribose par la présence d'une liaison hydrogène supplémentaire qui peut s'établir entre la CD et l'hydroxyle en 2'. A titre d'exemple, la constante de complexation est environ dix fois plus élevée avec le 5'-AMP (Tableau 17). Quant au dérivé hepta-aminé, il établit la discrimination entre l'ATP et l'AMP (constante de complexation très supérieure avec l'ATP, Tableau 17).

Il apparaît que la complexation est dépendante de la température et du pH c'est-à-dire de l'état d'ionisation du nucléotide et des amino-CDs. Celle-ci n'est effective qu'à pH 7 lorsque les amino-CDs sont protonées et les groupes phosphates des nucléotides sous forme anionique. La stoechiométrie des complexes est 1:1 et le ribose ainsi qu'une partie de la base sont situés à l'intérieur de la cavité (Figure 49). Les constantes et les énergies libres de complexation ont été calculées et sont rassemblées dans le tableau 17.

Sur la base de ces données, ELISEEV a pu analyser et quantifier le rôle respectif des différentes espèces intervenant dans la complexation des nucléotides avec les CDs ammonium. Ainsi, l'énergie libre moyenne de complexation est de $27,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, le ribose intervient ici pour $8,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, ce qui permet de déduire que l'interaction par paire d'ions entre le phosphate et les groupes ammonium intervient pour $19\text{-}20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ dans l'énergie libre totale de complexation. Il est intéressant de noter que l'ion phosphate inorganique a la même énergie libre de complexation.

² : CHARM m : HARVARD University

Tableau 17 : Constantes et énergies libres de complexation [156].

molécule complexée	Di amino-β-CD		Hepta amino-β-CD	
	10 ⁻³ K	-ΔG	10 ⁻⁵ K	-ΔG
5'-AMP	14,1	23,7	1,26	29,1
3'-AMP	1,51	18,1	0,92	28,2
d-5'-AMP	0,48	15,3	1,17	28,9
5'GMP	6,16	21,6	0,40	26,2
d-5'GMP		< 15	5,89	32,9
5'CMP	0,83	16,6	0,20	24,5
d-5'CMP		< 15	0,44	26,5
5'UMP	0,83	16,6	0,87	28,1
d-5'UMP		< 15	0,38	26,1
5'-ATP	97,7	28,4	32,4	37,1
Ribose-5-phosphate	11,2	23,1	8,51	33,8
d-Ribose-5-phosphate	2,4	19,3	8,13	33,7
PO ₄ ³⁻	0,20	13,1	0,037	20,3
Ribose			0,00026	8,1

Enfin, une étude récente [157] a montré que la présence de fonctions ammonium potentialisait les capacités d'hydrolyse des fonctions phosphodiester du complexe de cuivre (II) d'une bipyridine fonctionnalisée. La structure de ce composé et son mécanisme d'action possible sont présentés dans la figure 52.

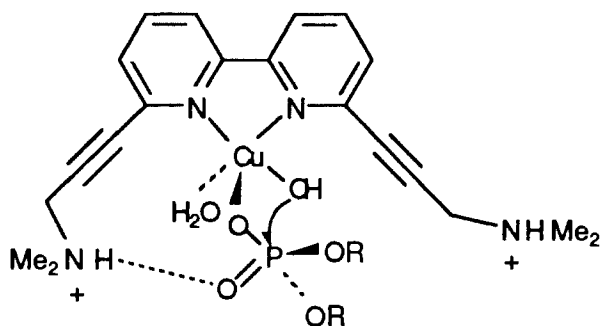


Figure 52 : Structure et mécanisme possible de l'hydrolyse [157].

Il y a formation d'une liaison hydrogène entre le groupe phosphate, coordonné au métal, et le groupe ammonium ce qui place le substrat dans une position favorable pour l'hydrolyse.

Ces résultats montrent que nous disposons ici d'un moyen efficace et sélectif pour complexer les nucléotides en fonction de différents paramètres relatifs, à leur structure et à leur nombre de charges. De plus, ces composés peuvent posséder une activité enzymatique potentielle.

En 1995, pour la première fois à notre connaissance, des travaux sont publiés sur l'utilisation des CDs et de leurs dérivés dans le but de réaliser des transporteurs d'oligonucléotides anti-sens [158]. Les auteurs ont axé leur étude sur les modifications de la pénétration cellulaire d'un oligodéoxynucléotide anti-sens phosphorothioate dans une cellule pathologique en présence de CDs.

Il ressort que la concentration intra-cellulaire en oligonucléotide phosphorothioate est augmentée lorsqu'au départ, il est complexé à la CD. Pour obtenir ce résultat, il est nécessaire d'être en large excès de CD par rapport à l'oligonucléotide (au minimum sept cents fois). La pénétration cellulaire de l'oligonucléotide dépend de la concentration en CD : une augmentation du rapport molaire de CD améliore l'entrée de l'oligonucléotide dans la cellule. Des mesures par cytométrie de flux, de la fluorescence de l'oligonucléotide marqué à la fluoresceine, en fonction du temps d'incubation avec les cellules, ont montré que de plus grandes quantités d'oligonucléotide pénétraient dans la cellule et que cette phase de pénétration se prolongeait dans le temps en présence de CDs.

Par contre, la complexation ne protège pas l'oligonucléotide de la dégradation par les nucléases cellulaires. Dans tous les cas, les effets les plus significatifs sont obtenus avec les hydroxyalkyl- β -CDs.

L'étude de l'efflux du nucléotide hors de la cellule a permis aux auteurs de montrer que la CD agissait en augmentant la pénétration cellulaire et non en diminuant l'excrétion du nucléotide.

Récemment, les mêmes auteurs ont poursuivi leurs investigations [159] cette fois en synthétisant des conjugués de β -CD (ou d'adamantane) et de différents oligonucléotides (phosphodiester et phosphorothioate) liés par une liaison carbamate. Les structures de ces conjugués sont présentés dans la figure 53.

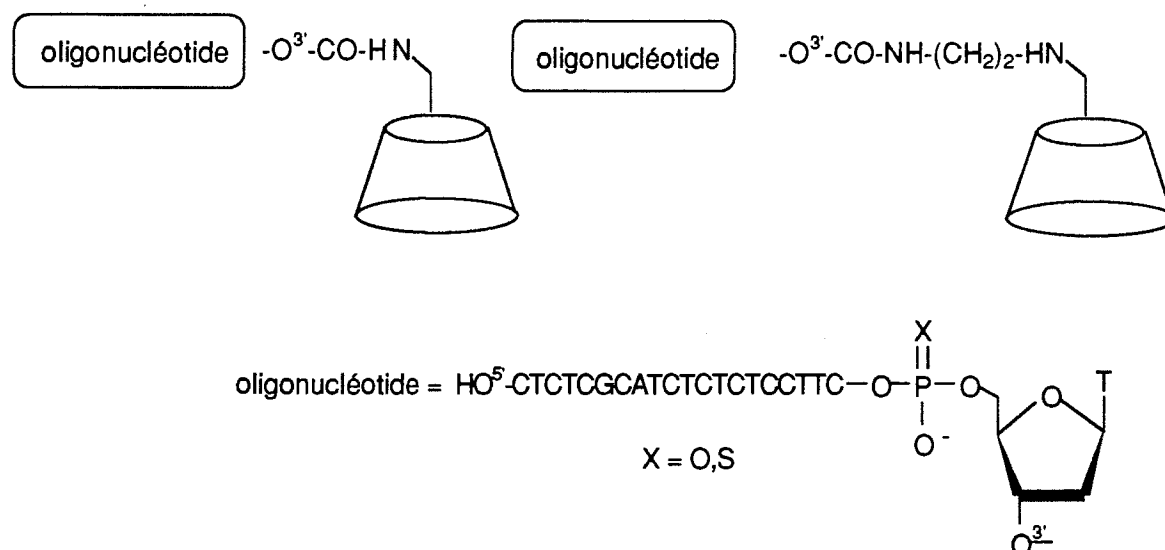


Figure 53 : Structure des conjugués oligonucléotide-CD [159].

Les conjugués impliquant la β -CD résultent du couplage de la mono-amino- β -CD ou de la mono-aminoéthylamino- β -CD avec l'extrémité 3' du nucléotide *via* un bras carbamate. La biologie montre que ce conjugué ne s'hybride que partiellement avec son ARN complémentaire, certainement parce que les nucléotides se complexent dans la cavité des CDs aminées comme l'a montré ELISEEV. Par contre, l'oligonucléotide lié par liaison covalente à la CD est protégé contre l'action des 3'-exonucléases.

Enfin, une étude par fluorescence sur la capacité du conjugué oligonucléotide-adamantane à entrer dans la cellule en présence de différents dérivés de CDs a été effectuée *via* le marquage de l'oligonucléotide avec la fluorescéine. Il ressort que c'est le complexe formé entre l'hydroxypropyl- β -CD et ce conjugué qui permet la plus forte entrée d'oligonucléotides dans la cellule et que cette complexation protège l'oligonucléotide contre les exonucléases et n'altère pas ses capacités à s'hybrider avec son ARN complémentaire. Le fait que l'oligonucléotide soit couplé à la CD par liaison covalente n'a pas d'influence sur son entrée dans la cellule qui reste identique à celle observée pour l'oligonucléotide seul.

Ce premier exemple démontre les potentialités évidentes des CDs en tant que transporteur de nucléotides d'autant plus que contrairement à d'autres systèmes de transport, elles peuvent supprimer l'immunogénicité des oligonucléotides modifiés qu'elles transportent et ainsi éviter une destruction par phagocytose d'où une meilleure efficacité potentielle de l'actif. Enfin, nous avons vu qu'il n'est pas nécessaire de lier de manière covalente la CD à l'oligonucléotide, des effets biologiques (entrée dans la

cellule, liaison aux acides nucléiques) bien supérieurs étant obtenus par simple complexation.

3- Interactions CDs-acides nucléiques

En 1993, UENO *et al.* [160] préparent un hétérodimère constitué d'une β -CD couplée à un peptide et d'un adamantane complexé à cette CD et couplé au même peptide. La figure 54 en représente la structure :

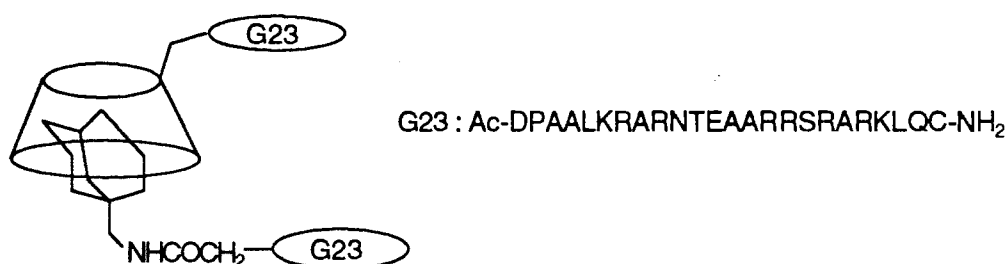


Figure 54 : Hétérodimère β -CD-adamantane-G23 [160].

Ce dimère s'est avéré apte à se lier à une séquence spécifique d'ADN au contraire du conjugué adamantane-peptide. Le dérivé CD seul montre, quant à lui, une faible interaction. De plus, cet hétérodimère se lie à l'ADN avec les mêmes mécanismes de reconnaissance que ceux observés avec la protéine native. Ce type de dimère pourrait être intéressant pour étudier la structure quaternaire de protéines artificielles en solutions aqueuses.

DIVAKAR *et al.* [161] ont étudié la liaison entre le complexe Cu^{2+} - β -CD et l'ADN de thymus de veau. Les auteurs ont utilisé différentes méthodes spectroscopiques (UV, Fluorescence, Dichroïsme Circulaire) pour mettre en évidence cette complexation. Il apparaît qu'il se forme un complexe ternaire entre le cuivre, la CD et l'ADN qui est dissocié par l'addition d'EDTA. La constante de complexation, calculée par la méthode de Scatchard (45280 M^{-1}), est très élevée. Les mesures de fluorescence, réalisées en présence de bromure d'éthidium, ont montré une diminution du signal de fluorescence lorsque l'on ajoute du complexe Cu^{2+} - β -CD ce qui indique que le complexe agit de la même façon que certains agents intercalants anti-tumoraux en changeant l'état d'énergie du bromure d'éthidium.

Enfin, les auteurs ont montré que le complexe Cu^{2+} -CD protégeait l'ADN de la dégradation en milieu acide et que la structure de l'ADN n'était pas modifiée par la présence de la CD tandis que la β -CD seule ne montre aucune interaction avec l'ADN.

III- Les CDs glycosylées

Les CDs glycosylées sont des CDs sur lesquelles sont branchées une ou plusieurs unités oligosaccharidiques. Leur intérêt immédiat est leur plus grande solubilité dans l'eau par rapport aux CDs natives. Avec le développement de la recherche sur la vectorisation, ces CDs prennent une importance accrue car la possession de structures glycaniques capables d'être reconnues par des récepteurs biologiques présents dans les membranes cellulaires (*e.g.* lectines) peut permettre d'envisager un ciblage spécifique des actifs médicamenteux.

Les CDs glycosylées peuvent être obtenues par voie enzymatique [162] ou par voie chimique. Seule la seconde voie sera détaillée dans cette section. La reconnaissance de ces molécules par les lectines et les récepteurs membranaires sera aussi abordée.

1- Synthèse chimique de CDs glycosylées.

α - Synthèse de O-glycosyles-CDs

En 1988, TAKEO *et al.* [28] décrivent la synthèse de la mono 6-O- α -D-glucopyranosyl- α -CD, en cinq étapes à partir de l'hexakis(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- α -CD (Figure 55).

La même année FÜGEDI *et al.* [162a] décrivent la synthèse de la mono 6-O- α -D-glucopyranosyl- β -CD, en cinq étapes à partir de la β -CD native. Cette synthèse utilise un intermédiaire de β -CD monosilylé en position 6.

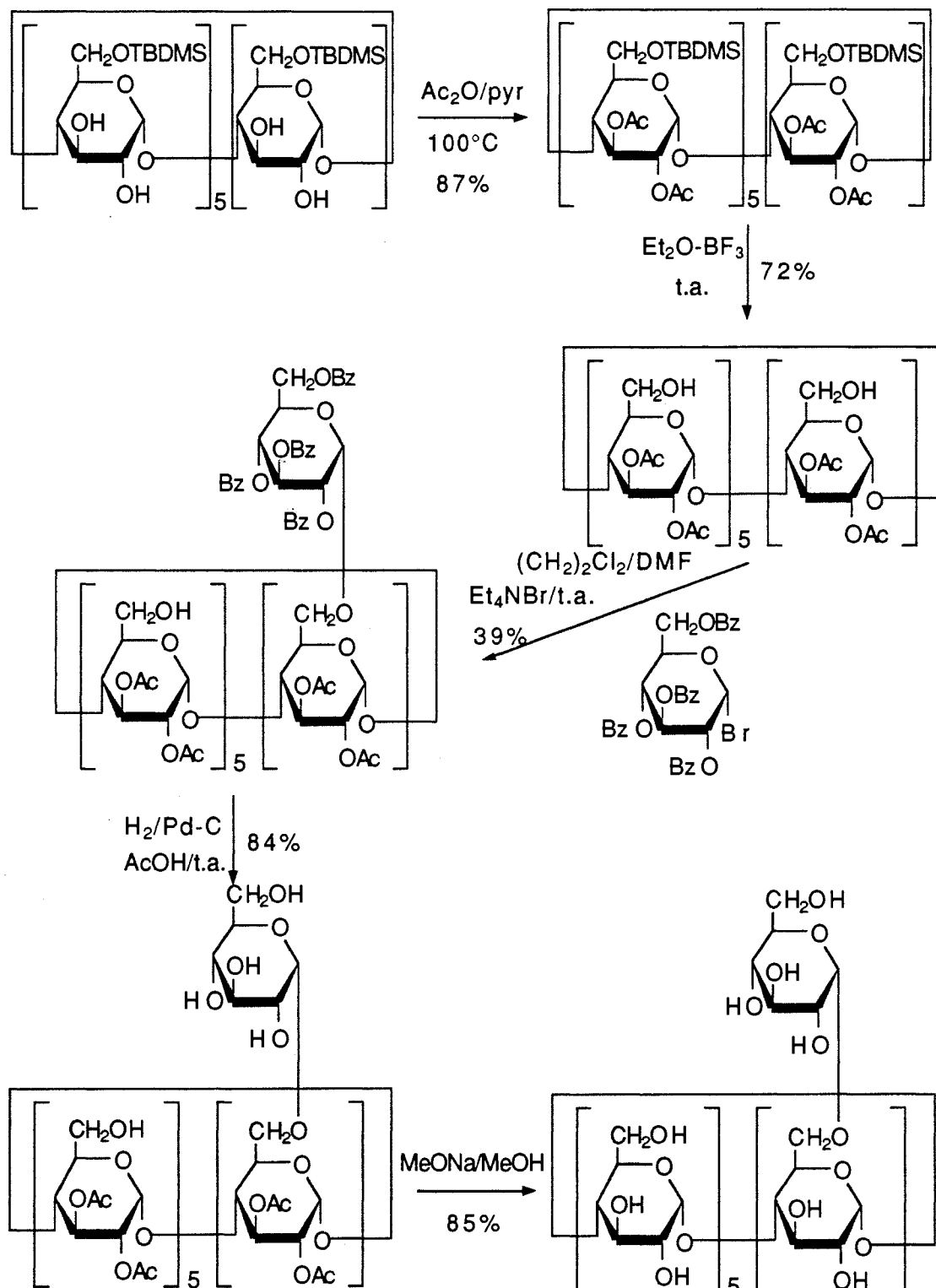


Figure 55 : Synthèse de la mono 6-O- α -D-glucopyranosyl- α -CD [28].

La réaction procède par condensation de l'hexakis(2,3-Di-O-acétyl)- α -CD avec le bromure de 2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyle en présence de bromure de

tétraéthylammonium dans un mélange DMF-1,2-dichloroéthane pendant 20h à température ambiante (Rdt : 39%). La glucosyl- α -CD est ensuite débenzylée et déacétylée.

En 1995, TANIMOTO *et al.*[95] décrivent la synthèse de quatre isomères de position de la di-glucosyl- γ -CD. Les intermédiaires-clés de cette synthèse sont respectivement les 6¹,6²- et 6¹,6³-Di-O-(tert-butyldiméthylsilyl)- γ -CDs et les 6¹,6⁴- et 6¹,6⁵-Di-O-trytil- γ -CDs. Ces dérivés sont acétylés et déprotégés puis la glucosylation est effectuée avec le 2,3,4,6-tétra-O-benzyl- α -D-glucopyranose trichloroacétamdate, dans le dichlorométhane en présence d'acide trifluorométhane sulfonique (catalyseur), pendant 1h à -20°C (Figure 56). Les rendements varient de 75 à 86% selon les isomères. Ces dérivés sont ensuite déprotégés et purifiés par CLHP, chacun d'entre-eux étant un mélange d'anomères de configuration contenant des CDs liées en α (1→6) et des CDs liées en β (1→6).

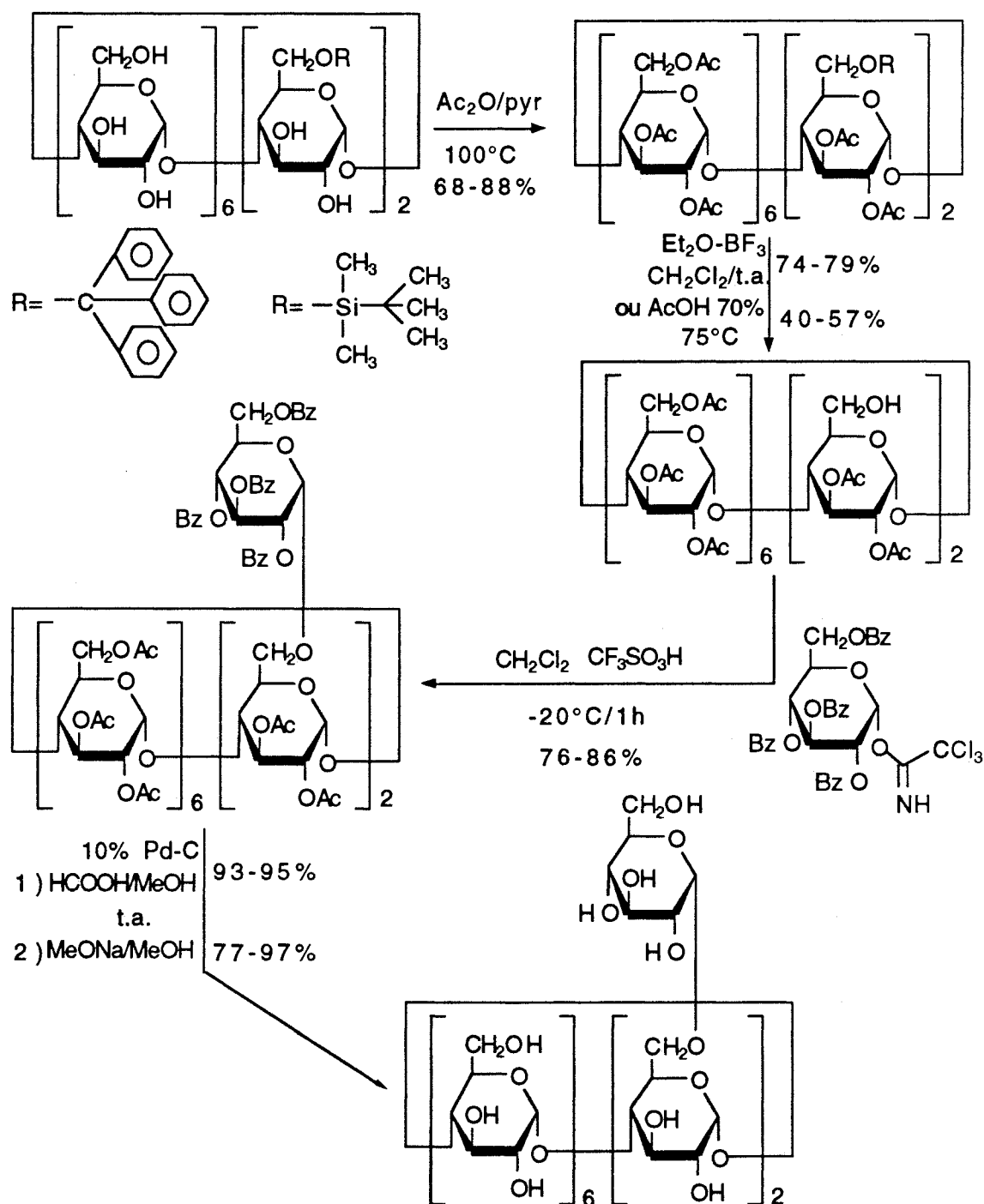


Figure 56 : Synthèse de Di-O-α-D-glucosyl-γ-CDs [95].

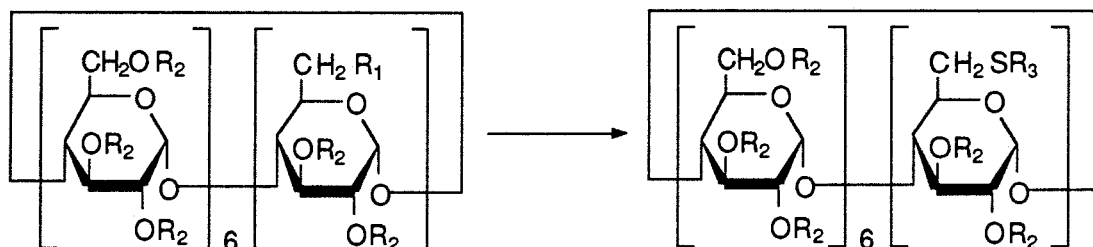
b- Synthèse de S-glycosyles-CDs

Il existe deux méthodes générales de S-glycosylation :

- soit à partir de composés acétylés,
- soit à partir de composés natifs,

Dans les deux cas, le couplage s'effectue entre une CD substituée par un nucléofuge (halogénure, tosylé) et un monosaccharide portant une fonction thiol ou thiolate potentielle nucléophile en position anomérique dans un solvant polaire aprotique (HMPT, DMPU).(Tableau 18)

Tableau 18 : Synthèses de mono-S-glycosyles-β-CDs



R ₁	R ₂	R ₃	Monosaccharide	Conditions	Rdt	Fig.	Réf
I	Ac	Glc	S-acétyl-1-thio-α-D-glc	HMPT-Cyst.-1,4-DTE-12h-t.a.	80%	57	[25]
I	Ac	Glc	S-acétyl-1-thio-β-D-glc	HMPT-Cyst.-1,4-DTE-12h-t.a.	60%	57	[25]
I	Ac	Gal	S-acétyl-1-thio-β-D-gal	HMPT-Cyst.-1,4-DTE-12h-t.a.	85%	58	[164]
I	Ac	Man	1-thio-α-D-man	HMPT-Cyst.-1,4-DTE-12h-t.a.	83%	58	[164]
I	H	Glc	Sel de sodium du 1-thio-β-D-glc	DMSO-12h-70°C-N ₂	47%	59	[165]
I	H	Glc	Sel de sodium du 1-thio-β-D-glc-1,2-éthane dithiol	DMSO-12h-70°C-N ₂	32%	59	[165]
OTs	H	Glc	Sel de sodium du 1-thio-α-D-glc	DMPU-3h-70°C-N ₂	66%	60	[22]
OTs	H	Glc	Sel de sodium du 1-thio-β-D-glc	DMPU-5h-70°C-N ₂	60%	60	[22]
OTs	H	Malt	Sel de sodium du 1-thio-α-maltose	DMPU-18h-50°C-N ₂	65%	62	[166]
OTs	H	Glc	Sel de sodium du 1-thio-β-maltose	DMPU-18h-50°C-N ₂	68%	62	[166]

En ce qui concerne la méthode employant les dérivés acétylés, elle a été décrite par COTTAZ en 1989 [25]. Elle procède *via* la S-déacétylation et l'activation *in situ* d'un thioglycose avec la cystéamine (cyst.) dans le HMPT, en présence de 1,4- dithioérythritol (1,4-DTE). Le thiolate ainsi obtenu est couplé à la mono-iodo peracétyl-β-CD. Les CDs glycosylées sont ensuite déacétylées par le méthanolate de

sodium dans le méthanol. (Figure 57). Une méthode similaire a été utilisée par LANCELON-PIN (Figure 58)[18].

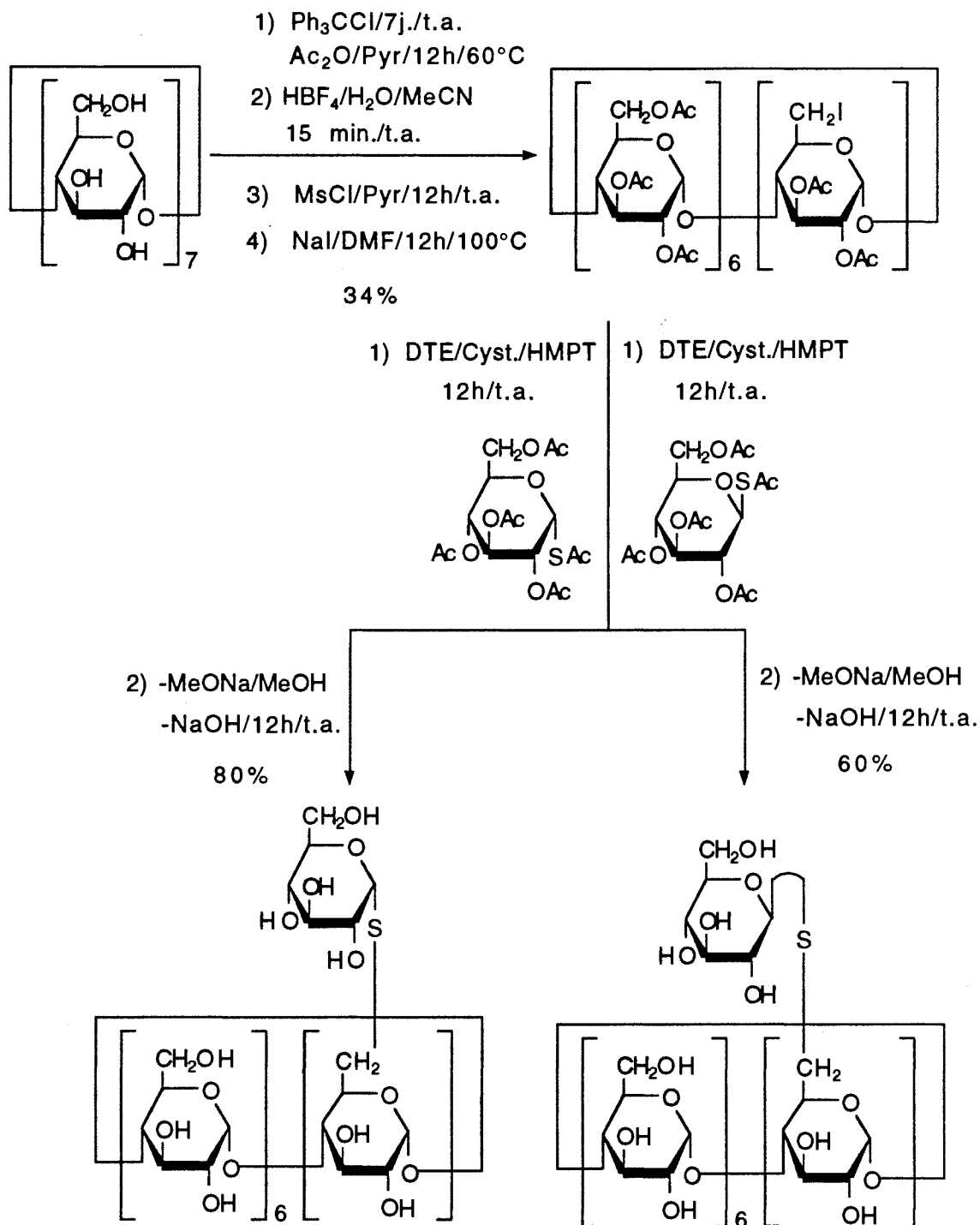


Figure 57 : Synthèse de 6-thioglucosyl- β -CDs [25].

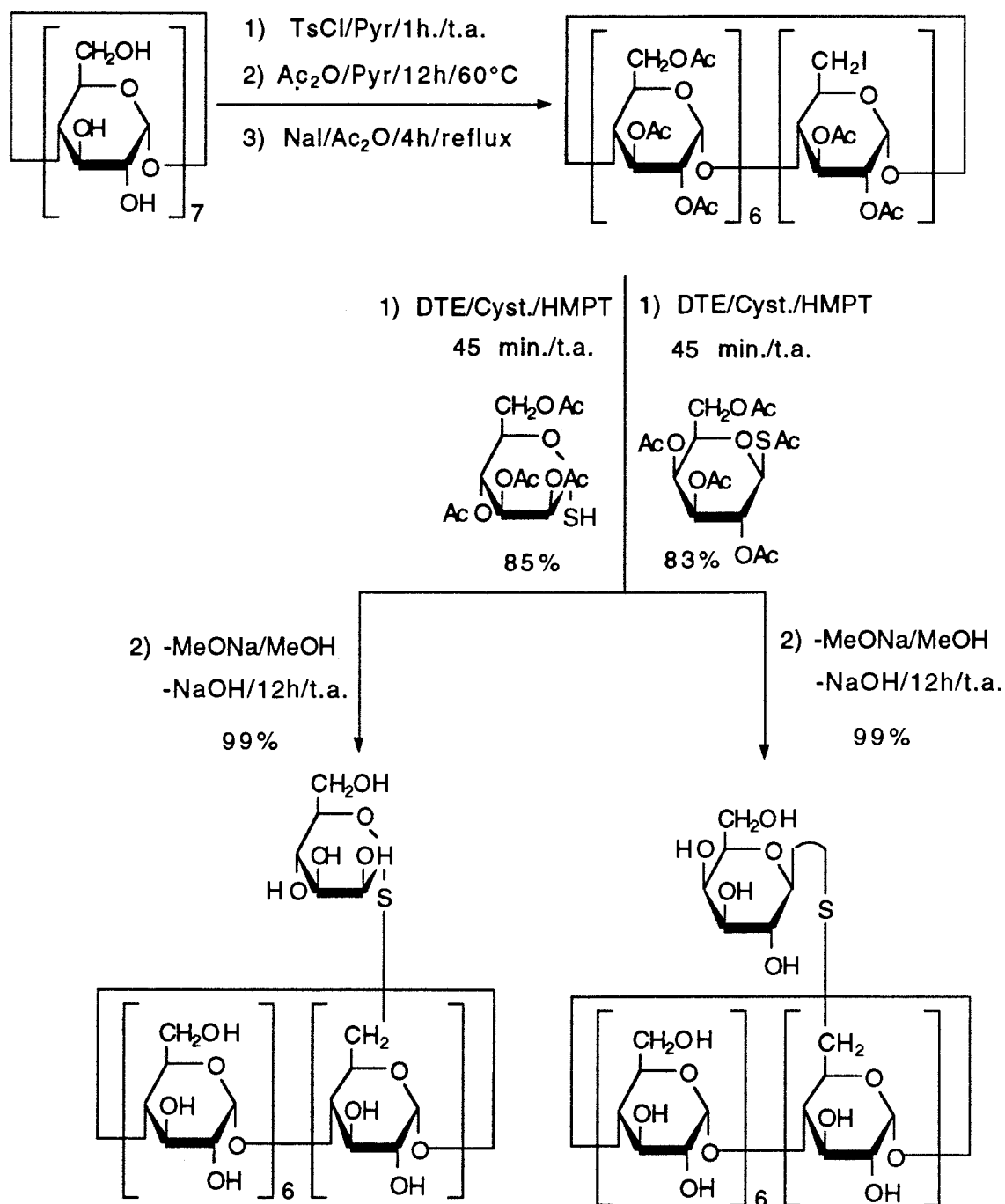


Figure 58 : Synthèse de monoglycosyl-β-CDs [18, 164].

En ce qui concerne la méthode employant les dérivés non protégés, elle procède par réaction de la monotosyl- ou de la mono-iodo-β-CD avec sel de sodium du 1-thioglycoside dans le DMSO [165] ou le DMPU [22, 166] (Figures 59 et 60).

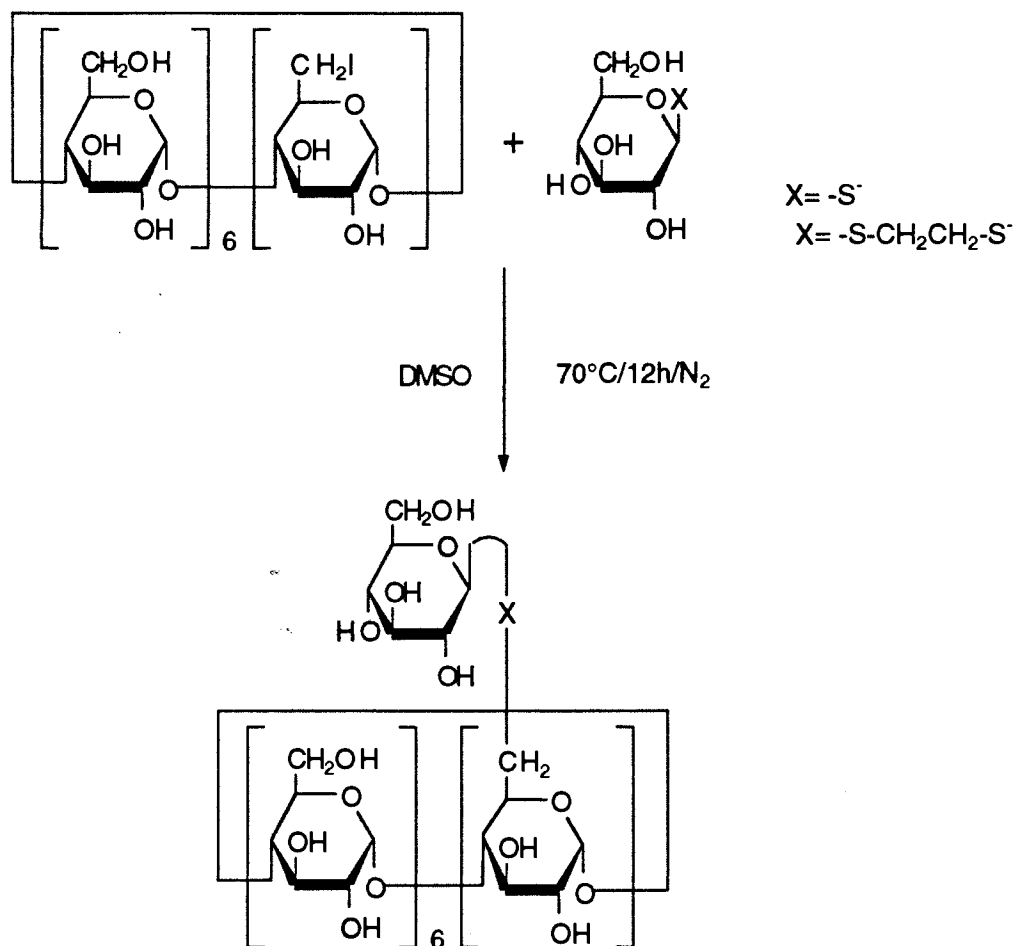


Figure 59 : Synthèse de S-glucosyl-β-CDs [165].

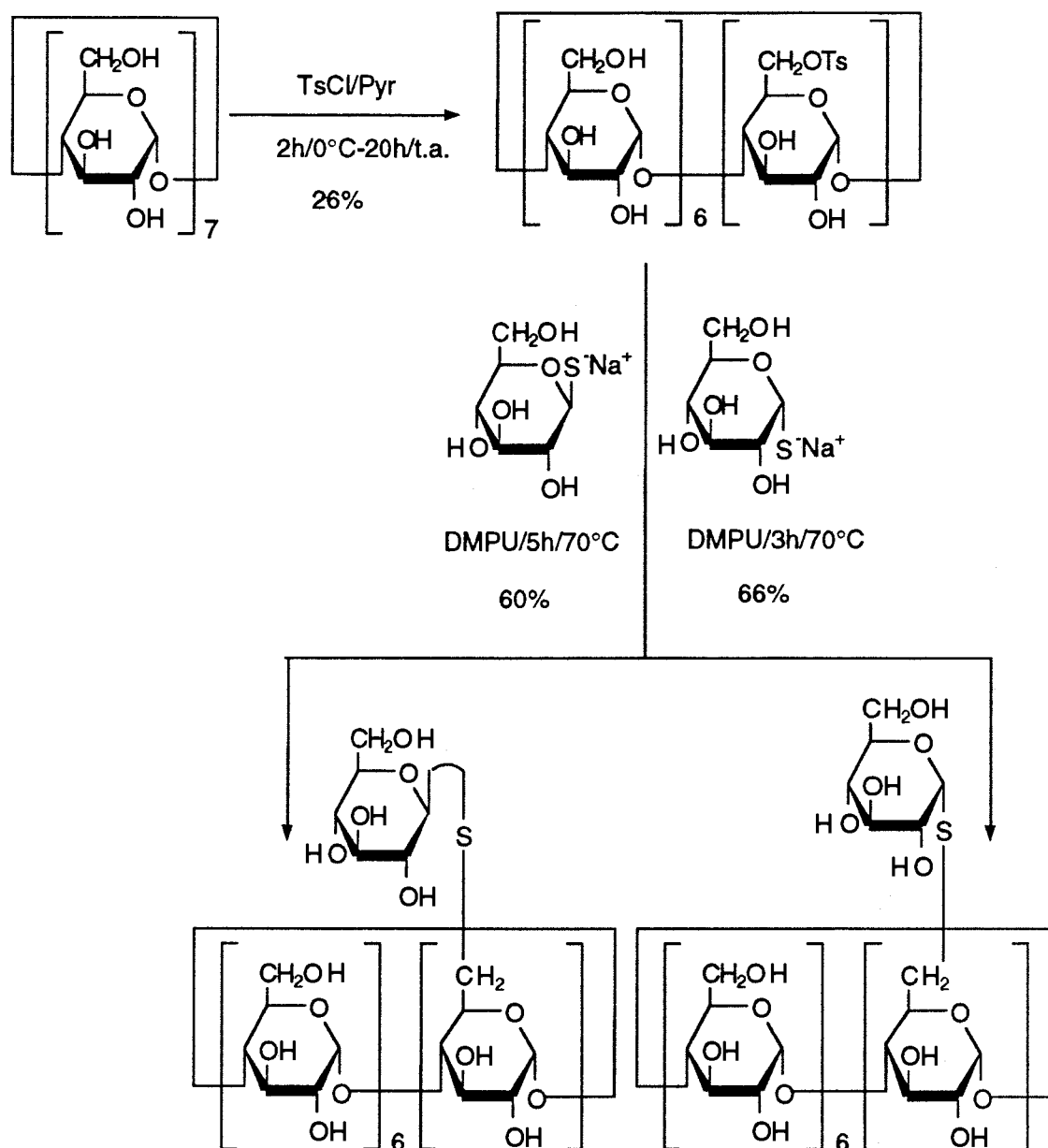


Figure 60 : Synthèse de S-glucosyl-β-CDs [22].

Dans les deux cas, les rendements en CDs substituées par les anomères α des mono ou disaccharides sont toujours supérieurs à ceux obtenus avec les anomères β .

L'obtention des CDs per S-galactosylées a été décrite par DE ROBERTIS [163]. La figure 61 présente le schéma de synthèse :

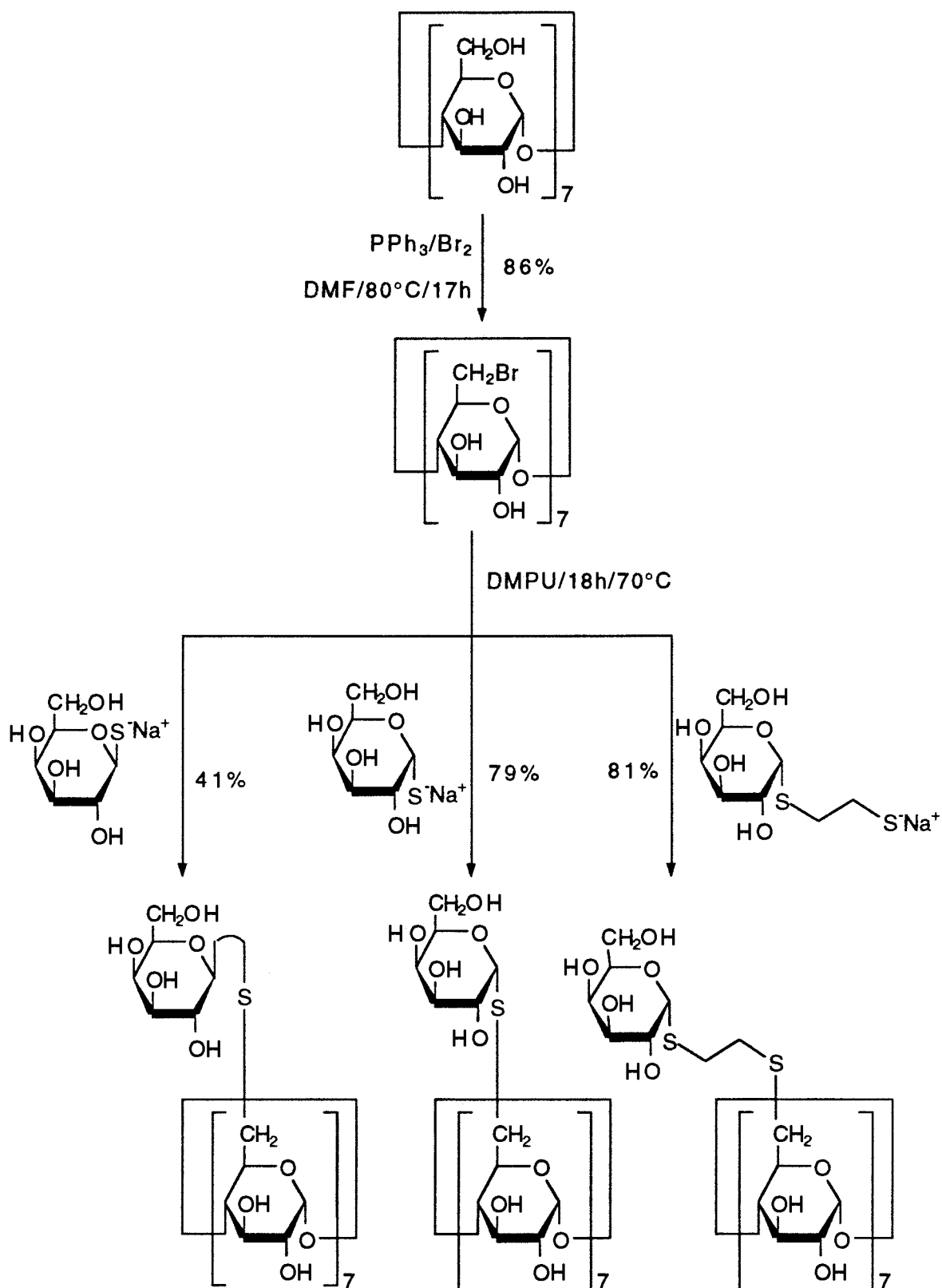


Figure 61 : Synthèse de per-S-galactosyl-β-CDs [163].

La réaction procède dans le DMPU à 70°C sous atmosphère d'argon par réaction de la per bromo-β-CD avec un excès des sels de sodium des monosaccharides désirés. Les

heptakis(6-S- α - et 6-S- β -D-galactosyl)-6-thio- β -CDs et l'heptakis(6-S-[2-(α -D-galactopyranosylthio)éthyl]-6-thio)- β -CD ont été synthétisées selon cette méthode avec des rendements respectivement de 79, 41 et 81%. Dans ce cas aussi, l'anomère β est beaucoup moins réactif que l'anomère α et nécessite l'utilisation d'un plus grand excès de sel de sodium de 1-thio- β -D-galactose.

Selon une méthode analogue mais à partir de la periodo- β -CD, LAINE *et al.* [166] décrivent, en 1995, la synthèse des heptakis(6-S- α - et 6-S- β -D-glucosyl)-6-thio- β -CDs avec des rendements respectifs de 87 et 80% (Figure 62).

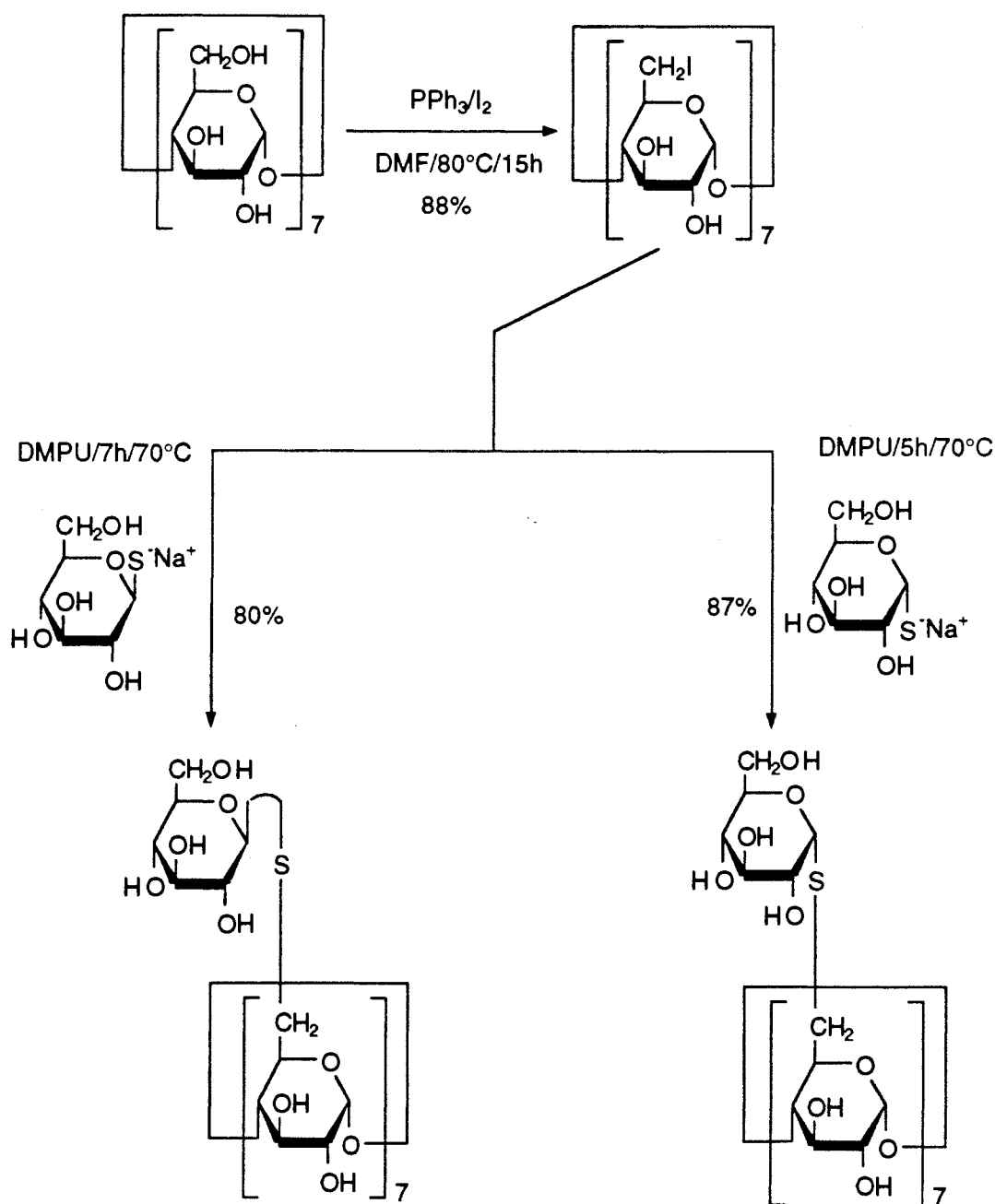


Figure 62 : Synthèse de per-S-glucosyles- β -CDs [166].

Enfin, la synthèse de polyglucosyl- β -CD a été décrite par O'SULLIVAN *et al.* [167] à partir de l'hexabromo- β -CD avec le sel de sodium du 1-thio- β -D-glucose ou du 1-thio- β -D-glucopyranosyl-éthane-1,2-dithiol, dans le DMSO, à 75°C pendant 48h. (Figure 63) :

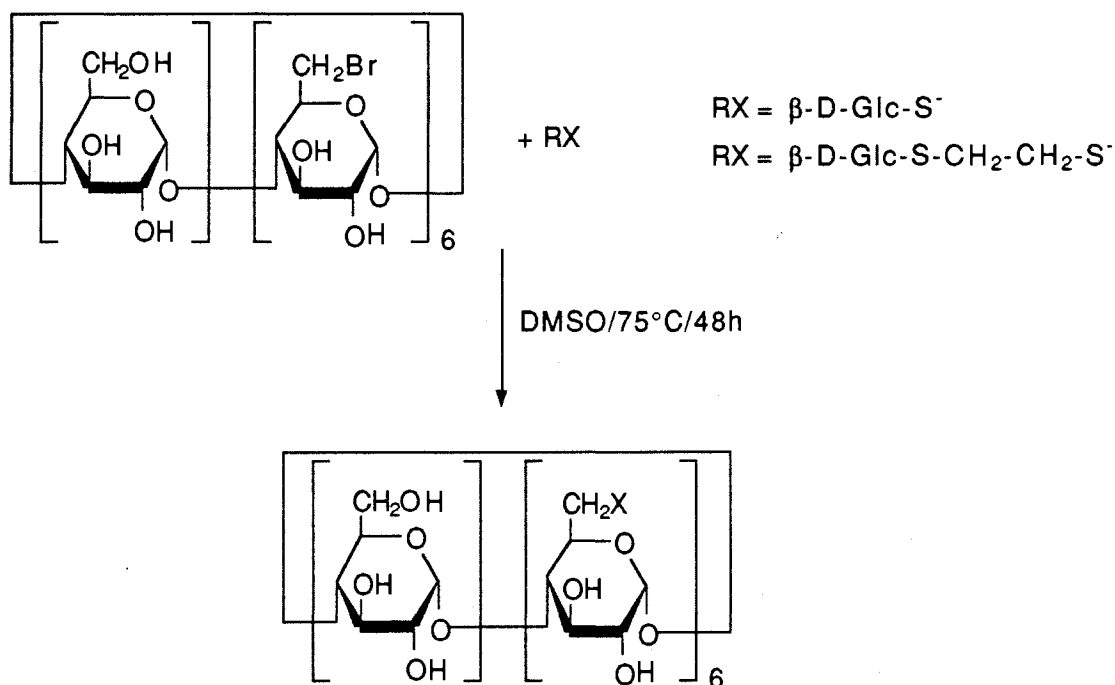


Figure 63 : Synthèse de poly-S- β -glucosyl- β -CDs [167].

c- Synthèse d'amido-glycosyles-CDs

Avec le même objectif que précédemment, DE ROBERTIS synthétise des galactosyl-CDs comportant un bras hydrophobe aromatique [163]. Les 1-thio-galactoses sont d'abord couplés à l'acide 2-fluoro-5-nitro benzoïque puis le produit obtenu réagit avec la mono-6-amino- β -CD dans les conditions d'un couplage peptidique (Figure 64).

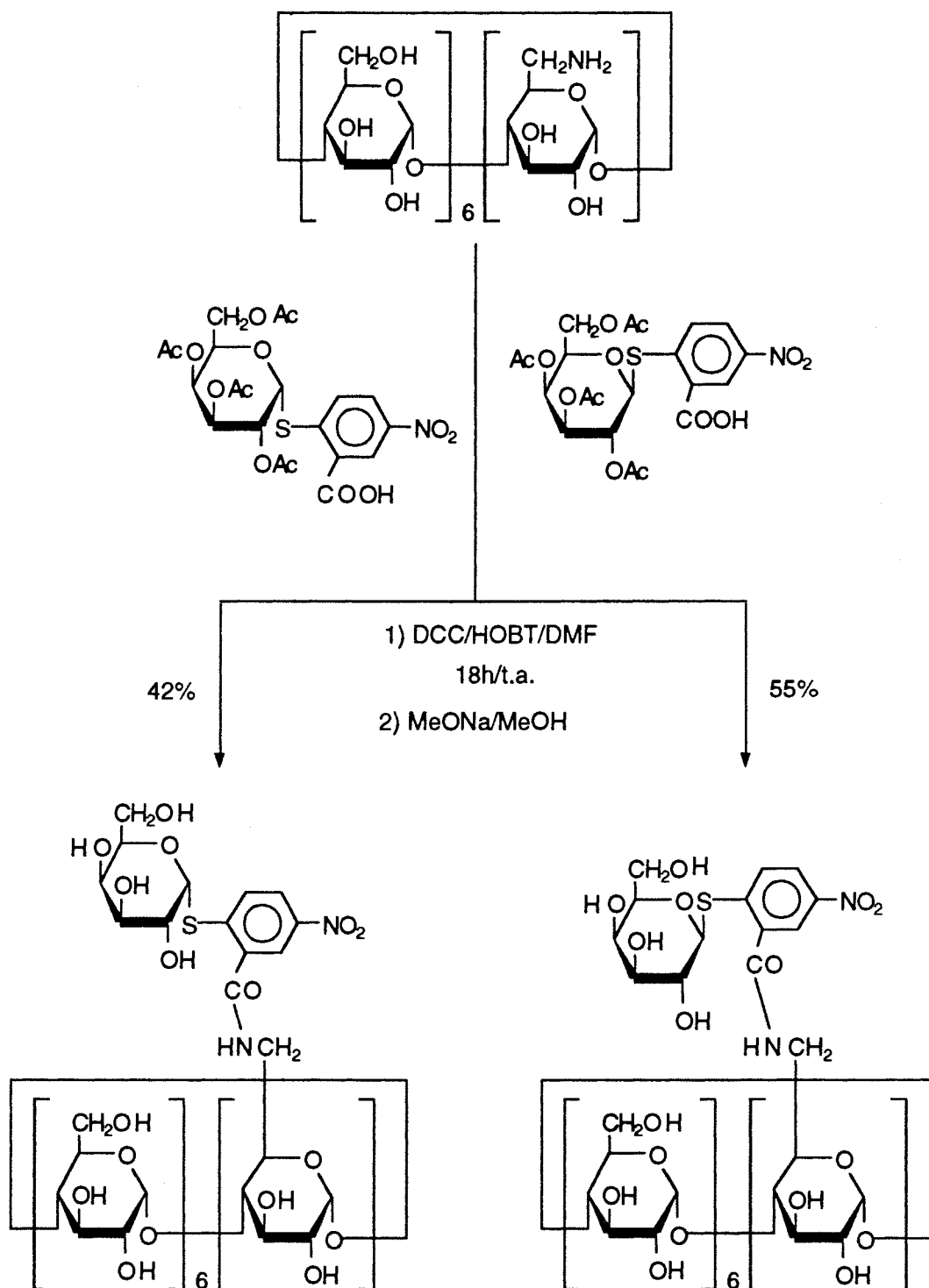


Figure 64 : Synthèse de galactosyl-β-CDs avec un bras hydrophobe aromatique [163].

PARROT-LOPEZ *et al.* [168, 169] ont préparé différents dérivés de CDs possédant un bras espaceur hydrophobe à neuf carbones entre la CD et le monosaccharide. Ce bras donne une flexibilité à la molécule et pourrait faciliter l'accès du résidu glycosyle aux récepteurs membranaires en réduisant les contraintes stériques que pourrait rencontrer la molécule au voisinage de la membrane cellulaire. De plus, la

liaison β -N-glycosidique réalise un mime structural présent dans de nombreux glycoconjugués naturels tels que : les glycoprotéines, les protéines plasmatiques etc ...

Ces dérivés sont synthétisés en deux étapes principales :

1- couplage d'un 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-(ou L-)-glycopyranosyl isothiocyanate avec le mono méthyl nonane dicarboxylate dans le toluène anhydre en présence de triéthylamine, à température ambiante pendant plusieurs jours puis déprotection du composé obtenu,

2- couplage du glycoside possédant un bras espaceur en C9 et une fonction acide libre avec la 6-mono-amino- β -CD dans le DMF, à température ambiante avec le dicyclohexyl carbodiimide (DCC) et le 1-hydroxy-benzotriazole (HOBT) (Figure 65).

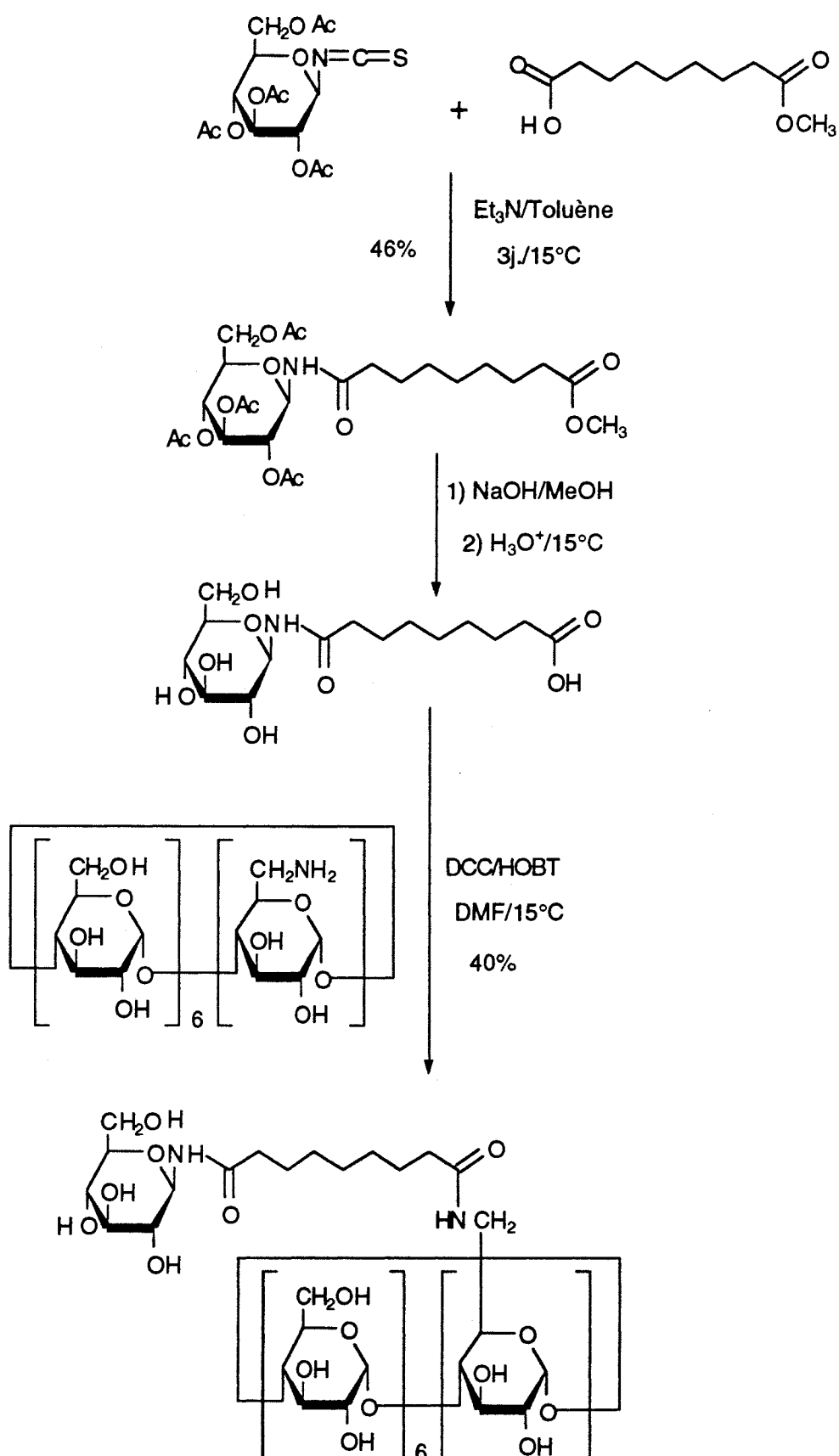


Figure 65 : Synthèse de N-glycosyl-β-CD [168].

L'unité glucose s'étant révélée inefficace dans les processus de reconnaissance biologique, les mêmes auteurs ont synthétisé, par la même méthode, plusieurs autres dérivés possédant différentes unités glycosyles (Figure 66) dont les propriétés physico-chimiques et biologiques ont été étudiées (voir paragraphe suivant).

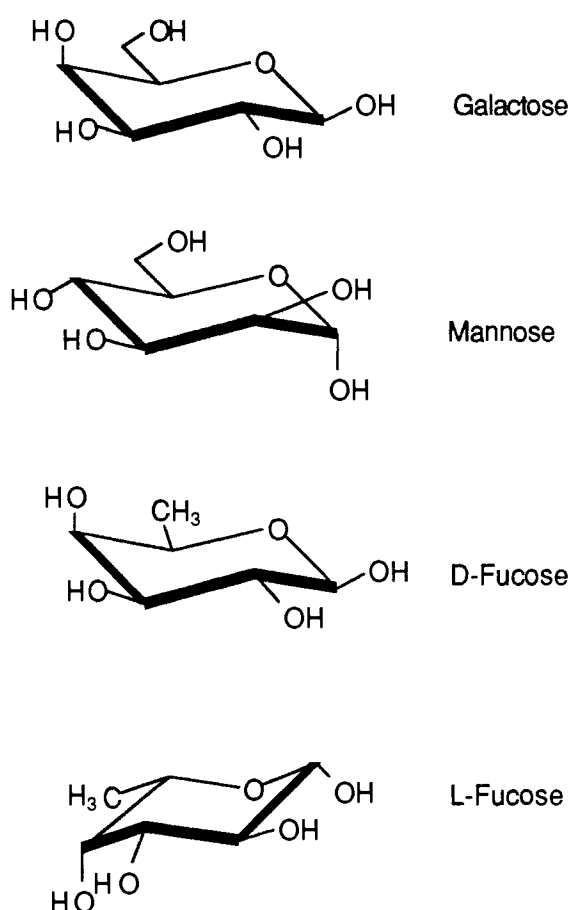


Figure 66 : Structure des monosaccharides utilisés dans la synthèse des N-glycosyl- β -CDs [169].

LERAY *et al.* [170] ont préparé, selon la même méthode, un dérivé possédant une unité N-acétyl glucosamine reliée à la CD par un bras espaceur en C6. Une unité galactose a ensuite été greffée sur le glucose par voie enzymatique (Figure 67). Il s'agit ici de la première synthèse chimio-enzymatique de CDs glycosylées. L'étape de couplage entre la CD et le monosaccharide portant le bras espaceur en C6 est identique à celle prédominamment décrite et fournit la mono-6-(2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranosylhexyl)amido-6-déoxy- β -CD avec un rendement de 28%. Cette molécule sert alors de substrat pour la réaction de couplage enzymatique qui se déroule avec l'UDP-galactose et la 4- β -galactosyltransférase en présence de chlorure de manganèse à

37°C pendant 36h. La mono-6-[Gal-β-1,4-glcNAc-β-(1,6')-hexyl]-amido-6-déoxy-β-CD est obtenue avec un rendement de 68%.

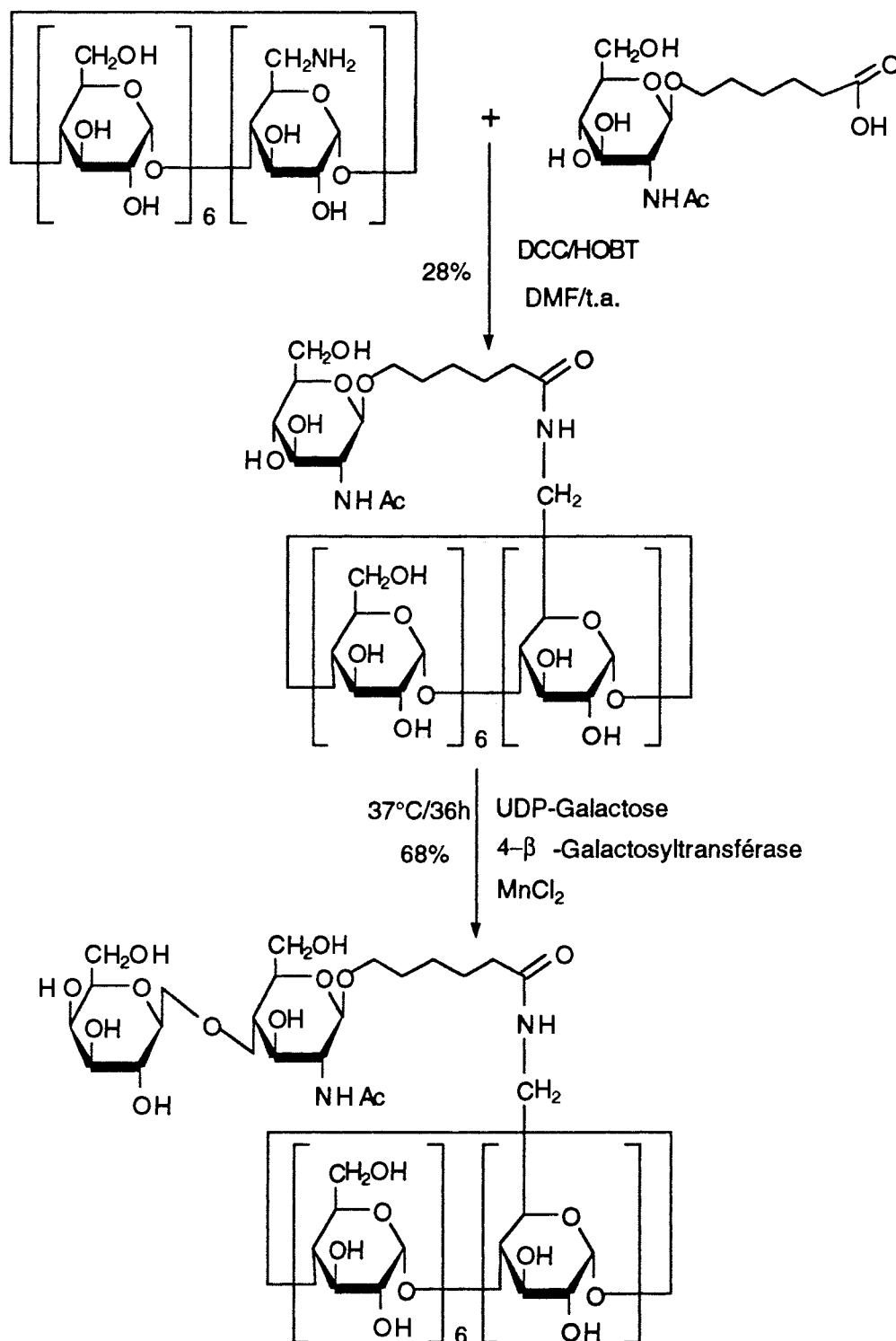


Figure 67 : Synthèse chimio-enzymatique de la mono-6-[Gal-β-1,4-glcNAc-β-(1,6')-hexyl]-amido-6-déoxy-β-CD [170].

Enfin, des CDs biantennées ont aussi été préparées [164] pour mimer les interactions naturelles entre les glycoconjugués et les récepteurs, en particulier l'effet dit de "cluster". Cette synthèse utilise un couplage peptidique (DCC, HOBT) dans le DMF. (Figure 68)

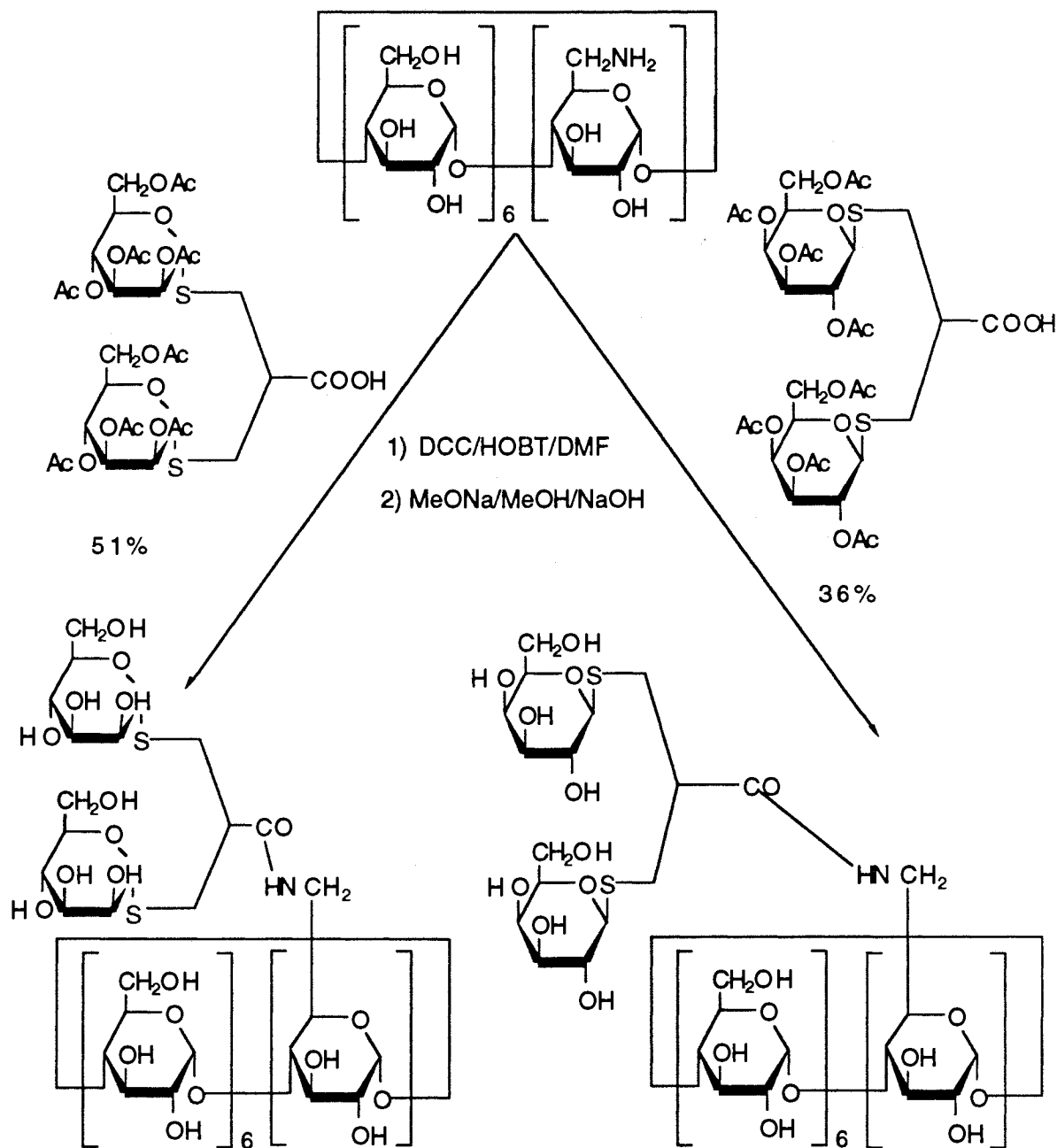


Figure 68 : Synthèse de CDs bi-antennées [164].

2- Propriétés physico-chimiques et biologiques.

α - Solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau de la plupart des dérivés glycosylés précédemment décrits ainsi que leurs capacités de complexation ont été largement étudiées (Tableau 19).

Tableau 19 : Solubilité dans l'eau des CDs glycosylées.

CD	Nombre de glucose	Solubilité (mg / ml)	Réf
<u>Mono-O-glycosyles-CDs</u>			
α -CD*	6	180	[171]
(α)G- α -CD	7	890	[171]
β -CD*	7	19	[171]
(α)G- β -CD	8	970	[171]
(α)2G- β -CD	9	1400	[171]
γ -CD*	8	260	[171]
(α)M- β -CD	9	> 500	[172]
(α)2M- β -CD	11	> 500	[172]
<u>Mono-S-glycosyles-CDs</u>			
(α)G- β -CD	8	430	[22]
(β)G- β -CD	8	30	[22]
(α)-M- β -CD	9	809	[166]
(β)M- β -CD	9	34	[166]
<u>Per-S-glycosyles-CDs</u>			
(α)G- β -CD	14	1725	[166]
(β)G- β -CD	14	84	[166]
<u>Mono-N-glycosyles-CDs</u>			
G-Sp- β -CD	9	200	[168]

G : Glucose M : Maltose Sp : Chaîne alkyle en C9

* La solubilité des CDs non glycosylées est donnée comme référence.

Les résultats obtenus montrent que toutes les mono-O-glycosyles-CDs sont plus solubles dans l'eau que la γ -CD (Tableau 19) d'un facteur 5 à 70 selon les dérivés. Il en est de même pour les mono-S-glycosyles-CDs et les per-S-glycosyles-CDs bien qu'il y ait une grande différence entre les anomères α et les anomères β des unités glycosyles, l'anomérisation α fournissant une solubilité dans l'eau très supérieure. Les mono-S-glycosyles-CDs sont globalement moins solubles que leurs homologues O-glycosylés certainement parce que le soufre forme moins facilement des liaisons hydrogène que l'oxygène.

En ce qui concerne les dérivés comportant un bras espaceur, leur solubilité dans l'eau est largement augmentée par rapport à la β -CD native mais malgré tout restreinte par le caractère hydrophobe du bras espaceur. Leur solubilité en milieu aqueux est intermédiaire entre celles des S- α - et des O- α -glycosyles-CDs.

b- Propriétés de complexation

Diverses études de complexation de molécules faiblement hydrosolubles ont été menées avec les glycosyles-CDs [171, 172]. De manière générale, les glycosyles-CDs augmentent la solubilité dans l'eau de molécules faiblement hydrosolubles de façon plus prononcée que leurs homologues natives. Ceci provient de leur solubilité intrinsèque plus grande qui empêche les complexes de précipiter même à forte concentration.

Des mesures RMN et cristallographiques ont montré que les dimensions de la cavité des CDs branchées étaient comparables à celles des CDs natives mais les capacités d'inclusion peuvent être diminuées quand le nombre d'unités glucose augmente du fait de contraintes stériques [173].

En ce qui concerne les S-glycosyles-CDs, les anomères β solubilisent beaucoup moins bien les molécules que les anomères α . Ceci peut être imputé à leur faible solubilité dans l'eau initiale. Les S-glycosyles-CDs persubstituées ont aussi des capacités de solubilisation moindre envers des molécules telle que la prédnisolone [166] par rapport à leurs analogues monosubstituées malgré leur solubilité intrinsèque supérieure. Ceci peut s'expliquer par le fait que la molécule complexée ne peut plus former de liaisons hydrogène avec les hydroxyles primaires de la CD ce qui déstabilise le complexe.

Enfin, les N-glycosyles- β -CDs, malgré la présence d'un bras espaceur hydrophobe, montrent une capacité de solubilisation intéressante. Par exemple, la 6A-déoxy-6A-[(9-(α -D-glucopyranosylamino)-1,9-dioxononyl amino]- β -CD solubilise mieux la nicardipine que la 2,6-diméthyl- β -CD [168].

Donc il est important de tenir compte de tous ces paramètres lors de l'élaboration future de nouveaux transporteurs.

c- Effets biologiques et capacités de reconnaissance

D'une manière générale, l'effet hémolytique des O-glycosyles-CDs est plus faible que celui des CDs natives car leur capacité à complexer le cholestérol de la membrane est plus faible et diminue avec le nombre d'unités glucose branchées [171, 172]. Le même phénomène est observé avec les S-galactosyles-CDs. L'apport d'une ou plusieurs unités galactose abaisse le pouvoir hémolytique de cinq à dix fois par rapport à la β -CD native [174].

Une étude récente [175], a évalué le caractère hémolytique de plusieurs dérivés de CDs, il décroît comme suit :

β -CD > amino- β -CD > hydroxypropyl- β -CD > azido- β -CD > β -Gal-NHCO-(CH₂)₇-CONH- β -CD

Comme dans les séries précédentes, le caractère hémolytique de ces CDs dépend de leur capacité à complexer et à extraire les lipides membranaires. Le dérivé possédant un bras espaceur n'a aucune activité hémolytique même à forte concentration ce qui en fait un candidat de choix pour une application pharmaceutique.

Des tests de cytotoxicité sur cellules eucaryotes HRT-18 tumorales ont aussi été effectués avec les N-glycosyles-CDs possédant un bras espaceur [176]. Il apparaît ici que la β -CD native n'affecte pas la viabilité cellulaire tandis que les N-glycosyles-CDs ont un effet inhibiteur sur l'activité déhydrogénase mitochondriale des cellules HRT donc ont un effet cytotoxique. La viabilité cellulaire est diminuée de 30 à 95% selon les dérivés, le plus cytotoxique étant celui possédant sept bras espaceurs avec un galactose terminal. Il est possible que ces dérivés, après leur association avec la lectine membranaire, activent certaines molécules qui induisent des réactions cellulaires.

L'application majeure des CDs glycosylées étant le transport et le ciblage de principes actifs vers une cible biologique, des tests de reconnaissance envers des lectines ont été effectués. Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine non immunes qui reconnaissent et fixent sélectivement des structures glycaniques spécifique sans en modifier la structure. Ce ne sont ni des anticorps ni des enzymes [177]. Les lectines membranaires ont été caractérisées dans de nombreux organismes vivants tels que : plantes (concanavaleine A), virus, bactéries et même mammifères. Il est probable qu'elles interviennent aussi dans les interactions virus-cellule cible ou bactérie-hôte.

Il a déjà été montré [178] que des polymères sur lesquels étaient greffés à la fois une galactosamine et la doxorubicine pouvaient être reconnus par une lectine spécifique. Les recherches en ce sens ont principalement été effectuées dans le cadre

des thérapies anti-cancéreuses. A l'inverse, des liposomes ont été greffés sur des lectines, lesquelles ont servi de molécules "missiles" pour cibler les liposomes [179].

Les tests de reconnaissance lectiniques des glycosyles-CDs font intervenir leur capacité à inhiber la floculation des levures qui possèdent ces lectines. La floculation est une agrégation non sexuelle et réversible des levures, caractérisée par des interactions protéines-sucres. Elle peut être dispersée par des sucres ou par des agents chélatants du calcium (EDTA). C'est un phénomène par lequel les cellules s'agrégent en formant des flocons qui sédimentent rapidement ou flottent dans le milieu de culture. Il est établi que certains sucres (glucose, mannose, maltose, saccharose) ont un effet inhibiteur sur le phénomène.

Les tests ont été réalisés sur la lectine Kb-CWL de la levure *Kluveromyces Bulgaricus*. Les capacités de reconnaissance des S- et N-glycosyles-CDs ont été évaluées par mesure de leur CMI (Concentration Molaire Inhibitrice) par rapport à des mono et des oligosaccharides de référence (Tableau 20).

D'après ces résultats, les anomères α des dérivés-S-glycosylés sont mieux reconnus que les anomères β indiquant que la configuration du carbone anomérique du résidu glycosyle terminal doit avoir un rôle important dans le mécanisme de reconnaissance. Les dérivés persubstitués sont également mieux reconnus que les dérivés monosubstitués, il existe donc un phénomène d'additivité. Enfin, l'introduction d'un bras espaceur hydrophobe (alkyle) entre l'ose terminal et la CD amène aussi à une meilleure reconnaissance. Par contre, l'introduction d'un bras espaceur nitro-phényle défavorise la reconnaissance probablement à cause d'une gêne stérique.

Nomenclature des composés 1 à 12 du tableau 20 :

- 1 : Heptakis(6-déoxy-S- β -D-galactopyranosyl)-6-thio- β -CD
- 2 : Heptakis(6-déoxy-S- α -D-galactopyranosyl)-6-thio- β -CD
- 3 : Heptakis(6-déoxy-S- α -D-galactopyranosyl-1',2'-dithioéthyl)-6-thio- β -CD
- 4 : 6-déoxy-S- β -D-galactopyranosyl-6-thio- β -CD
- 5 : N-(6-déoxy-cyclomaltoheptaosyl)-2-(β -D-galactopyranosylthiométhyl)-3-(β -D-galactopyranosylthio)-propionamide
- 6 : N-(6-déoxy-cyclomaltoheptaosyl)-6-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-galactopyranosylthio)-3-nitrobenzamide
- 7 : N-(6-déoxy-cyclomaltoheptaosyl)-6-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactopyranosylthio)-3-nitrobenzamide
- 8 : mono-6^A-déoxy-6^A[(9-(β -D-Galactopyranosylamino)-1,9-dioxononyl)amino]- β -CD

9 : Heptakis(6^A-déoxy-6^A-[(9-(β-D-Galactopyranosylamino)-1,9-dioxononyl)amino])-β-CD

10 : mono-6^A-déoxy-6^A[(9-(β-L-Fucopyranosylamino)-1,9-dioxononyl)amino]-β-CD

11 : mono-6-[glcNAc-β-(1,6')-hexyl]-amido-6-déoxy-β-CD

12 : mono-6-[Gal-β-1,4-glcNAc-β-(1,6')-hexyl]-amido-6-déoxy-β-CD

Tableau 20 : Inhibition de la floculation par les glycosyles-CDs.

Dérivés de référence	CMI* (Mm)	Réf
D-Fuc	3,5/ 3	[180]/[176]
D-Ara	pas d'inhibition	[180]
D-Glc	pas d'inhibition	[" "]
D-Gal	3,50 / 3,75	[176]/[170]
PNP-α-galactoside	0,40	[180]
PNP-β-galactoside	0,83	[" "]
Mélibiose	0,60	[" "]
Raffinose	1,20	[" "]
β-CD	pas d'inhibition	[" "]
α-CD	pas d'inhibition	[" "]
Dérivés β-CDs		
1	1,66	[180]
2	0,70	[" "]
3	0,41	[" "]
4	3,75	[" "]
5	2,00	[" "]
6	2,33	[163]
7	> 4,21	[163]
8	1,70 / 2,5	[180]/[176]
9	3,90	[176]
10	3,80	[176]
11	pas d'inhibition	[170]
12	1,75	[170]

*CMI : Concentration Molaire Inhibitrice

En conclusion, la capacité de ces composés à être reconnus par les lectines et leur atoxicité relative indiquent qu'ils pourraient constituer de bons candidats pour le ciblage pharmacologique d'agents actifs. C'est la nature et le nombre des résidus glycosyles fixés à la CD qui déterminent l'affinité du transporteur pour la lectine. L'étape suivante serait bien évidemment de tester ces molécules *in situ* sur culture cellulaire puis *in vivo* sur modèles animaux afin de vérifier l'impact sur l'efficacité d'un actif transporté vis-à-vis d'une affection particulière localisée.

Les CDs : sondes fluorescentes

La reconnaissance moléculaire en milieu aqueux peut être effectuée par des CDs chimiquement modifiées avec des fluorophores. Ces CDs deviennent alors spectroscopiquement actives et peuvent servir de sondes car leur complexation avec une molécule "invitée" se traduira par un signal mesurable. En effet, lorsqu'une molécule "invitée" sera complexée dans la cavité, le fluorophore qui se trouvait dans la cavité hydrophobe sera poussé en dehors et se trouvera alors dans un environnement aqueux (Figure 69) ce qui se traduira par des modifications de son spectre de fluorescence (intensité, déplacement des longueurs d'onde d'émission).

Certaines molécules fluorescentes telle que l'ANS voient aussi leur intensité d'émission de fluorescence modifiée par addition de CD ce qui traduit, en général, la formation d'un complexe entre les deux entités. CRAMER *et al.* ont été les premiers à remarquer ce phénomène [181].

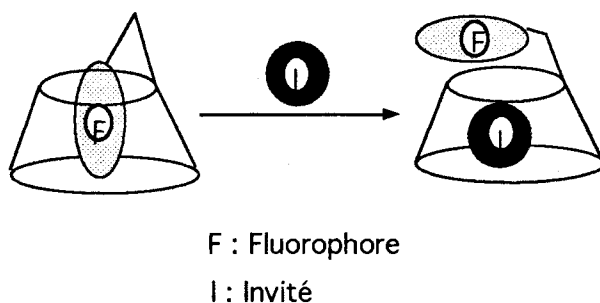


Figure 69 : Principe d'une sonde fluorescente à base de CD.

La littérature concernant la reconnaissance moléculaire par les CDs est particulièrement abondante. Volontairement, nous limiterons notre revue aux études les

plus récentes comprenant des CDs greffées par une ou plusieurs unités d'un même traceur fluorescent : le pyrène. Nous terminerons sur l'intérêt que peut avoir une CD doublement greffée par un fluorophore et par une molécule protéique ou assimilée dans l'étude de ses capacités de reconnaissance moléculaire.

I- Les complexes CD-pyrène : Intérêts et caractéristiques du pyrène (Figure 70).

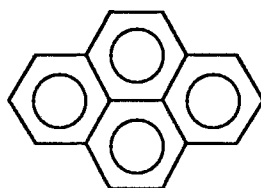


Figure 70 : Structure de la molécule de pyrène.

Le pyrène est un bon marqueur fluorescent de par :

- son rendement de fluorescence élevé,
- son temps de vie de fluorescence, τ , très sensible au micro-environnement,
- sa capacité à former des excimères en solution concentrée tandis qu'en solution aqueuse diluée seule la fluorescence du monomère est observée,
- son hydrophobie qui lui permet de traverser la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Il est d'ailleurs très utilisé en biologie comme sonde optique.

Des études de complexation avec les CDs [181] ont montré que :

- la cavité de l' α -CD était trop petite pour inclure le pyrène,
- la β -CD pouvait former un complexe 1:1 avec le pyrène (forte augmentation de l'intensité de fluorescence du monomère),
- à faible concentration, la γ -CD augmentait l'intensité de fluorescence du monomère ce qui traduit comme pour la β -CD la formation d'un complexe 1:1. Par contre, à plus forte concentration, la fluorescence de l'excimère apparaît aux dépens de celle du monomère ce qui traduit la formation de complexes de stoechiométries plus élevées (1:2, 2:2, Figure 71) à partir du complexe 1:1. En effet, deux unités pyrène peuvent se trouver alors face à face et former un excimère quand une unité pyrène est excitée. L'excimère est un état excité particulier formé entre l'état excité singulet et l'état fondamental des fluorophores qui se traduit par une forte fluorescence du composé aux grandes longueurs d'onde (475 nm pour le pyrène).

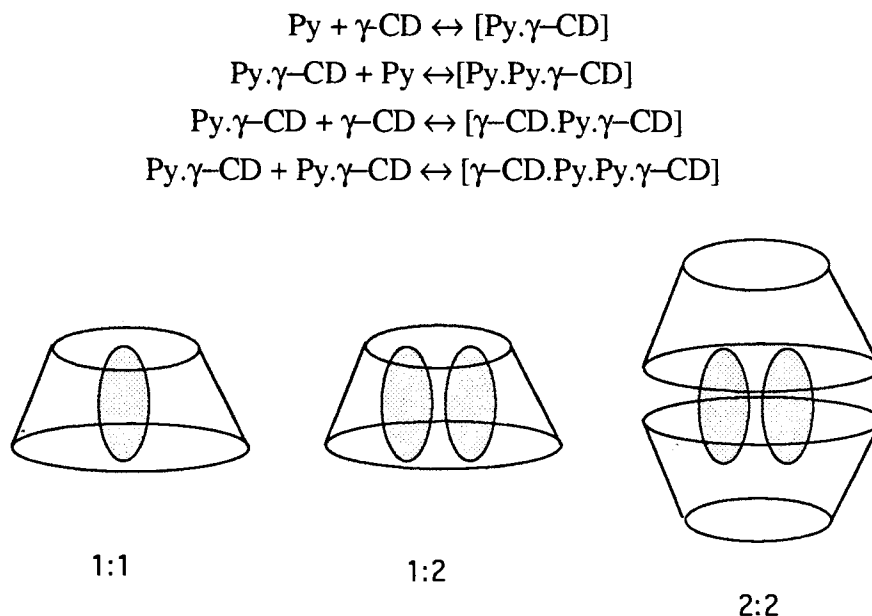


Figure 71 : Différentes stoechiométries du complexe γ -CD-pyrène [181, 182].

NELSON et WARNER [183] ont étudié la formation de complexes entre le pyrène, la γ -CD, la β -CD, la 2,6-di-O-méthyl- β -CD ou la 2,3,6-tri-O-méthyl- β -CD et différents tensio-actifs non ioniques en se basant sur la mesure du temps de vie de fluorescence du pyrène.

Il apparaît que le temps de vie de fluorescence du pyrène augmente en présence de CDs. Cette augmentation est attribuée à la formation d'un complexe entre les deux entités, le pyrène se trouvant dans un environnement hydrophobe. Lors de l'addition de tensio-actifs, le temps de vie de fluorescence du pyrène est augmenté en présence de γ -CD ce qui peut traduire la formation d'un complexe ternaire, par contre avec les dérivés de β -CDs, les résultats sont hétérogènes. Lors de l'addition de tensio-actifs au système β -CD-pyrène, il y a une diminution du temps de vie de fluorescence, tandis qu'avec les β -CDs méthylées, les résultats sont identiques à ceux observés avec la γ -CD. Le calcul des constantes de complexation des CDs avec ces tensio-actifs a montré que tous pouvaient se complexer, bien que la molécule ne soit pas toujours incluse complètement dans la cavité. Les variations des temps de vie de fluorescence du pyrène au sein du complexe CD-pyrène sont dues à la formation d'un complexe ternaire avec les tensio-actifs. Le même phénomène est observé avec des alcools tel que le *t*-butanol. Ces molécules peuvent être co-incluses dans la cavité de la γ -CD ou former des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles de la CD (Figure 72).

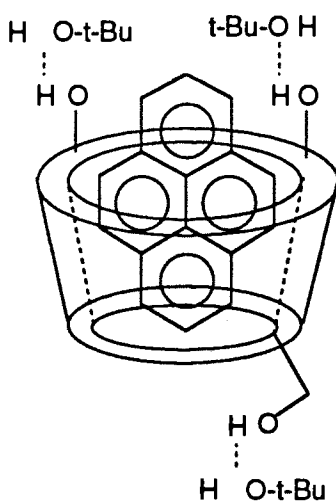


Figure 72 : Structure possible d'un complexe ternaire [181].

II- Les CDs chimiquement modifiées par un ou plusieurs groupes pyrène.

La plupart de ces composés ont été préparés et étudiés par UENO *et al.*, ce sont, en général, des γ -CDs [182].

1- Les CDs substituées par une seule unité pyrène.

En 1989, ces auteurs préparent différents dérivés de γ -CD modifiés par un groupe pyrène butyrique (Figure 73)[184].

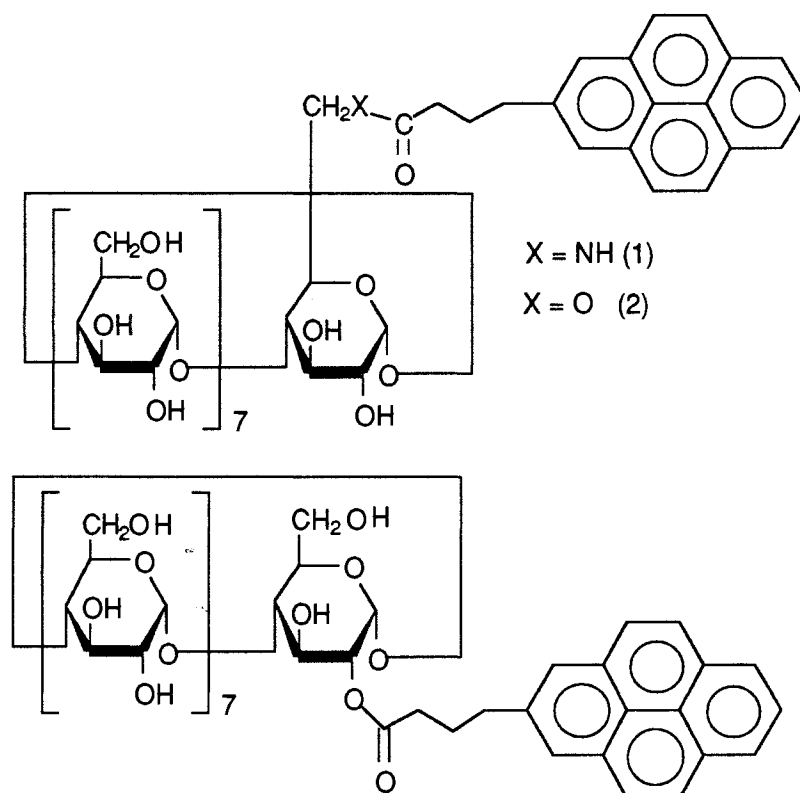


Figure 73 : Structures des pyrènes butyryl- γ -CDs [184].

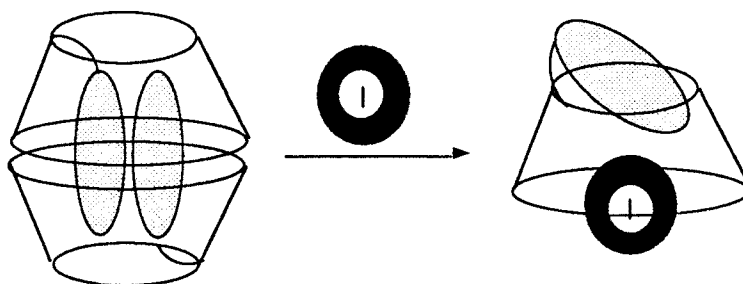


Figure 74 : Dissociation du complexe 2:2 par addition d'une molécule "invitée" [182].

Le mécanisme de formation d'excimère a été étudié pour déterminer les propriétés de complexation de ces composés. Il apparaît que les complexes 2:2 (obtenus par dimérisation des complexes 1:1 en solution concentrée) entre la γ -CD et le pyrène ont la même structure que celui-ci soit lié par liaison covalente ou non à la γ -CD. Les valeurs des constantes sont respectivement de 174000 M^{-1} pour le composé 1 et de 15300 M^{-1} pour le composé 2. L'addition au système d'une autre molécule telle que le 1-bornéol entrant en compétition pour la complexation avec la CD, induit des changements dans les spectres d'émission de fluorescence de ces composés. Les proportions relatives des intensités de fluorescence de l'excimère par rapport au

monomère sont modifiées. L'intensité de fluorescence de l'excimère diminue tandis que celle du monomère augmente lorsque des concentrations croissantes de 1-bornéol sont ajoutées. Ceci traduit la dissociation du complexe 2:2 au profit de la formation d'un complexe "hôte-invité" 1:1 (Figure 74). Le rapport $\Delta I/I^0$ (ΔI = différence entre l'intensité de fluorescence de l'excimère en présence de la molécule "invitée" (I) et l'intensité de fluorescence de l'excimère provenant du complexe 2:2 (I^0)) est utilisé comme un paramètre de sensibilité de la reconnaissance moléculaire de différentes séries de composés (monoterpènes, stéroïdes, alcaloïdes) par ces CDs modifiées [182].

Enfin, la nature et la position de la liaison entre le pyrène et la CD est importante car les constantes de complexation en dépendent et diffèrent selon que c'est une liaison amide ou ester, localisée en position 2,3 ou 6. Une étude réalisée sur ce point particulier [185] analyse les capacités de complexation de la γ -CD greffée par un groupe pyrène en fonction de la position de la substitution (Figure 75).

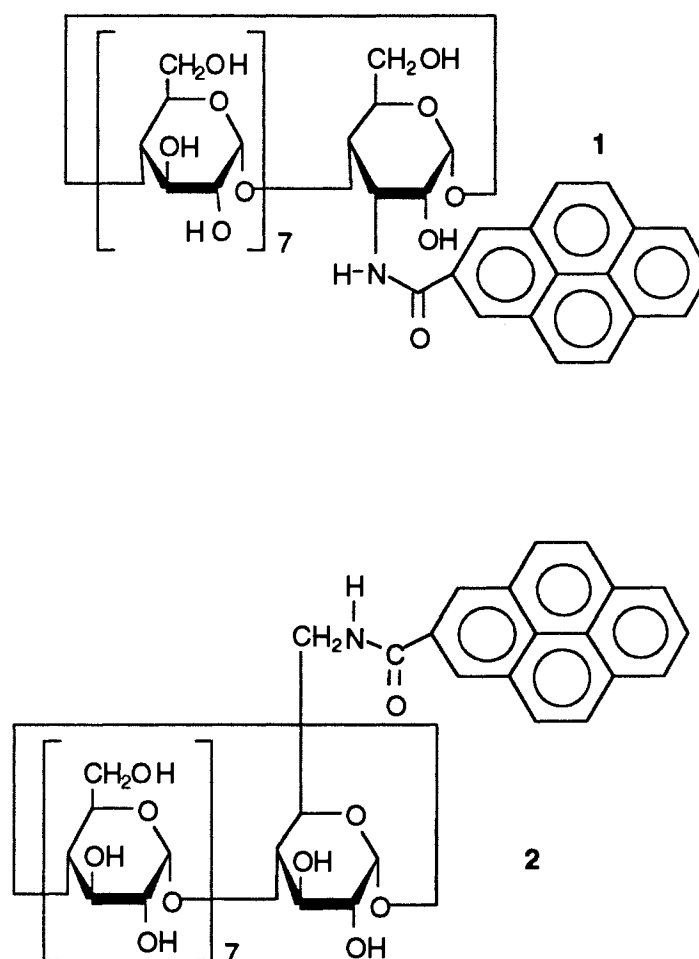


Figure 75 : Structure des CDs étudiées [185].

L'augmentation de l'intensité de l'émission de fluorescence lors de l'addition d'une autre molécule au système a permis de calculer les constantes de complexation sur la base de la formation d'un complexe 1:1 entre la CD et la molécule "invitée". Les mesures sont réalisées dans l'eau et en solution suffisamment diluée pour pouvoir s'affranchir de la fluorescence de l'excimère. Les augmentations d'intensité de fluorescence observées sont donc uniquement celles dues aux changements associés au monomère. Les constantes de complexation sont plus élevées d'un facteur trois pour **1** (γ -CD substituée en position 3) ce qui indique que le pyrène a plus d'influence sur le phénomène de complexation quand il est lié sur la face secondaire de la CD c'est-à-dire la plus hydrophile. Il peut agir soit comme un espaceur soit comme un "chapeau" orienté vers la cavité de la CD.

Les composés **1** et **2** ont des constantes de complexation plus grandes pour les dérivés bicycliques (*e.g.* bornéol) que pour les dérivés monocycliques ce qui indique que la structure de la molécule "invitée" joue aussi un rôle important dans la complexation. La CD substituée en position 3 a, de plus, la propriété de faire la différence entre les deux isomères optiques de la fenchone et du menthol (Figure 76). Leurs constantes de complexation respectives sont très différentes comme le montre le tableau 21. Cette CD possède donc une capacité de reconnaissance moléculaire très fine puisqu'elle se comporte comme un sélecteur chiral envers les mélanges racémiques.

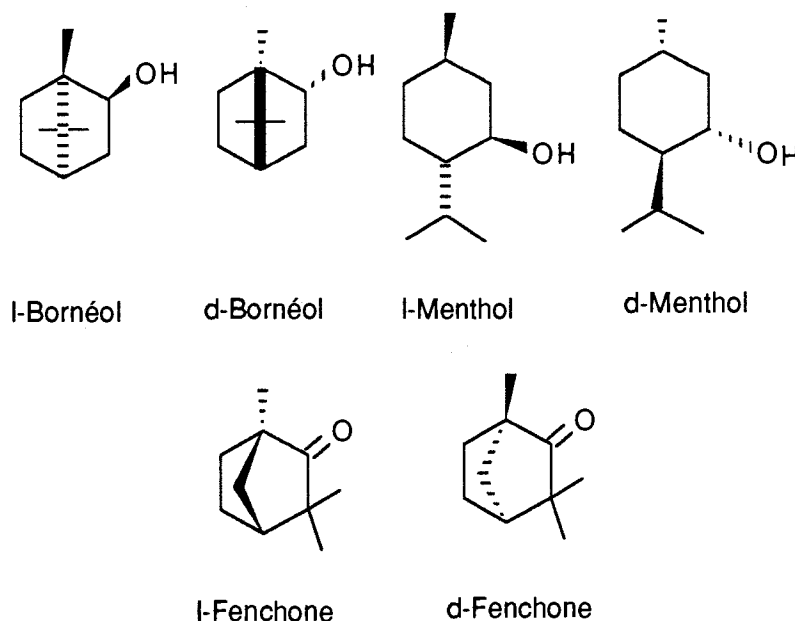


Figure 76 : Structure des énantiomères complexés par **1** et **2**.

Tableau 21 : Constantes de complexation pour trois paires d'énantiomères [185].

Molécule complexée	1	2
	K (M ⁻¹)	K (M ⁻¹)
d-Bornéol	278000	1750
l-Bornéol	255000	1800
d-Fenchone	120000	1600
l-Fenchone	27000	850
d-Menthol	9000	430
l-Menthol	21000	540

2- Les CDs substituées par deux unités pyrène

UENO *et al.* ont aussi préparé quatre isomères de position de γ -CDs disubstituées par le pyrène (AB, AC, AD, AE) [182, 186] (Figure 77).

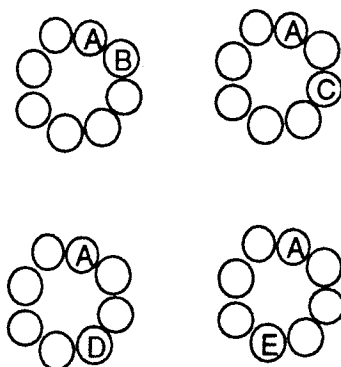


Figure 77 : Positions de substitution par le pyrène.

Tous ces isomères montrent majoritairement une émission de fluorescence de l'excimère vers 520 nm. L'addition de molécules pouvant se complexer à ces composés induit soit une augmentation soit une diminution de l'intensité de fluorescence de l'excimère sauf pour l'isomère AB dont les variations de fluorescence sont faibles. Par exemple, l'addition de l-bornéol augmente de manière importante l'intensité de fluorescence de l'excimère tandis que l'addition d'acide lithocholique entraîne une diminution de cette intensité et une augmentation de l'intensité de fluorescence du monomère. Ceci tend à montrer que les molécules ne se complexent pas de la même

façon en fonction de leur structure. Dans le cas du bornéol, il est possible que cette molécule entre peu dans la cavité ce qui permettrait aux deux groupes pyrène d'être aussi partiellement inclus d'où une augmentation de la fluorescence de l'excimère. Dans le cas de l'acide lithocholique, celui-ci entre complètement dans la cavité de la CD et en exclut les deux pyrènes d'où une diminution de l'intensité de fluorescence de l'excimère et une augmentation de celle du monomère, les pyrènes forment alors une enveloppe hydrophobe pour l'acide lithocholique ce qui est confirmé par les constantes de complexation des deux composés avec l'isomère AC de la γ -CD disubstituée : 19000 M^{-1} (l-bornéol), 3700000 M^{-1} (acide lithocholique) (Figure 78).

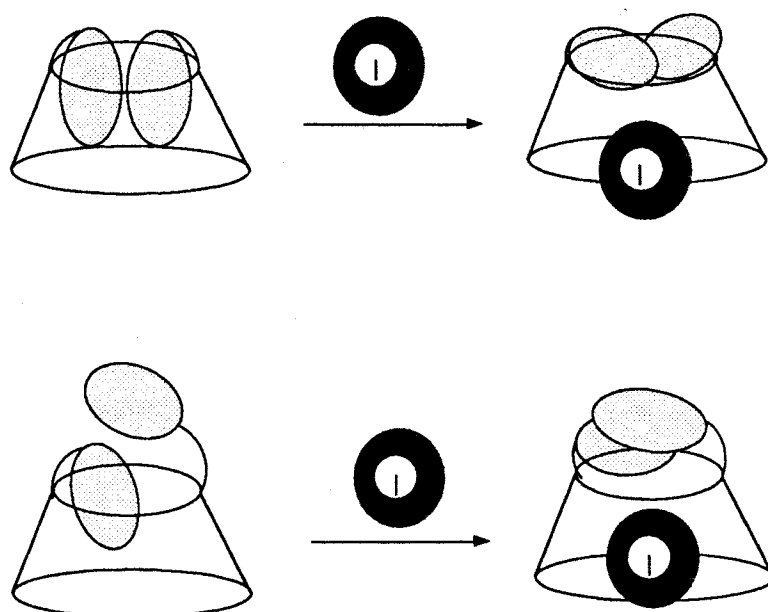


Figure 78 : Formes de complexes possibles par les CDs disubstituées [182].

Les CDs substituées par un ou des pyrène(s) se révèlent ainsi être de bonnes sondes, capables d'une grande précision pour décrire le mode de reconnaissance moléculaire. Différents facteurs interviennent dans leur capacité de complexation et de reconnaissance moléculaire parmi lesquels la structure, la taille, la polarité et la chiralité des molécules "invitées".

III- Autres sondes fluorescentes.

UENO *et al.* sont à l'origine de la réalisation de nombreuses autres sondes fluorescentes à base de CDs. Un travail important à propos de la reconnaissance moléculaire effectuée par des CDs modifiées par un groupe dansyl a été publié ces dernières années [187, 188, 189]. Nous nous intéresserons à deux exemples de reconnaissance moléculaire utilisant ce type de substituant.

Le premier concerne un dimère de β -CD [190] dont la structure est présentée dans la figure 79.

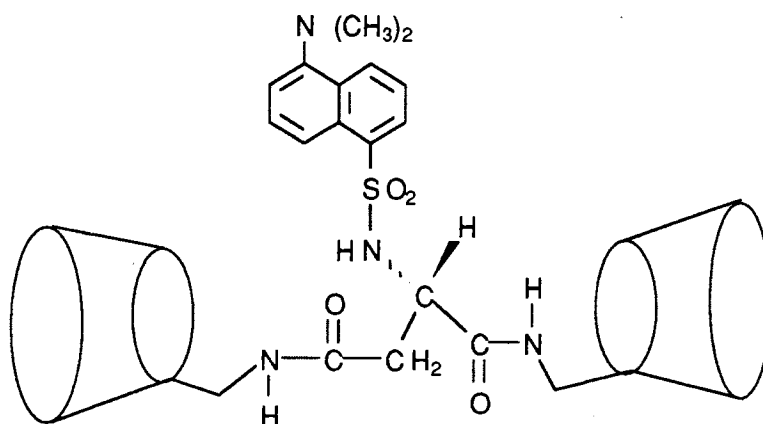
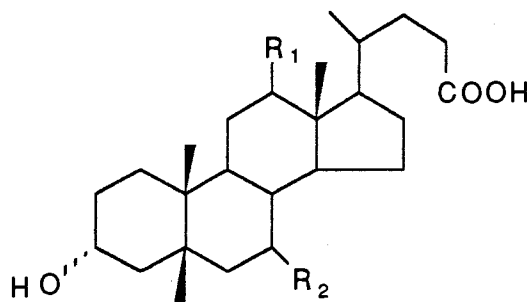


Figure 79 : Structure du dimère [190].

Ce dimère est obtenu par couplage peptidique entre l'acide dansyl-L-aspartique et la mono-6-amino- β -CD. C'est une sonde avec deux sites de complexation qui montre une capacité de reconnaissance importante envers les stéroïdes. Ces résultats ont été obtenus par des mesures de l'intensité d'émission de fluorescence dans l'eau qui ont permis le calcul du rapport $\Delta I/I^0$ (ΔI = différence entre l'intensité de fluorescence en présence de la molécule "invitée" (I) et l'intensité de fluorescence du dimère seul (I^0)). Ce rapport est utilisé comme un paramètre de sensibilité pour la reconnaissance moléculaire. Une diminution de l'intensité de fluorescence est observée lorsque différents stéroïdes sont ajoutés à la solution aqueuse de dimère ce qui laisse penser que le résidu dansyl qui était inclus dans une des cavités du dimère en est exclu par le stéroïde et se retrouve alors dans un environnement aqueux d'où une diminution de son intensité de fluorescence. Les complexes formés entre le dimère et les stéroïdes sont de stoechiométrie 1:1 ce qui suggère une coopérativité des deux cavités des CDs lors de la complexation. De plus, les variations de fluorescence et les constantes de complexation qui en découlent indiquent que ce dimère est capable d'établir une discrimination entre

trois isomères géométriques qui ne diffèrent que par l'orientation et la position d'un seul hydroxyle (Tableau 22).

Tableau 22 : Structures et constantes de complexation des stéroïdes étudiés.



	AUDC	ACDC	ADC
R ₁	—H	—H	'''OH
R ₂	▴OH	'''OH	—H
K (M ⁻¹)	6900	1300	NP

AUDC : acide ursodéoxycholique ACDC : acide chénodéoxycholique
 ACD : acide déoxycholique NP : Non Précisé

Signalons à ce sujet, une revue récente dans laquelle sont étudiés les facteurs impliqués dans la reconnaissance moléculaire par les dimères de CDs [191].

De la même façon, UENO *et al.* [192] ont montré que les capacités de complexation de la β -CD substituée par un résidu dansyl étaient augmentées si un résidu monensine y était ajouté (Figure 80).

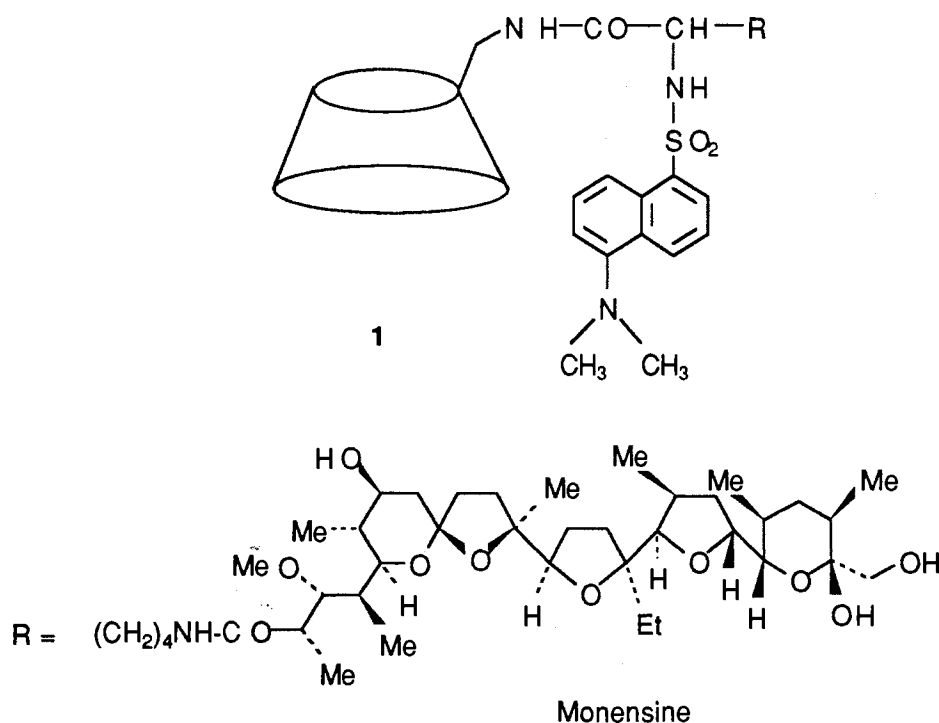


Figure 80 : Structure de la β -CD modifiée par un résidu monensine [192].

Dans ce cas, la monensine intervient comme un facteur environnemental qui augmente l'hydrophobie du système, elle n'est pas incluse dans la cavité (Figure 80). De plus, elle est capable de complexer des ions tels que le sodium ce qui induit sa cyclisation et augmente l'hydrophobie au voisinage de la cavité de la CD et se traduit, au niveau de cette dernière, par une augmentation de la stabilité des complexes qu'elle peut former comme le montrent les constantes de complexation (Tableau 23).

Tableau 23 : Constantes de complexation de **1** avec et sans ion sodium.

Molécule complexée	1 (K M ⁻¹)	1 + Na ⁺ (K M ⁻¹)
Nérol	5370	10300
Géraniol	6320	11900
Cyclohexanol	2250	15800
Adamantan-1-ol	38200	43000

Introduction

Les enzymes sont des protéines qui catalysent un grand nombre de réactions en milieu aqueux. La rapidité des réactions qu'elles catalysent, leur structure et leur mécanisme d'action ont très vite intéressé les chimistes qui ont tenté de les copier en préparant des modèles synthétiques. Les enzymes possèdent un site catalytique auquel se lie le substrat pour y être transformé en différents produits de réaction. Les molécules chimiquement synthétisées comme "enzyme artificielle" ou modèle d'enzyme comportent toutes un site catalytique adjoint à une partie hydrophobe. La chimie supramoléculaire est ici tout à fait appropriée pour réunir cet environnement. Un exemple est donné par la figure 81 :

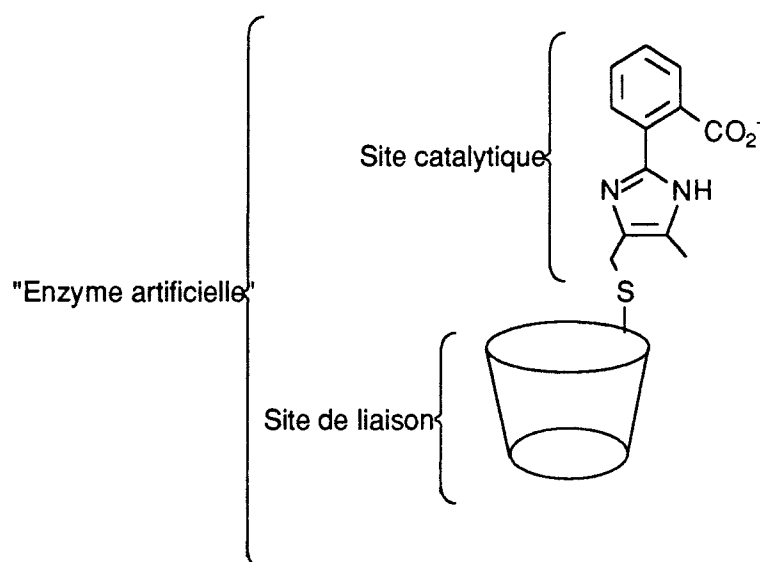


Figure 81 : Modèle d'enzyme artificielle (chymotrypsine) [193].

L'étude exhaustive de toutes les enzymes artificielles synthétisées à ce jour se situant hors des limites de ce travail, nous citerons simplement, à titre d'exemple quelques revues générales récentes sur le sujet. Les revues de D.S. LAWRENCE [194] et de A.M. REICHWEIN [195] qui concernent les systèmes supramoléculaires et les modèles d'enzymes et les articles de R. BRESLOW [196, 197, 198] qui concernent principalement les CDs en tant qu' "enzymes artificielles".

Certaines enzymes ont aussi un mécanisme allostérique c'est-à-dire que la fixation de la première molécule de substrat au site catalytique facilite celle des suivantes. Il existe dans ce cas un effet "coopératif". Ce phénomène aussi a intéressé les chimistes qui ont cherché à préparer des composés capables de le mimer. Nous citerons ici un exemple où un tel effet a été reproduit avec un composé synthétique :

- SCHNEIDER et RUF [199] ont préparé un dérivé aromatique cationique avec de longues chaînes alkyles (Figure 82).

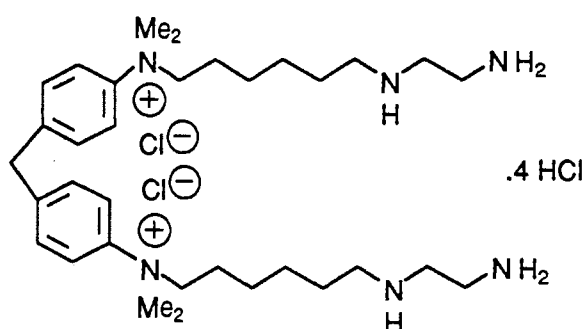


Figure 82 : Structure du dérivé aromatique.

Dans ce système, la complexation d'un ion métallique au niveau des chaînes éthylène diamine entraîne la "fermeture" de la molécule et la création d'une poche hydrophobe (les chaînes alkyles) dans laquelle peut venir se complexer une molécule hydrophobe (Figure 83).

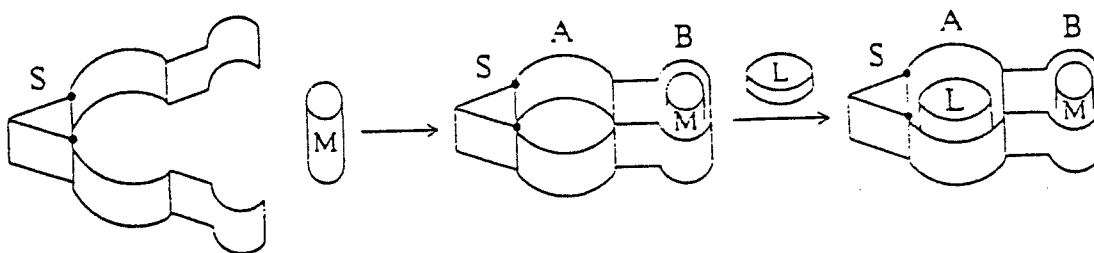


Figure 83 : Représentation schématique d'un système allostérique artificiel [199].

Après une brève présentation des enzymes artificielles à base de CDs, cette dernière section de notre revue bibliographique sera plus particulièrement consacrée aux nucléases artificielles.

I- CDs comme modèle d'enzyme autre que nucléase.

Le tableau 24 présente brièvement quelques CDs, modèles d'enzymes.

Tableau 24 : Quelques CDs modifiées et leur activité enzymatique potentielle.

CD modifiée	Activité enzymatique	Réf
Heptakis(2,3-di-O-méthyl-6-amino-6-déoxy)- β -CD	Oxaloacétate décarboxylase	[200]
Ethylène diamino- β -CDs	Transacylase	[42]
Hydroxylamino- β -CDs, β -CD oximes	Transacylase	[56]
Conjugué β -CD-Cyclen (M^{2+})	Transacylase	[201]
Mono(6-(2-éthylamino)6-déoxy)- β -CD	Glyoxalase	[63]
Pyridoxamino- β -CDs	Transaminase	[36,112]
Phényl imidazolyl- β -CD	estérase, peptidase (chymotrypsine)	[193]
imidazolyl- β -CD	estérase (chymotrypsine)	[202]
Histidylamino-imidazolyl- β -CD (dimère)	estérase (chymotrypsine)	[78]
6-(Ser-his-Asp-NHCH ₂ CH ₂ S)- β -CD	estérase, amidosynthétase (chymotrypsine)	[19]
Histamino- α - et β -CD	estérase (chymotrypsine)	[203]
Mono-2-O-(2-aminoéthyl)- β -CD	Sérine protéase (chymotrypsine)	[117]
Poly(éthylènimine)- β -CD	Metallo-estérase	[204]
Mono et di-imidazolyl- β -CD	Formation d'aldol à partir de céto-aldéhyde	[205]
Flavo-CD	oxydo-réductase	[206]
Nicotinamido- β -CD	oxydo-réductase	[207]
CD-S-porphyrine-Fe(II)-S-CD	oxydase	[198]

En ce qui concerne les modèles de chymotrypsine, leur activité et leur mécanisme d'action ont souvent été controversés [208, 209]. En 1994, PALMER *et al.* [210] ont étudié le mécanisme d'hydrolyse de différents trifluoroacétanilides catalysée par l' α - et la β -CD. Ils concluent que les CDs ne constituent pas un bon modèle de chymotrypsine. En effet, avec les trifluoroacétanilides, une catalyse ou une inhibition de l'hydrolyse est observée et le mécanisme par lequel la liaison C-N est hydrolysée ne fait pas intervenir une catalyse acide comme dans l'enzyme naturelle.

II- Les nucléases artificielles

1- Définition

Les nucléases sont des enzymes qui coupent les liaisons phosphodiester des acides nucléiques. Certaines sont spécifiques de l'ADN (DNAses), d'autres de l'ARN (RNAses). Il existe des endonucléases qui coupent les liaisons phosphodiester à l'intérieur des chaînes oligonucléotidiques et des exonucléases qui coupent les liaisons phosphodiester en partant de l'une des extrémités de la chaîne.

2- Quelques exemples récents de nucléases artificielles

Les macrocycles polyamines

Ces macrocycles, dans leur état protonés, lient fortement les nucléotides *via* des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes établies entre les groupes ammonium du récepteur et les groupes phosphates du nucléotide. Il se forme un complexe 1:1 entre les deux entités quand le pH se situe entre trois et sept. HOSSEINI [211] a largement étudié ces polyamines et leur capacité d'hydrolyse et de synthèse des liaisons phosphodiester. Elles miment les ATPases, le mécanisme catalytique présente quatre étapes (Figure 84) :

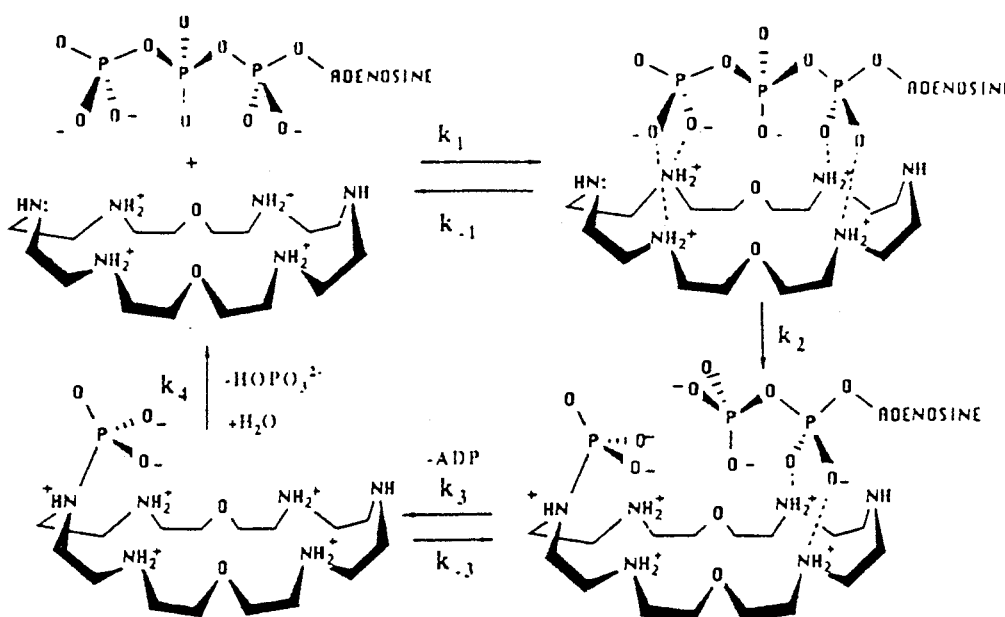


Figure 84 : Hydrolyse de l'ATP par les macrocycles polyamines.

Au cours de l'hydrolyse par les polyamines, il se forme un intermédiaire phosphoramidate covalent qui peut être considéré comme un agent phosphorylant. C'est ainsi qu'à partir de l'ADP et en présence d'ions tels que Mg^{2+} ou Ca^{2+} , qui agissent comme des promoteurs, les polyamines catalysent la synthèse d'ATP en solution aqueuse, à pH 7 et à 40°C c'est-à-dire dans des conditions très proches de celles du milieu biologique (Figure 85).

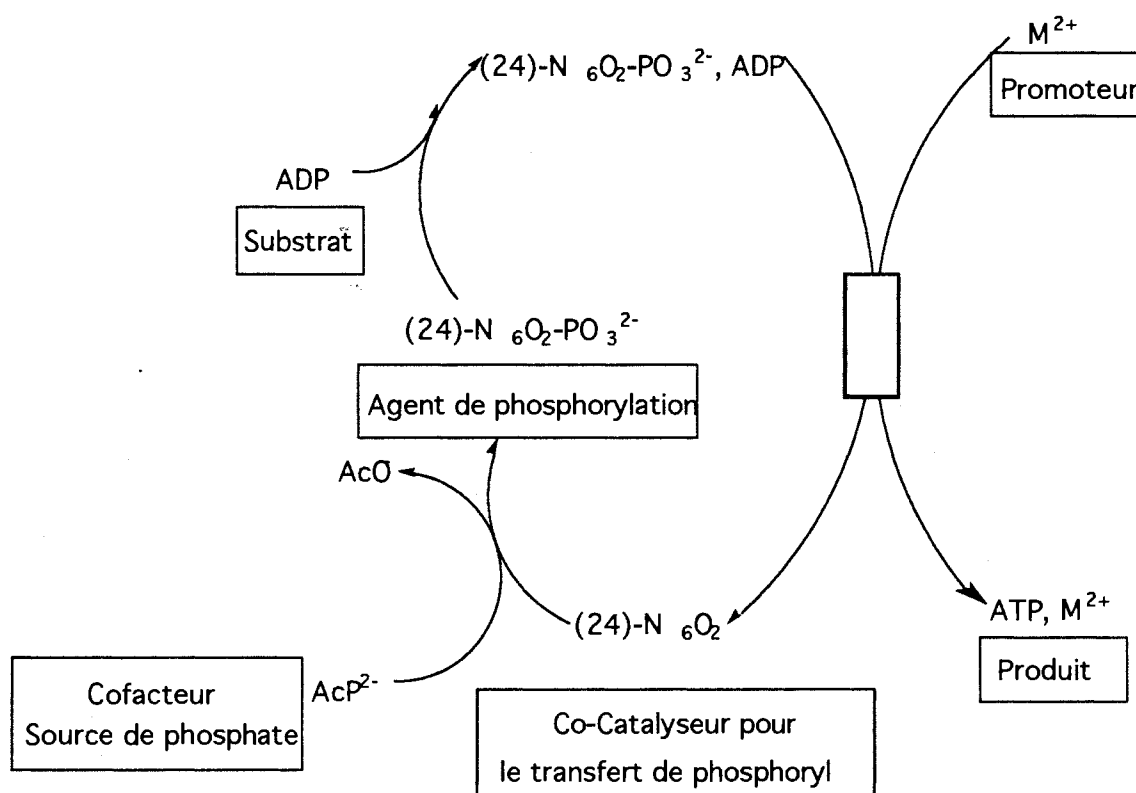


Figure 85 : Cycle catalytique de la synthèse de l'ATP.

Les complexes de plomb, zinc et lanthanides d'autres polyamines telles que l'EDTA ont été utilisés comme ribonucléase artificielle [212]. Dans ce cas, la nature de la polyamine influence énormément le clivage de l'ARN par les ions métalliques. Plusieurs facteurs interviennent tels que la taille du macrocycle et sa charge.

Les complexes de lanthanides

Les ions lanthanides se montrent particulièrement efficaces dans le clivage de l'ARN [212] ce qui a conduit d'autres auteurs à les utiliser dans des complexes étudiés pour leur activité ribonucléasique [213]. La N,N,N',N' -tétrakis((2-pyridyl)-

méthyl)éthylènediamine (TPEN) a été synthétisée (Figure 86) et ses complexes de lanthanides préparés.

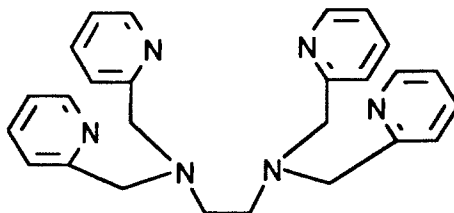


Figure 86 : Structure de la TPEN [213].

Les complexes de lanthanides de cette molécule sont très stables en solution aqueuse et capables d'hydrolyser un dimère de ribonucléotide (ApA) selon une cinétique de pseudo-premier ordre (pH 7,2, 35°C) avec une activité supérieure à celle de l'ion seul. Ce type de composé a donc un intérêt évident dans le "design" de nucléases artificielles.

Il a été montré que l'action des lanthanides dans le clivage des liaisons phosphodiester pouvait être potentialisée par la présence d'ions métalliques [214] ou de peroxyde d'hydrogène [215].

Les complexes de cuivre (II)

Différents composés ont été préparés et leurs complexes de cuivre (II) utilisés comme DNase ou RNase artificielles, parmi ceux-ci :

- Les complexes de cuivre (II) d'acides hydroxamiques [216] (DNase) (Figure 87).

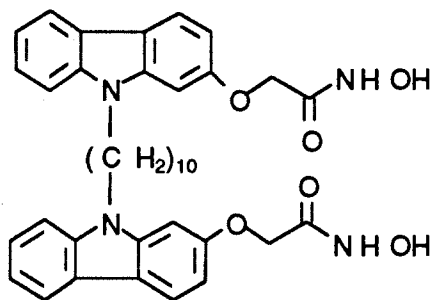


Figure 87 : Structure d'un acide bishydroxamique.

- Les complexes de cuivre (II) de dérivés de bis résorcinol avec un bras imidazole ou aminoalkyl comme site de complexation métallique (DNase) [217]

(Figure 88). Dans ce système, le bis résorcinol permet la réduction du Cu(II) en Cu(I) qui réagit avec le dioxygène pour former une espèce réactive capable de cliver l'ADN.

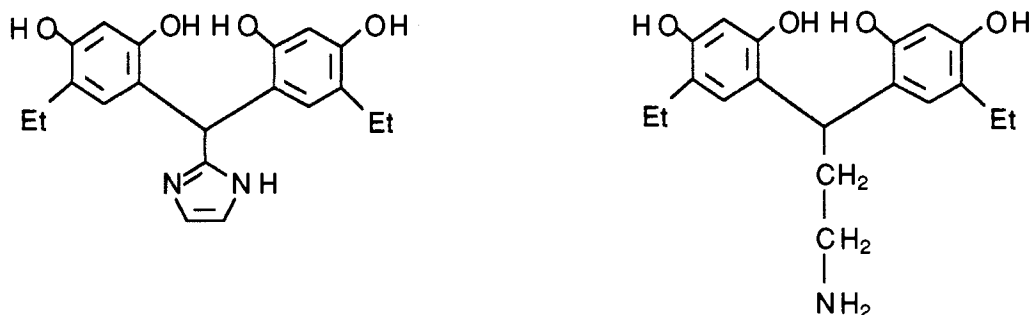


Figure 88 : Structures de bis résorcinol.

- Les complexes dinucléaires de cuivre (II) de macrocycles polyaminés (RNase) [218] (Figure 89). Il existe dans ce cas une coopérativité des deux centres métalliques pour le clivage de l'ARN et des dinucléotides (ex : ApA).

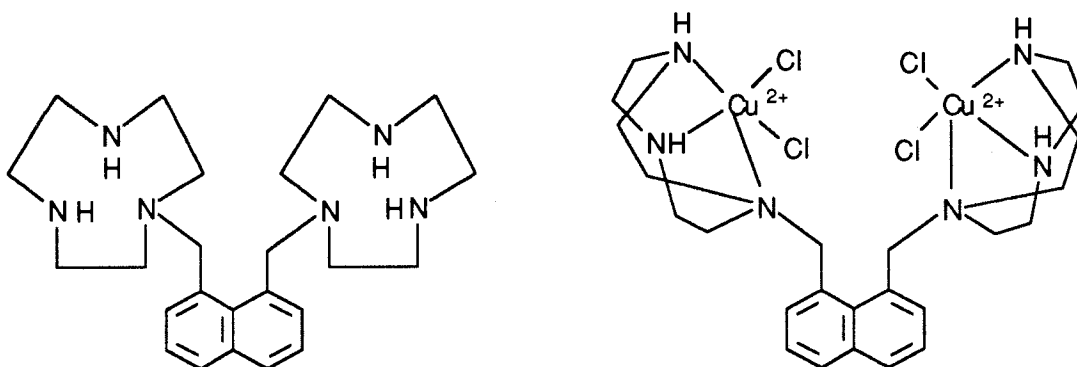


Figure 89 : Complexe dinucléaire de cuivre (II).

- Les complexes de cuivre (II) de la bipyridine, de la terpyridine et de la néocuproïne (RNase) [219] (Figure 90). Le complexe de néocuproïne se révèle le plus efficace.

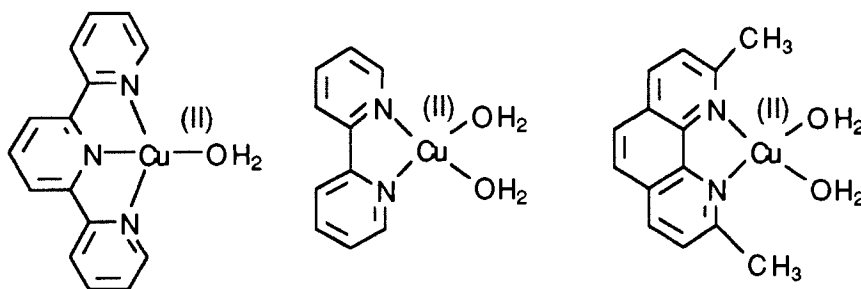


Figure 90 : Structures des complexes.

Enfin, le complexe dinucléaire de zinc (II) du N,N,N',N'-tétrakis((2-pyridyl)méthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane [220] (Figure 91) hydrolyse le diribonucléotide ApA avec une efficacité bien supérieure au complexe mononucléaire car il y a, dans ce cas, coopérativité entre les deux ions zinc. Un mécanisme de l'hydrolyse par ce complexe est proposé (Figure 91).

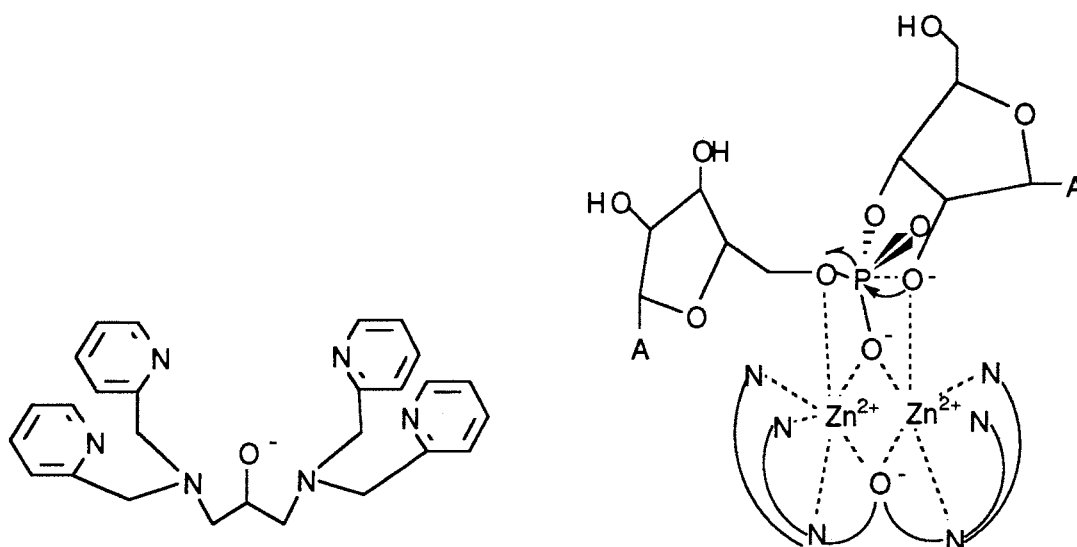


Figure 91 : Structure du N,N,N',N'-tétrakis((2-pyridyl)méthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane et de son complexe.

3- Les complexes de cuivre (I) et (II) de la phénanthroline et de la néocuproïne.

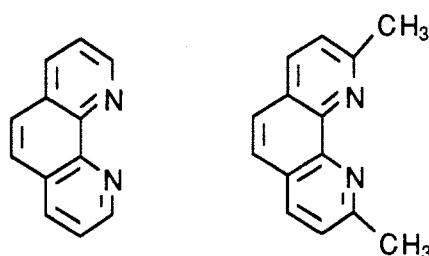


Figure 92 : Structures de la phénanthroline et de la néocuproïne.

Deux revues récentes [221, 222] ont traité des nucléases chimiques en particulier celles qui agissent en oxydant les unités "sucre" de l'ADN ou de l'ARN. C'est dans cette catégorie que se situe l'activité nucléasique du complexe de cuivre (II) de la 1,10-phénanthroline $(OP)_2Cu^{2+}$. Son mécanisme d'action et les facteurs qui interviennent dans le processus de clivage de l'ADN ont été largement étudiés [219, 221, 222].

Le complexe de cuivre (II) est d'abord réduit en complexe de cuivre (I) par addition d'agents réducteurs comme les thiols (acide mercaptopropionique). La première étape de la réaction avec l'ADN est la formation d'un complexe non covalent entre les deux entités. La deuxième étape de la réaction est l'oxydation de l'ADN lié au cuivre par le peroxyde d'hydrogène conduisant à son clivage (Figure 93).

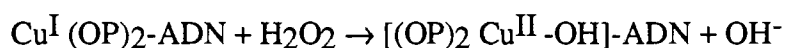
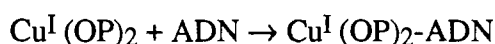
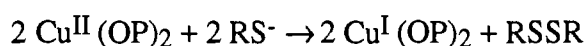


Figure 93 : Réactions conduisant au clivage d'un dimère d'ADN [221, 222].

Les produits de la réaction sont des nucléotides portant des phosphomonoesters 3' et 5' terminaux, des bases libres et la 5-méthylène furanone (Figure 94).

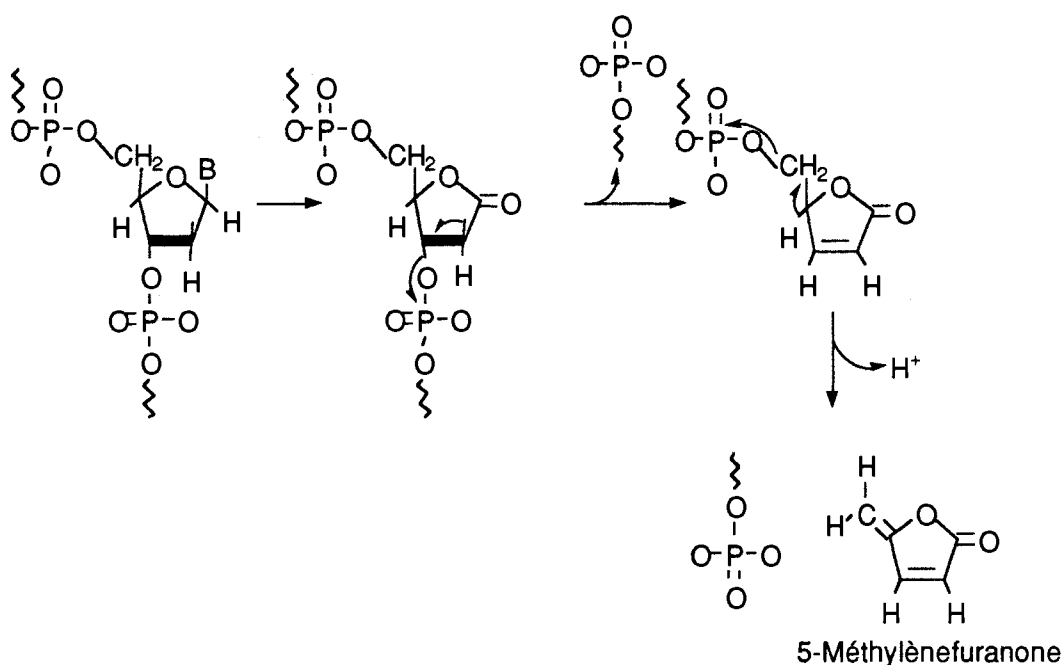


Figure 94 : Mécanisme du clivage de l'ADN par $\text{Cu}^+ (\text{OP})_2$ [221].

Le site initial attaqué par le peroxyde d'hydrogène dans l'intermédiaire $\text{ADN}-(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ est l'hydrogène porté par le carbone 1 du déoxyribose ce qui implique que $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ se lie à l'ADN dans une orientation où l'ion cuivre est accessible à cet hydrogène dans le petit sillon. Différentes études ont montré que l'intermédiaire formé entre $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ et le peroxyde d'hydrogène est un radical hydroxyl coordonné au cuivre (II). $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ clive de préférence le déoxyribose de l'adénosine des triplets TAT.

Des études cristallographiques ont montré que la réactivité de l'ion cuivre et l'activité nucléasique de ce complexe étaient dues à sa structure tétraédrique qui lui permettait de se lier au petit sillon avec une grande affinité. Des études spectroscopiques ont permis de montrer que la phénanthroline pouvait agir comme un agent intercalant au niveau de l'ADN. $(OP)_2Cu^+$ peut aussi cliver l'ARN mono brin avec un mécanisme oxydatif identique à celui décrit pour le clivage de l'ADN double brin.

L'activité nucléase du complexe $(OP)_2Cu^+$ peut être ciblée de différentes manières [222] sur des séquences ou des sites spécifiques de l'ADN ou de l'ARN :

- en préparant des conjugués $(OP)_2Cu^+$ -oligonucléotide complémentaire d'une séquence d'ADN [223] ou d'ARN,
- en préparant des conjugués $(OP)_2Cu^+$ - α -oligonucléotide qui sont résistants aux nucléases et pourraient être utilisés pour réguler l'expression des gènes *in vivo*,
- en préparant des conjugués $(OP)_2Cu^+$ -protéine spécifique,
- en préparant des conjugués $(OP)_2Cu^+$ -colorants aptes à se lier au petit sillon qui permettent d'augmenter la réactivité du complexe ou de modifier sa sélectivité.

4- Les CDs : Modèles de nucléases artificielles.

Clivage des ribonucléotides catalysé par les CDs natives.

Ce travail a principalement été effectué par KOMIYAMA *et al.* [224, 225] et montre que l' α -, la β - et la γ -CD peuvent catalyser régiosélectivement le clivage des 2',3'ribonucléotides cycliques monophosphate ou celui de polyribonucléotides, seul le site de clivage varie en fonction des CDs (Figure 95). L' α -CD clive la liaison P-O(2') des 2',3'ribonucléotides cycliques monophosphate avec une grande sélectivité pour le CMP cyclique (Tableau 25).

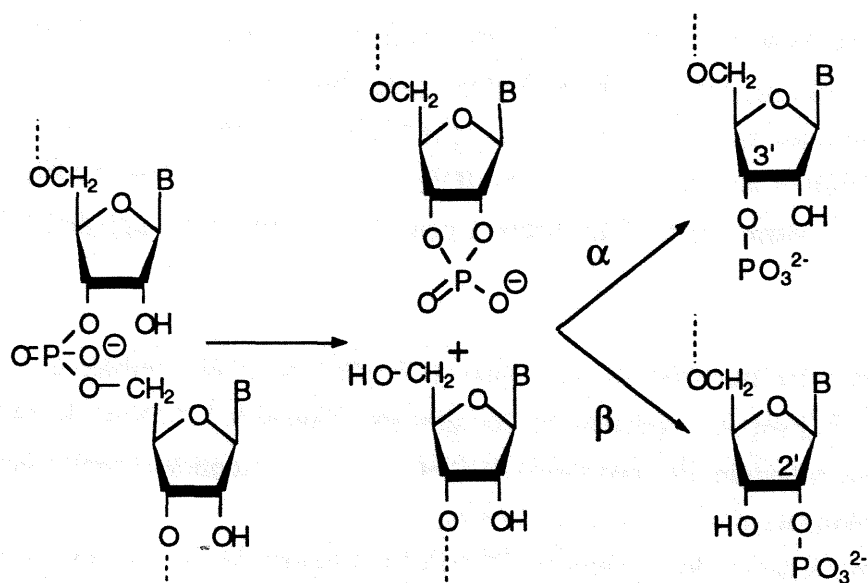


Figure 95 : Représentation schématique du clivage des ribonucléotides par les CDs.

Tableau 25 : Sélectivité de clivage en 2' par les CDs des ribonucléotides cycliques.

Substrat	CD	[CD] (10^{-2} M)	Sélectivité (%)
CMPC	α	1	81
CMPC	α	5	98
CMPC	β	1	45
CMPC	γ	1	47
CMPC	-	-	47
UMPC	α	1	70
UMPC	α	5	94
UMPC	β	1	43
UMPC	γ	1	50
UMPC	-	-	50
AMPC	α	1	67
AMPC	α	5	76
AMPC	-	-	46
GMPC	α	1	62
GMPC	α	5	67
GMPC	-	-	52

La sélectivité augmente avec la concentration de CD. A pH 11,08 et 20°C, le clivage du CMPc est fortement accéléré en présence d' α -CD et le clivage de la liaison P-O (3') est supprimé. L' α -CD clive les liaisons phosphate dans le même sens que la ribonucléase. En ce qui concerne les β - et γ -CDs, elles catalysent sélectivement le clivage de la liaison P-O(3') des ribonucléotides (Tableau 25) et empêchent celui de la liaison P-O (2').

Ces catalyses régiosélectives par les CDs sont applicables aux polyribonucléotides (Tableau 26)

Tableau 26 : Sélectivité de clivage des polyribonucléotides par les CDs .

ARN	Sélectivité (%)	
	Coupure en 2'(α -CD)	Coupure en 3'(β -CD)
Poly [A]	77	86
Poly [C]	97	52
Poly [G]	68	61
Poly [U]	97	49

En RMN ^1H , les déplacements chimiques de l' α -CD et des ribonucléotides montrent que ceux-ci n'entrent pas dans la cavité de la CD mais que les atomes d'oxygène du groupe phosphate forment des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles secondaires de l' α -CD (Figure 96).

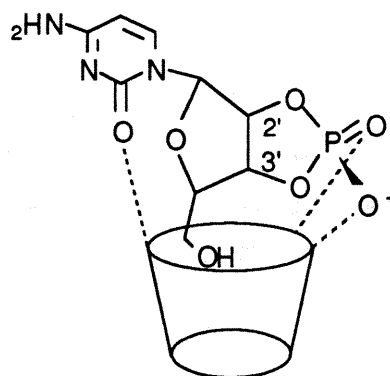


Figure 96 : Structure possible du complexe α -CD-CMPc.

Dans le cas de la β -CD, il y a formation d'un complexe d'inclusion entre la base du ribonucléotide et la CD (Figure 97).

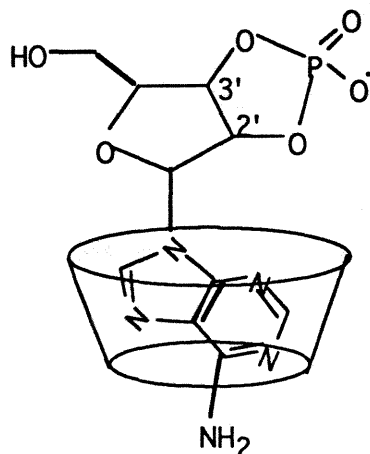


Figure 97 : Structure possible du complexe β -CD-UMPc.

La connaissance de la structure de ces complexes, a permis de formuler un mécanisme du clivage des ribonucléotides par les CDs. Dans le complexe avec l' α -CD l'oxygène en position 3' se trouve trop près de la cavité hydrophobe de la CD pour pouvoir former un alcoolate tandis que la formation de l'alcoolate de l'oxygène en position 2' est favorisée par le milieu aqueux. Au cours de la réaction, le phosphate se rapproche des hydroxyles secondaires de la CD et favorise l'attaque d'un ion alkoxyde ou de l'eau, au niveau de l'atome de phosphore. Pour la β -CD, il se passe le phénomène inverse.

Par la suite, KOMIYAMA [225] a montré que les halogénures de métaux alcalins (NaCl, KCl, CsCl, KBr, KF) avaient un effet coopératif sur le clivage de l'AMPc par les β - et les γ -CDs.

Enfin, une étude du mécanisme, qui concerne le clivage des liaisons phosphodiester par la β -CD, a été réalisée [226]. Ce mécanisme, établi à partir de dérivés phosphorylés non cycliques diffère de celui de KOMIYAMA. Ici il y a formation d'un complexe d'inclusion entre les deux entités et le clivage s'effectue par attaque nucléophile de l'un des hydroxyles secondaires de la CD sur l'atome de phosphore qui se trouve à l'extérieur de la cavité. Le groupe phosphoryle est transféré du nitrophénol à la CD pour former une CD phosphodiester (Figure 98).

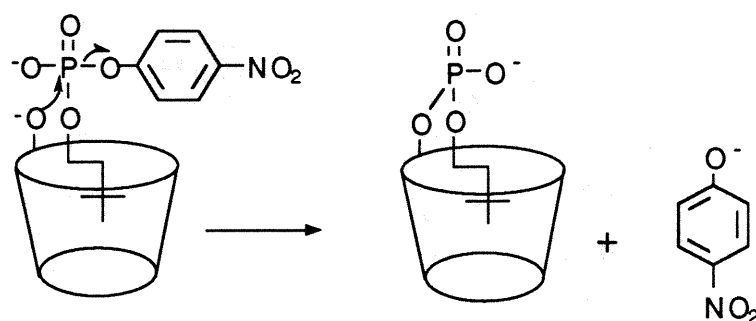


Figure 98 : Clivage des liaisons phosphodiesters par les β -CDs.

Clivage des ribonucléotides catalysé par les CDs modifiées.

BRESLOW *et al.* [227] ont synthétisé des CDs bis-imidazoles, isomères de position, comme modèle de la ribonucléase A (Figure 99).

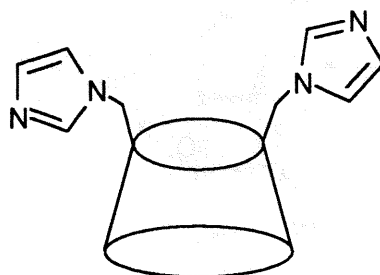


Figure 99 : Structure de la β -CD bis imidazole.

En effet, le site actif de cette enzyme comprend deux histidines dont l'une est protonée et l'autre neutre. Celles-ci interviennent dans le mécanisme de la catalyse acide-base lors de l'hydrolyse de l'ARN en permettant la formation de l'intermédiaire phosphate cyclique puis son hydrolyse.

L'isomère AB de cette CD bifonctionnelle s'est révélé le plus efficace pour catalyser l'hydrolyse de l'ester cyclique de phosphate du 4-*t*-butylcatéchol (Figure 100). Un complexe d'inclusion se forme entre cette molécule et la CD et le pH optimal de la réaction est de 6,2. Le seul produit de la réaction est le 2-monoester (Figure 100).

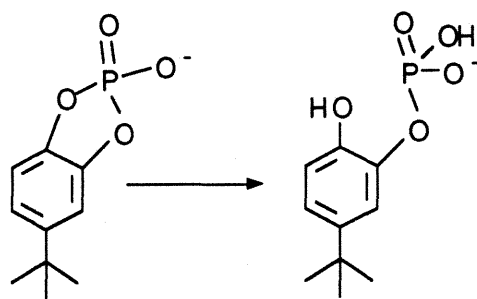


Figure 100 : Ester cyclique de phosphate du 4-*tert*-butylcatéchol (substrat) et son monoester, produit de la réaction [227].

Le mécanisme de cette catalyse est bifonctionnel comme avec l'enzyme naturelle. BRESLOW *et al.* ont largement étudié ce mécanisme (Figure 101).

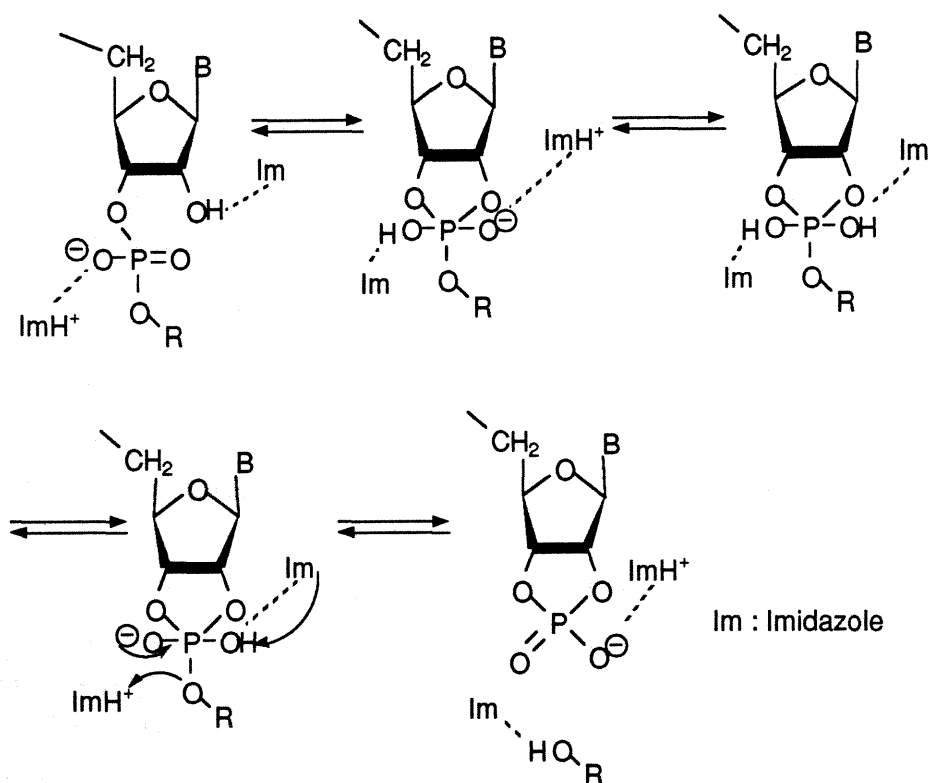


Figure 101 : Mécanisme d'action de la Ribonucléase A et de la CD bis-imidazole [197].

Enfin, le complexe de zinc (II) d'une β -CD monosubstituée par une diéthylène triamine sur un hydroxyle primaire a été préparée par MATSUMOTO *et al.* [228]. Ce complexe peut cliver les ribonucléotides 2',3'-monophosphates cycliques. La réaction procède *via* la complexation de la base nucléique dans la cavité de la CD (complexe 1:1) (Figure 102) suivi de l'attaque nucléophile de l'ion hydroxyde lié au zinc ou d'un ion hydroxyde libre ou de l'eau. La catalyse la plus importante est obtenue avec les

ribonucléotides puriques (l'hydrolyse de l'AMPc est accélérée deux mille trois cent fois à pH 7). Ce complexe peut aussi cliver des dimères de ribonucléotides.

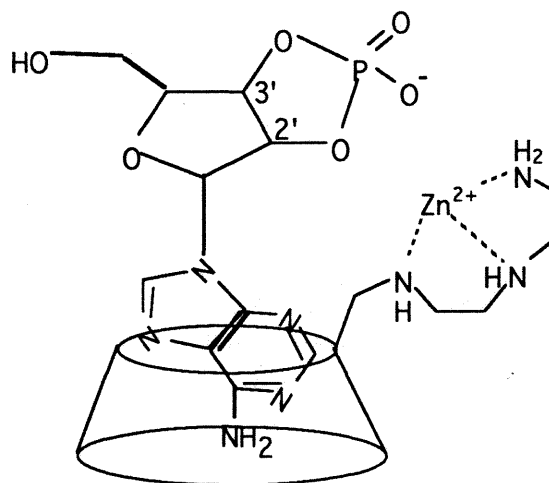


Figure 102 : Structure du complexe de zinc (II) d'une β -CD monosubstituée par une diéthylène triamine

De nombreuses structures ont été élaborées à ce jour pour mimer les nucléases. La plupart d'entre-elles sont des modèles de RNases et catalysent de ce fait l'hydrolyse de structures mono brin. En dehors de molécules naturelles telle que la bléomycine, seuls les complexes de phénanthroline induisent le clivage de l'ADN en s'intercalant dans la double hélice d'ADN. Il serait maintenant intéressant que tous ces modèles de RNases soient testés sur l'ARN naturel. En effet, la majorité de ces travaux (exceptée la phénanthroline) ont été effectués sur des mono ou des diribonucléotides ou sur des molécules organiques phosphorylées dont la structure diffère totalement de celle des nucléotides.

En ce qui concerne les CDs, peu de modèles de nucléases ont été réalisés bien que les CDs natives puissent catalyser l'hydrolyse de mononucléotides cycliques. La CD bis-imidazole de BRESLOW reste la plus largement citée car son mécanisme d'action bifonctionnel est identique à celui de la RNase A naturelle. Là aussi, il serait intéressant de tester les aptitudes de cette structure face à l'ARN naturel. Enfin, ce type de molécules peut permettre de mieux comprendre les mécanismes de la catalyse enzymatique. Ainsi, BRESLOW a pu proposer un nouveau mécanisme d'action de la RNase A après ses travaux avec la CD bis imidazole. D'autres utilisations sont possibles comme le ciblage et le clivage de certaines séquences d'acides nucléiques. Le complexe Cu(II)(OP)₂ lié à une protéine a aussi été utilisé pour cliver et isoler des fragments d'ADN nécessaires à des expériences de clonage ou à l'établissement de cartes chromosomiques [222].

Partie 3 : Synthèses

Champ d'application et limites de la réaction de Mitsunobu en série cyclodextrines

Synthèse de CDs monosubstituées sur la face des hydroxyles secondaires

Synthèse de dimères de β -CDs

Dérivés de CDs, Transporteurs d'oligonucléotides

Introduction

Comme nous l'avons montré dans la première partie de notre mémoire, la chimie des CDs s'est très largement développée au cours des dernières années. Dans le domaine biomédical et pharmaceutique, de nouvelles applications les concernant sont apparues.

L'intérêt suscité par ces molécules a relancé, parallèlement, la recherche de nouvelles méthodologies de synthèse dédiées à l'obtention de nouvelles cyclodextrines modifiées. Les méthodes décrites dans la littérature, nous l'avons vu, ne permettaient que très rarement l'obtention directe des produits désirés et il subsiste un manque relatif de méthodes de fonctionnalisation directe.

Notre travail de recherche est subdivisé en trois sections :

- Une première section qui décrit les potentialités méthodologiques de la réaction de Mitsunobu pour la fonctionnalisation directe des cyclodextrines,
- Une seconde section qui décrit les potentialités méthodologiques de la réaction dite "phosphinimine" à la fonctionnalisation directe et à la formation de dimères de CDs,
- Une troisième section traite des propriétés structurales, physico-chimiques et catalytiques de nouveaux dimères de CDs.

Champ d'Application et Limites de la Réaction de Mitsunobu en Série Cyclodextrines

Présentation de la réaction

La réaction de Mitsunobu est utilisée dans la synthèse et la transformation de différents produits naturels car elle s'effectue dans des conditions douces, elle est stéréospécifique et régiosélective. Elle met en oeuvre le système tri-aryl (ou alkyl) phosphine / dialkyl azodicarboxylate. C'est une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle la triphénylphosphine est oxydée en oxyde de triphénylphosphine et le diisopropyl azodicarboxylate réduit en diisopropyl hydrazine dicarboxylate. Le mécanisme est le suivant (Figure 103) [229] :

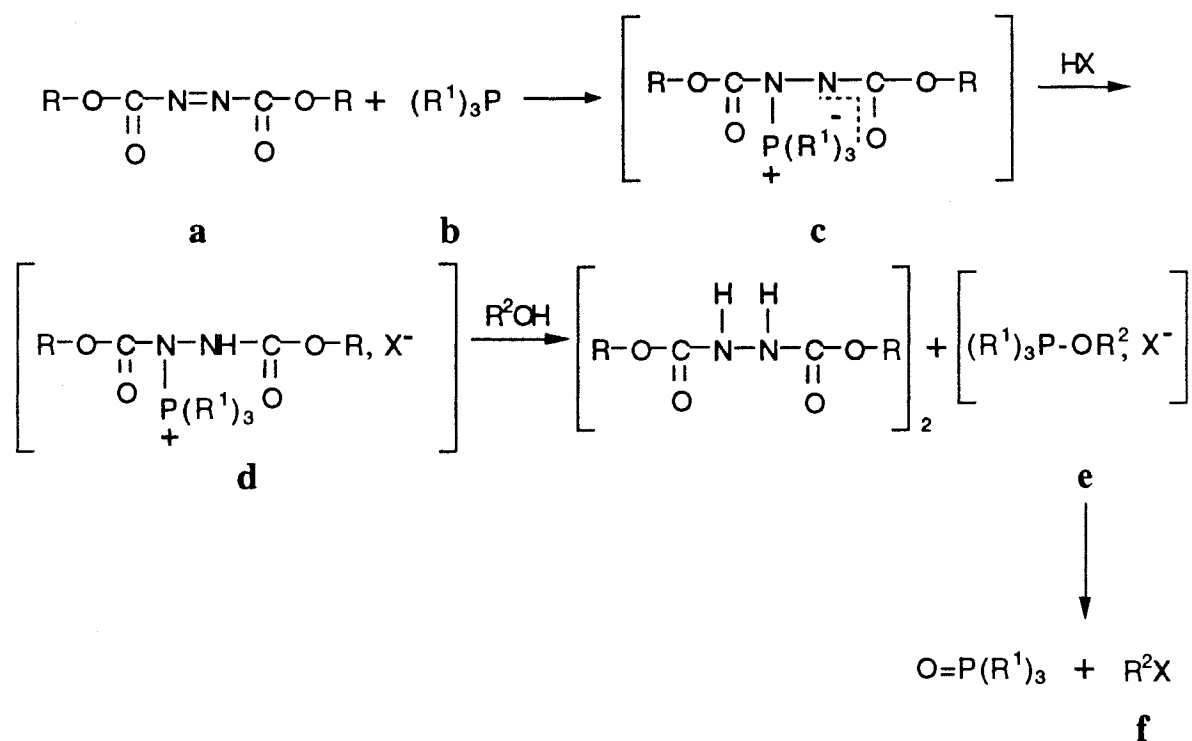


Figure 103 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu [229].

L'addition de **b** sur **a** par attaque nucléophile de la phosphine sur l'azote fournit un sel de phosphonium quaternaire **c** (bétaine). **c** est protoné pour former l'intermédiaire

En ce qui concerne la formation de la bétaine, les deux mécanismes (attaque nucléophile ou formation de radicaux) sont possibles mais l'intermédiaire radicalaire **1** est formé majoritairement si le dicarboxylate est en excès par rapport à la phosphine (*e.g.* addition d'une solution de phosphine sur le dicarboxylate) ou si un large excès de ces deux réactifs est utilisé. La présence, à forte concentration, de **1** pourrait être à l'origine de réactions secondaires. Il est possible d'éviter la formation de ces radicaux en respectant un ordre précis d'addition des réactifs (*e.g.* addition du dicarboxylate à une solution de triphénylphosphine, alcool et nucléophile) et en ajoutant toujours l'azodicarboxylate à la phosphine (et non l'inverse) de façon à ce que celui-ci ne soit jamais en excès.

I- Fonctionnalisation directe de la face primaire de la β -CD non protégée par la réaction de thio-Mitsunobu.

Différents travaux ont été effectués concernant la thio-fonctionnalisation des mono et disaccharides protégés ou non, par la réaction de Mitsunobu. Ils ont permis d'aboutir à des dérivés substitués par des hétérocycles en position 6 [231] ou en positions 3 et 6 [232, 233]. Ces composés sont des intermédiaires de synthèse dans l'obtention des déoxy-mono et disaccharides.

Considérant les résultats obtenus sur les mono et disaccharides, nous avons tenté d'utiliser cette réaction pour fonctionnaliser les β -CDs natives puis méthylées. Cette méthode apparaissait potentiellement constituer une bonne alternative aux méthodes de monofonctionnalisation des CDs déjà existantes. D'autre part, cette réaction peut aussi être le point de départ d'une nouvelle stratégie de préparation des dérivés de β -CDs permettant d'éviter de longues synthèses multi-stades puisque les couplages se font directement à partir de la β -CD non modifiée.

La réaction de Mitsunobu ne s'effectuant que dans des conditions impérativement anhydres, la β -CD et les solvants ont été préalablement séchés et toutes les réactions conduites sous atmosphère d'argon.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser les conditions générales décrites par Mitsunobu [229], un mélange de triphénylphosphine (PPh_3) et de diisopropylazodicarboxylate (iPrAD) est placé à 0°C et laissé en réaction pendant 30 min. puis un mélange de CD et de thiol, en solution dans la pyridine est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé 1h à 0°C puis 12h. à température ambiante. Dans ces conditions, même en large excès de réactifs (douze équivalents), la β -CD est retrouvée intacte.

Estimant que le manque de réactivité provenait de la température et de l'ordre d'addition des réactifs, nous avons modifié ce protocole ce qui nous a conduit à étudier les conditions de réaction. Divers nucléophiles ont été utilisés lors de cette étude.

1- Etude des conditions de la réaction de thio-Mitsunobu sur la β -CD non protégée.

α -Cas du thiophénol

Synthèse :

Les premiers essais ont été conduits comme suit : à du PPh_3 (douze équivalents) en solution dans la pyridine, à 0°C , est ajouté goutte à goutte de l'iPrAD (douze équivalents). Après 30 min. à 0°C , une solution de thiophénol (douze équivalents), dans la pyridine, est ajoutée goutte à goutte et le mélange est encore laissé 30 min. à 0°C puis ce réactif est additionné goutte à goutte, lentement (1,5h), à une solution de β -CD dans la pyridine, placée à température ambiante (Figure 106). Cette addition permet d'éviter un excès de réactif par rapport à la CD, pour un temps donné.

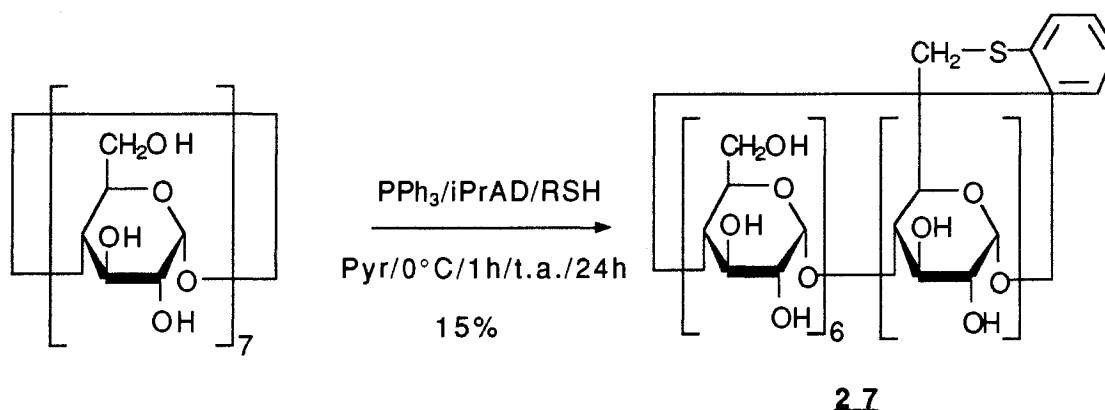


Figure 106 : Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-S-thiophényl-cyclomaltoheptaose **27**.

Le traitement du mélange réactionnel est simple. Après évaporation du solvant, l'addition d'acétone permet la précipitation des dérivés de CDs. Le mélange est ensuite purifié par CLHP, moyenne pression à polarité de phase inversée (Eluant : eau 70/ méthanol 30) pour fournir le composé **27** avec un rendement de 15%.

Le composé **27** a été analysé par RMN ^{13}C et spectrométrie de masse (FAB^+) pour confirmer sa structure. L'analyse élémentaire du composé **27** révèle la présence de sept molécules d'eau dans la molécule.

D'une manière générale, toutes les autres réactions ont été conduites à température ambiante, sous atmosphère d'argon afin de tenter d'améliorer la réactivité. Le diisopropylazodicarboxylate a été ajouté goutte à goutte à une solution de β -CD, de triphénylphosphine et de thiol. Cette addition étant exothermique, elle est effectuée lentement de façon à éviter une trop grande élévation de température du mélange réactionnel. L'évolution de toutes les réactions a été suivie par c.c.m.. Certaines conditions réactionnelles particulières seront précisées ci-après (Tableau 27).

Tableau 27 : Conditions de réaction utilisées pour la réaction de thio-Mitsunobu avec le thiophénol.

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n≥3
1	12	1x12	12	Pyridine	8h	++	+	+
2	12	1x12	12	Pyridine	8h-Tamis moléculaire	++	+	±
3	12	1x12	12	DMA	8h-Tamis moléculaire	++	+	±
4	12	2x6	6	DMA	7,5h	++	+	+
5	12	2x6	6	DMA	24h-obscurité	++	++	++
6	12	2x6	6	DMF	8h-obscurité	++	++	++
7	12	2x3	3	DMF	7h-obscurité	++	++	+
8	12	2x1,5	1,5	DMF	7h-obscurité	±	-	-
9	12	3x1,5	3	DMF	24h-obscurité	±	-	-
10	6	2x6	6	Pyridine	5h-Tamis moléculaire	±	-	-

Le tableau permet de constater qu'il faut un minimum de trois équivalents de thiol et de six équivalents d'iPrAD pour observer une réaction. L'utilisation d'un large excès de PPh₃ est nécessaire dans tous les cas.

Il est cependant intéressant de noter certaines particularités, fonction des conditions de réaction utilisées :

- les essais conduits en absence de lumière favorisent une polysubstitution et la réaction est accélérée. La formation du produit monosubstitué est détectée après seulement 45 minutes de réaction,
- La présence de tamis moléculaire, au contraire, semble favoriser la monosubstitution ,
- dans tous les cas, la deuxième addition d'iPrAD relance la réaction,
- Quelque soient les conditions de réaction :

- il n'a jamais été possible d'obtenir une substitution complète de la face des hydroxyles primaires.
- la β -CD native et le thiol ne sont jamais complètement consommés.

L'utilisation d'un large excès de tous les réactifs (douze équivalents, Exps 1,2,3) conduit à la formation du dérivé disubstitué dès la troisième heure de réaction quelque soit le solvant. La présence de tamis moléculaire ralentit la disubstitution surtout dans le diméthylacétamide (DMA) (Exp 3). Le dérivé disubstitué n'apparaît alors qu'après 5h de réaction.

Considérant les résultats obtenus et pour optimiser les conditions de réaction, nous avons décidé d'ajouter l'iPrAD en deux fois et/ou de travailler à l'abri de la lumière. Deux raisons majeures ont dicté cette conduite :

- l'iPrAD est un produit sensible à la lumière donc sa réactivité pourrait diminuer au cours du temps. Dans ce cas, il est préférable de l'ajouter en plusieurs fois et en petites quantités pour que sa réactivité reste optimale,

- l'encombrement stérique peut aussi constituer un facteur de moindre réactivité. En effet, les différents intermédiaires formés durant la réaction sont très volumineux ce qui peut créer une gêne stérique au niveau de la CD et empêcher la substitution nucléophile finale des hydroxyles par le thiol. Ce phénomène est d'autant plus important que les réactifs sont toujours en très large excès par rapport à la CD.

Etant donné que la β -CD de départ n'est qu'en partie consommée, l'hypothèse que les produits substitués soient plus réactifs que la β -CD native peut être envisagée. Dès lors, une addition en deux temps comme il en existe dans certains protocoles de tosylation pourrait éviter une polysubstitution trop rapide et privilégier la réaction de la β -CD native de départ.

Ainsi, les conditions utilisées dans l'expérience 4 (Tableau 27) ont montré qu'une addition en deux temps à 4h d'intervalle de l'iPrAD au milieu réactionnel permettait de relancer la réaction. En effet, après 4h de réaction, en présence de six équivalents d'iPrAD, la c.c.m. ne montre que la présence du produit monosubstitué. De plus, entre 2,5 et 4h de réaction, il y a peu d'évolution. L'addition de six équivalents supplémentaires permet d'obtenir en 3h la formation des dérivés di et trisubstitués en quantité équivalente, le dérivé monosubstitué restant faiblement majoritaire. Dans certains cas, cette deuxième addition permet même à la réaction de débiter. Par contre, bien que consommée, la quantité de β -CD native reste, d'après la c.c.m., du même ordre de grandeur que celle du dérivé monosubstitué. Donc si cette addition supplémentaire de réactifs permet au départ d'augmenter la formation du dérivé monosubstitué, elle favorise

en même temps la polysubstitution puisqu'1h après, la c.c.m. montre déjà la présence du dérivé disubstitué et des traces du dérivé trisubstitué. Enfin, la concentration en réactif en début de réaction n'est pas anodine. En effet, après 45 minutes, la c.c.m. du mélange réactionnel de l'expérience 4 (six équivalents de thiol, deux additions de six équivalents d'iPrAD) montre la présence marquée du dérivé monosubstitué tandis que dans les expériences précédentes (1,2,3) utilisant douze équivalents de tous les réactifs, il n'est présent au même moment qu'en faible quantité.

L'expérience 5 conduite dans les mêmes conditions que l'expérience 4 mais à l'abri de la lumière montre l'importance de ce facteur. Après 45 min. de réaction et une seule addition de six équivalents d'iPrAD, il existe déjà deux nouveaux produits et après 4h, un troisième est apparu (le dérivé monosubstitué est majoritaire). L'addition de six équivalents supplémentaires entraîne, en 1h, une polysubstitution très importante. Les quantités de produits formés et, par voie de conséquence, la quantité de β -CD consommée sont aussi très supérieures à celles observées dans l'expérience 4.

Dans le DMF (Exp 6), les résultats obtenus sont analogues à ceux décrits pour l'expérience 5.

Toutes ces réactions ont abouti à des mélanges complexes difficilement séparables de dérivés polysubstitués, chacun étant un mélange de plusieurs isomères. Le but de cette étude, étant aussi de savoir si la réaction de Mitsunobu pouvait constituer une bonne alternative aux réactions de monosubstitutions déjà existantes, nous avons testé différentes conditions de réaction pour voir s'il était possible d'obtenir uniquement de la monosubstitution (Exps 8 à 10, Tableau 27). L'utilisation d'un petit excès d'iPrAD et de thiol (Exps 8 et 9) aboutit à la formation de traces de dérivés monosubstitués même après 24h de réaction. En présence de six équivalents de tous les réactifs (Exp 10), le même résultat est obtenu. L'utilisation d'un large excès de réactifs en milieu très dilué, sans protection contre la lumière pour éviter la polysubstitution et en présence de tamis moléculaire pour favoriser la monosubstitution ne donne aucun résultat. La β -CD native est retrouvée intégralement après 8h de réaction.

Enfin, la réaction de Mitsunobu a été testée avec l' α -CD dans les conditions décrites pour l'expérience 6 (Tableau 27). Nous n'avons observé qu'une faible réactivité. Ceci est certainement dû à un problème d'encombrement stérique des intermédiaires réactionnels relativement plus important du fait de la plus petite taille du cycle de l' α -CD. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué la même réaction mais en présence de diéthylazodicarboxylate (DEAD), moins encombré. La réactivité, bien qu'encore faible, est alors améliorée. Une réaction identique effectuée avec la β -CD, dans les conditions de l'expérience 6, montre que la monosubstitution s'effectue plus rapidement après la

première addition de DEAD et qu'après deux additions (en fin de réaction), les quantités de produits formés sont plus importantes pour tous les degrés de substitution. Il est donc plausible de conclure que l'encombrement des réactifs joue un rôle important dans la réactivité. Dans le cas de l' α -CD, l'utilisation du DEAD et d'une phosphine moins volumineuse aurait sûrement pu favoriser la réaction. Cette étude étant volontairement restreinte à la β -CD, nous n'avons pas poursuivi nos investigations en ce sens dans le présent travail.

- Etude chromatographique :

Afin de connaître dans quelles proportions chaque produit était formé et dégager des critères de sélectivité en fonction des conditions de réaction, nous avons réalisé une étude chromatographique par CLHP analytique à polarité de phase inversée des différents mélanges réactionnels. Elle nous a permis de déterminer le rendement relatif de chaque produit substitué en fonction des conditions de réaction. Dans un premier temps, nous avons isolé les mono-, di- et tri-thiophényl- β -CD en quantité analytique par CLHP, la pureté des fractions récoltées a été d'abord vérifiée par c.c.m. puis par CLHP analytique de chaque fraction isolée. Ces produits ont servi de composés de référence dans notre étude.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne : Lichrospher 100 RP 18 "end-capped" 5 μ m, 125x4 mm
- Gradient d'élution :

Temps (min.)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
0	1	99
20	90	10
25	99	1
30	1	99

- Débit : 1mL.min.⁻¹
- Détection : UV, λ = 254nm
- Boucle d'injection 200 μ l

Les intervalles de temps (en minutes) pour lesquels les différentes fractions ont été récoltées sont de :

- 11<t<11,65 : 6-monothiophényl- β -CD
- 14,17<t<15,85 : 6-dithiophényl- β -CD
- 17,83<t<19,89 : 6-trithiophényl- β -CD

Par ailleurs, pour vérifier le degré de substitution et confirmer la structure des produits, nous avons voulu séparer et isoler les différentes CDs substituées d'un même mélange réactionnel. Plusieurs tentatives infructueuses de séparation par CLHP semi-préparative moyenne pression avec une phase stationnaire greffée C18 puis avec une colonne remplie Nucléosil (phase C18 "end-capped") nous ont conduit à séparer le mélange par CLHP analytique avec une silice greffée phényle. Les conditions d'élution sont les suivantes :

Temps (min.)	MeOH(%)	H ₂ O (%)
0	1	99
5	1	99
15	35	65
30	35	65
45	95	5
50	95	5
55	1	99

La détection s'effectue en UV à $\lambda=254\text{nm}$, le débit est de 1mL.min.^{-1}

Ces conditions ont permis de retarder suffisamment l'élution de la tri-thiophényl- β -CD **28** pour qu'elle puisse être en partie isolée (Rdt 5%), le temps de rétention étant alors compris entre 37 et 44 min.. Par contre, elles n'ont pas permis de séparer les CDs mono et disubstitués qui sont élués simultanément dans ces conditions (le dérivé monosubstitué **27** issu de conditions de réaction différentes a été isolé et analysé). Le composé trisubstitué ainsi isolé a été lyophilisé et analysé en spectrométrie de masse haute résolution (FAB, mode négatif). Le spectre basse résolution montre un ion pseudo-moléculaire à 1409 $[\text{M-H}]^-$ et un autre à 1502 $[\text{M+glycérol}]^-$. Le spectre de masse haute résolution nous fournit un pic à 1409,3873 $[\text{M-H}]^-$ pour une masse calculée de 1409,3867.

L'étude des mélanges réactionnels en fonction des conditions de réaction s'est faite sur colonne C18 "end-capped" et le gradient d'élution utilisé est le suivant :

- Un plateau isocratique MeOH 1% / H₂O 99% entre $t = 0$ et $t = 5$ min. pour éliminer la plus grande partie de la β -CD native,

- Une augmentation linéaire de la proportion de méthanol jusqu'à 95% en 30 min.

Les autres paramètres restent identiques aux conditions précédentes (voir p146). Les composés de référence précédemment séparés ont alors des temps de rétention de :

18,07 min. pour le dérivé monosubstitué,

22,90 min. pour le dérivé disubstitué,

28,65 min. pour le dérivé trisubstitué.

La figure 107 présente les chromatogrammes obtenus dans ces conditions pour le mélange réactionnel et pour les trois dérivés de CD précédemment séparés et isolés.

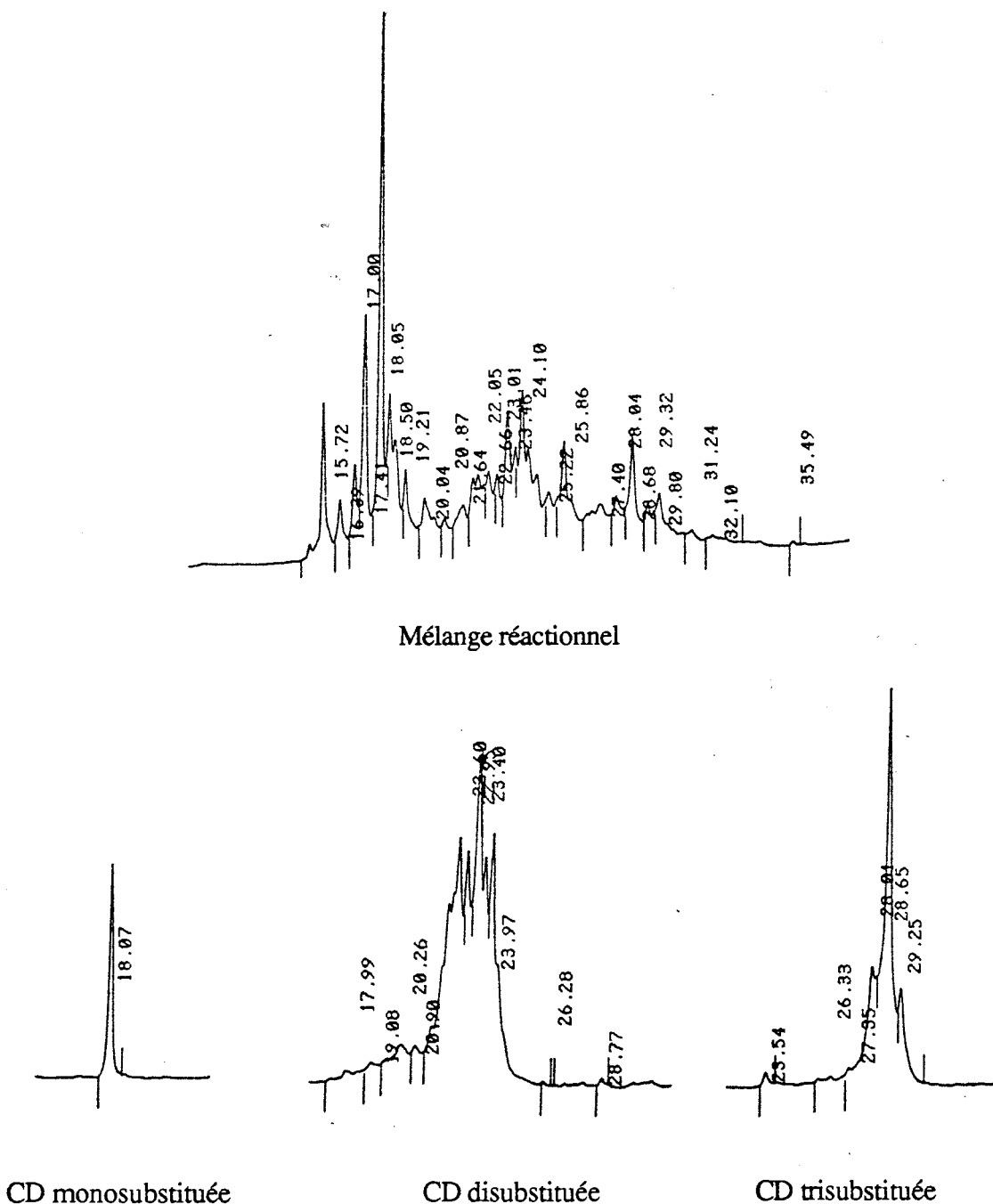


Figure 107 : Différents chromatogrammes obtenus

Les résultats de cette étude sont les suivants (Tableau 28) [233a] :

Tableau 28 : Pourcentage relatif de chaque isomère en fonction des conditions de réaction.

Thiophénol (éqs)	iPrAD (éqs)	Solvant	Temps de réaction (h)	Rdt relatif (%)		
				n=1 [#]	n=2	n=3
12	1x12	Pyridine	8	57	30	13
6	2x6	DMA	7,5	25	47	28
12	1x12	Pyridine*	8	81	14	5
12	1x12	DMA*	8	82	13	5
6	2x6	DMF**	7,5	39	44	17
3	2x3	DMF**	7,5	35	48	16

[#] : nombre de substituants * : en présence de tamis moléculaire 4Å ** : à l'abri de la lumière

Ce tableau montre que la pyridine est un solvant qui favorise la monosubstitution et que la présence de tamis moléculaire apporte une sélectivité majeure à la monosubstitution quelque soit le solvant. Le DMA et le DMF favorisent plutôt la polysubstitution indépendamment des quantités de réactifs utilisées. Les réactions effectuées à l'obscurité aboutissent à des mélanges où les produits mono et disubstitués sont en quantités équivalentes. Quelque soit la quantité de thiophénol mise en réaction (trois, six, douze équivalents), le pourcentage de trithiophényl-β-CD formé est équivalent (16, 17, 13%) dans la pyridine ou le DMF. Par contre, la réaction dans le DMA favorise la di et la trisubstitution (47 et 28%) au détriment de la monosubstitution (25%).

Les pourcentages relatifs de chaque produit substitué ont été calculés à partir de la formule suivante :

$$100.(\text{An} \cdot \sum_3^1 n \cdot \text{Mrn} / \text{An}) / \text{Mrn} = \text{Pourcentage de CD substituée}$$

n : Degré de substitution

An : Surface totale des pics correspondant aux CDs mono, di et trisubstitués

Mr : Poids moléculaire de chaque isomère

An est la somme des surfaces des pics correspondant aux différents isomères présents dans un même degré de substitution. Théoriquement (Figure 108), il existe :

- un seul isomère pour la CD monosubstituée,
- trois isomères pour la CD disubstituée,
- quatre isomères pour la CD trisubstituée.

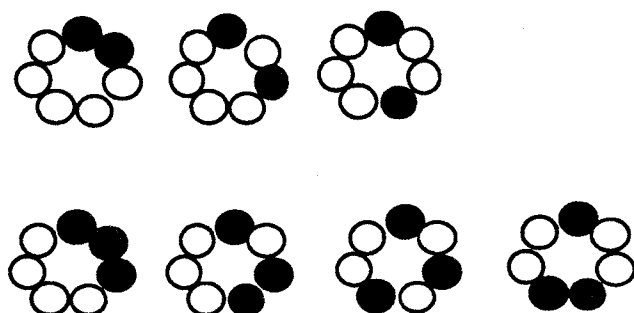


Figure 108 : Différents isomères possibles pour une β -CD substituée en fonction du degré de substitution.

Cette étude a montré que le temps de rétention des produits augmentait avec le degré de substitution. De plus, il a été vérifié, en utilisant les composés de référence, que l'absorbance était proportionnelle au degré de substitution. Enfin, il a été montré, à l'aide de CDs substituées par d'autres thiols que, pour un même degré de substitution, les propriétés chromatographiques étaient analogues quelque soit la nature du thiol utilisé.

b-Cas du 2-mercaptobenzothiazole

Afin de poursuivre notre étude de la réaction en fonction des réactifs et du thiol, nous avons choisi d'utiliser le 2-mercaptobenzothiazole.

Les premiers essais ont été conduits comme suit : à du PPh_3 (douze équivalents) en solution dans la pyridine, à 0°C , est ajouté goutte à goutte de l'iPrAD (douze équivalents). Après 30 min. à 0°C , une solution de 2-mercaptobenzothiazole (douze équivalents) dans la pyridine est ajoutée goutte à goutte et le mélange est encore laissé 30 min. à 0°C puis ce réactif est additionné goutte à goutte, lentement (1,5h) à une solution de β -CD dans la pyridine, placée à température ambiante (Figure 109). Cette addition permet d'éviter un excès de réactif par rapport à la CD, pour un temps donné.

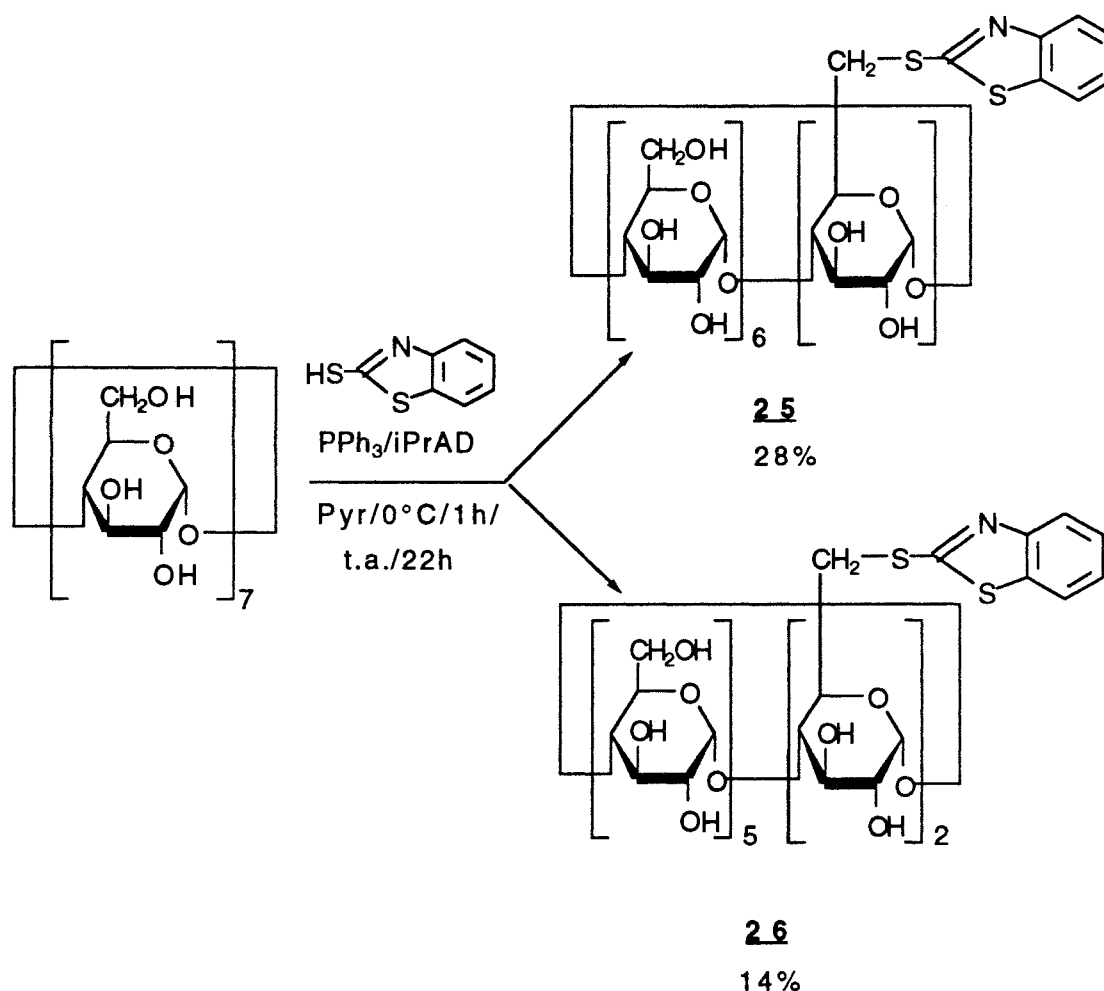


Figure 109 : Schéma de synthèse des 6-déoxy-6-thio-(2-mercaptobenzothiazolyl)-cyclomaltoheptaose **25** et 6^A,6ⁿ-didéoxy-6^A,6ⁿ-dithio-(2-mercaptobenzothiazolyl)-cyclomaltoheptaose **26**.

Le traitement du mélange réactionnel est identique à celui utilisé dans le cas du composé **27**. Le mélange est ensuite purifié par CLHP, moyenne pression à polarité de phase inversée (Eluant : eau 70/ méthanol 30 et eau 50 / méthanol 50) pour fournir les composés **25** et **26** avec des rendements respectifs de 28 et 14%.

Les composés **25** et **26** ont été analysés par RMN ¹³C et spectrométrie de masse (FAB⁺) pour confirmer sa structure. L'analyse élémentaire des composés **25** et **26** révèle la présence respectivement de quatre et cinq molécules d'eau dans les molécules.

D'une manière générale, toutes les autres réactions ont été conduites à température ambiante, sous atmosphère d'argon. Le diisopropylazodicarboxylate a été ajouté goutte à goutte à une solution de β-CD, de triphénylphosphine et de thiol. Cette addition étant

exothermique, elle est effectuée lentement de façon à éviter une trop grande élévation de température du mélange réactionnel. L'évolution de toutes les réactions a été suivie par c.c.m.. Certaines conditions réactionnelles particulières seront précisées ci-après, dans la présentation de ce travail (le tableau 29 présente les différentes conditions de réaction utilisées).

Les résultats indiquent d'abord que tous les réactifs doivent être utilisés en excès pour obtenir une réaction. Un minimum de deux équivalents de thiol est requis. Il est aussi nécessaire de travailler avec au moins six équivalents d'iPrAD et un large excès de PPh₃. Enfin, la polysubstitution apparaît plus rapidement si le mélange réactionnel est protégé de la lumière. D'une manière générale, le 2-mercaptobenzothiazole est plus réactif que le thiophénol. Quelque soient les conditions de réaction utilisées (Exps 1 à 4), les dérivés mono et disubstitués sont toujours formés simultanément.

Tableau 29 : Conditions de réaction utilisées avec le 2-mercaptobenzothiazole.

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n≥3
1	12	1x6	3	DMF	6h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	+
2	12	1x6	2	DMF	3h-obscurité	++	++	-
3	12	2x6	3	DMF	7h-obscurité	++	++	++
4	12	1x12	6	DMF	3h-obscurité	++	++	++
5	12	1x12	6	DMF	2% toluène-3h- obscurité	±	-	-
6	12	2x6	1,5	DMF	24h-obscurité	Pas de réaction		
7	6	2x1,5	2	DMF	24h-obscurité	Pas de réaction		
8	12	2x3	3	DMF	24h-obscurité	Pas de réaction		

Les résultats des expériences 3 et 4 sont analogues et fournissent un mélange de produits mono et polysubstitués. Cependant, l'apparition de la polysubstitution, dans l'expérience 3, ne se manifeste qu'après la deuxième addition d'iPrAD.

L'addition de tamis moléculaire dans l'expérience 1 n'apporte pas de changements notables à la sélectivité de la réaction. En effet, dans les expériences 1 et 2, les proportions de β -CD disubstituées obtenues sont équivalentes. L'apparition de

trisubstitution dans l'expérience 1 est probablement due à un temps de réaction prolongé additionné à une quantité plus importante de thiol.

Les réactions 6,7 et 8 montrent, à l'évidence, que la réaction ne se déroule dans de bonnes conditions qu'avec la présence d'un excès de tous les réactifs. Notons, d'une manière générale, que l'addition en deux temps de l'iPrAD a une influence dramatique sur le déroulement de la réaction puisque celle-ci ne se produit pas.

Enfin, l'addition de 2% de toluène, au milieu réactionnel, dans le cas de l'expérience 5, comparé à l'expérience 4 et dans les mêmes conditions, montre une nette inhibition de la réaction. En première hypothèse, nous aurions pu penser à une accélération de la réaction par la libération de réactifs supplémentaires dans le milieu (le toluène se complexant en lieu et place dans la CD). Cependant, la faible quantité de toluène utilisée (toutefois suffisante pour saturer toutes les cavités de la β -CD) exclut cette hypothèse et montre, au contraire que l'addition de toluène déplace probablement un réactif qui doit être inclus pour réagir. Les thiols aromatiques tel que le benzothiazole sont de bons candidats à l'inclusion et permettent d'imaginer un complexe réactif comme ci-après :

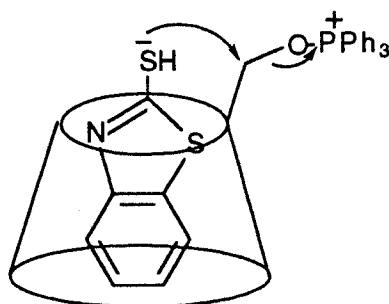


Figure 110 : Complexe d'inclusion réactif possible de la réaction de Mitsunobu avec la β -CD.

c-Cas de l'acide thiobenzoïque et de l'acide thiolacétique

Les premiers essais, comme dans les cas précédents, ont été conduits dans la pyridine, à 0°C, en excès de PPh₃ et d'iPrAD (Figure 111).

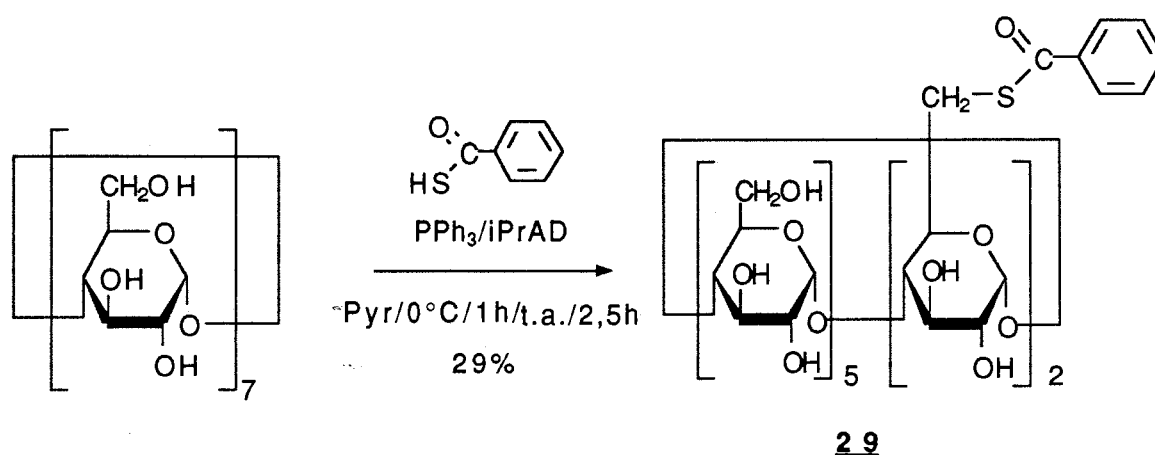


Figure 111 : Schéma de synthèse de la 6^A,6ⁿ-didéoxy-6^A,6ⁿ-dithiobenzoyl-cyclomaltoheptaose **29**.

Le composé **29** ainsi obtenu est purifié par lavages successifs dans le méthanol, à chaud (Rdt : 29%). Notons ici que seul le dérivé disubstitué **29** est isolé, la formation du dérivé monosubstitué n'est pas observée.

Le composé **29** a été analysé par RMN ¹³C et spectrométrie de masse (FAB⁺) pour confirmer sa structure.

Parallèlement, nous avons utilisé l'acide thiolacétique dont le couplage a échoué lors des tentatives effectuées à 0°C dans la pyridine ou le DMF.

Pour l'étude de la réaction les conditions générales suivantes ont été utilisées :

- température ambiante,
- sens d'addition exécuté dans l'ordre suivant : iPrAD ajouté à une solution de β-CD, de PPh₃ et du thio-acide désiré.

L'utilisation de l'acide thiolacétique avait, par ailleurs, un intérêt plus vaste. En effet, la thio-acétyl-β-CD ainsi obtenue est, en réalité, une mercapto-β-CD dont la fonction thiol est protégée. Une fonction thiol libre peut être obtenue à partir de ce dérivé par simple réduction. Cette méthode de préparation pourrait donc potentiellement

constituer une bonne alternative à la synthèse de mercapto-CDs préparées habituellement à partir des sulfonyl-CDs ou halogéno-CDs *via* un sel d'isothiuronium.

Tableau 30 : Conditions de la réaction de Mitsunobu réalisée avec l'acide thiobenzoïque et l'acide thiolacétique.

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n≥3
1	12	2x6 éqs	PhCOSH (3)	DMF	7h	-	++	++
2	12	1x6	PhCOSH (3)	DMF	1h-Tamis moléculaire- obscurité	-	++	+
3	12	2x6	MeCOSH (6)	DMF	7,5h-obscurité	++	++	++
4	12	1x6	MeCOSH (6)	DMF	5h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	++

La réactivité de l'acide thiobenzoïque s'est révélée très importante à température ambiante, un contrôle du degré de substitution s'est avéré impossible dans ces conditions. Après seulement 45 minutes de réaction, deux produits sont formés en quantité importante (Exp 1). La modification de ce temps de réaction (1h au lieu de 7h), en présence de tamis moléculaire (Exp 2), n'apporte pas d'effet significatif sur la sélectivité. Les mélanges obtenus sont très complexes et se sont révélés quasiment inséparables par CLHP.

Le même problème a été rencontré avec l'acide thiolacétique, une polysubstitution est observée très rapidement (Exps 3,4).

En conclusion, dans cette étude l'acide thiobenzoïque n'a d'intérêt que de par sa réactivité particulière qui permet d'obtenir rapidement et directement une CD disubstituée. Par contre, l'étude dans le cas de l'acide thiolacétique mériterait d'être poursuivie compte-tenu de l'intérêt en synthèse d'un intermédiaire thio-acétyl.

Enfin, nous avons pu confirmer, dans cette étude, une réactivité supérieure des thiols à réaction acide (par rapport aux autres thiols) lors de la réaction de Mitsunobu avec les CDs.

d-Cas du 3-mercapto-prop-1-ène

Le groupement thio-allyle nous a paru intéressant à greffer pour plusieurs raisons :

- le groupe allyle est connu pour être un bon groupement protecteur temporaire en synthèse d'une manière générale, et en voie oligosaccharidique en particulier,
- le groupe allyle est également un point de départ à la fonctionnalisation ultérieure des CDs et à l'allongement des chaînes carbonées substituantes,
- enfin, le groupe allyle est susceptible de permettre la production de polymères par copolymérisation.

Nous avons rassemblé dans le tableau 31 les différentes expériences et conditions utilisées pour la réaction de Mitsunobu à partir du 3-mercapto-prop-1-ène comme substituant.

Ce thiol s'est révélé très réactif dans les différentes expériences. L'utilisation de temps de réaction même relativement brefs (1h, Exp 5) ont induit une polysubstitution (produits mono et disubstitués en proportions équivalentes). La présence de tamis moléculaire (Exp 3) dans le milieu réactionnel n'apporte pas, ici, de changements dans la sélectivité de substitution.

Tableau 31 : Réaction de Mitsunobu réalisée avec le substituant 3-mercapto-prop-1-ène.

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n≥3
1	12	1x6 éqs	6	DMF	5h-obscurité	++	+	-
2	12	2x6	6	DMF	7h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	++
3	12	1x12	12	DMF	2h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	+
4	12	1x12	6	DMF	2h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	+
5	12	1x12	3	DMF	1h-Tamis moléculaire- obscurité	++	++	+

Comme précédemment l'addition en deux temps d'iPrAD permet à la réaction une évolution plus rapide vers la polysubstitution alors que la première addition d'iPrAD ne permet la formation que d'une proportion limitée de composé monosubstitué.

e-Cas des monosaccharides : 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose (GalSH) et 2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-mannopyranose (ManSH)

Dans ce cas, l'intérêt de la réaction était d'aboutir directement à une CD glycosylée déjà préparée antérieurement par une synthèse multi-stades [18].

Les premiers essais ont été conduits comme précédemment à 0°C (Figure 112).

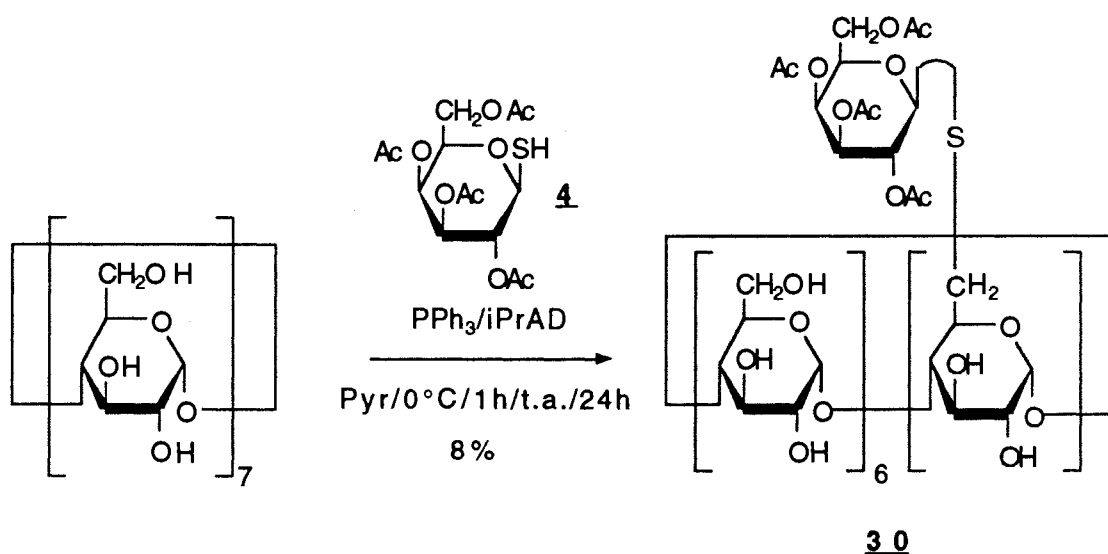


Figure 112 : Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-thio-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-cyclomaltoheptaose **30**.

La préparation du composé **30**, a nécessité, préalablement, la synthèse du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**. Ce composé a été synthétisé selon une méthode décrite dans la littérature [18] (Figure 113).

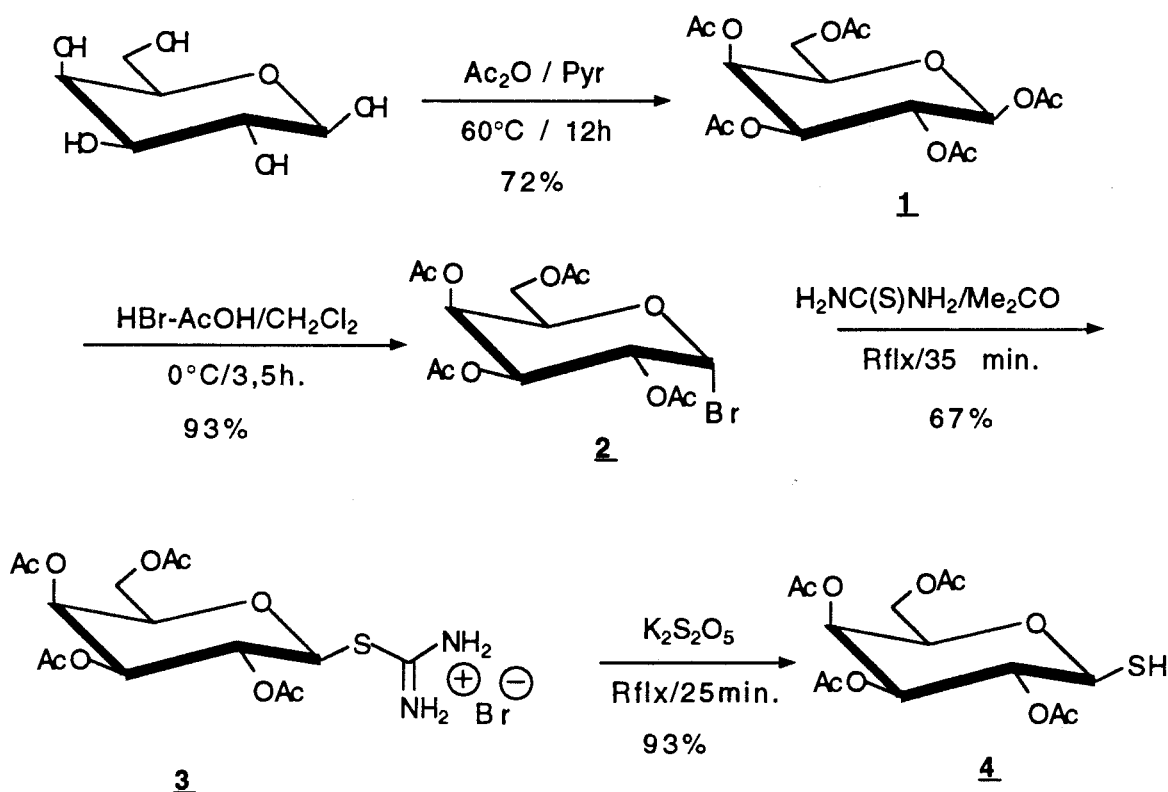


Figure 113 : Schéma de synthèse du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**.

Le couplage de **4** avec la β -CD native dans les conditions décrites précédemment (Figure 112), fournit le composé **30** avec un rendement de 8% (purification par CLHP préparative, éluant : $\text{H}_2\text{O} 65 / \text{MeOH} 35$). Le composé **30** a été analysé par RMN ^{13}C et spectrométrie de masse (FAB^+) pour confirmer sa structure.

La synthèse multi-stade décrite pour la préparation de la mono- β -D-galactosyl- β -CD [164] a un rendement global de 18% au départ de la CD native. La méthode que nous employons reste néanmoins intéressante dans l'obtention de ce type de dérivés étant donné qu'elle est directe et ne nécessite que la déacétylation du galactose.

Dans la mesure où le thio- β -galactose acétylé **4** s'est montré peu réactif dans ces conditions, nous avons ici utilisé les conditions de réaction pour lesquelles apparaissait une polysubstitution avec les thiols précédemment décrits, en supposant qu'elles pourraient, dans ce cas, améliorer la monosubstitution. Les meilleures conditions de réaction que nous ayons pu trouver sont : douze équivalents de PPh_3 , douze équivalents d'iPrAD (ajoutés en deux fois) et trois équivalents de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**, dans le DMF, à l'abri de la lumière (Exp 2) (Figure 114).

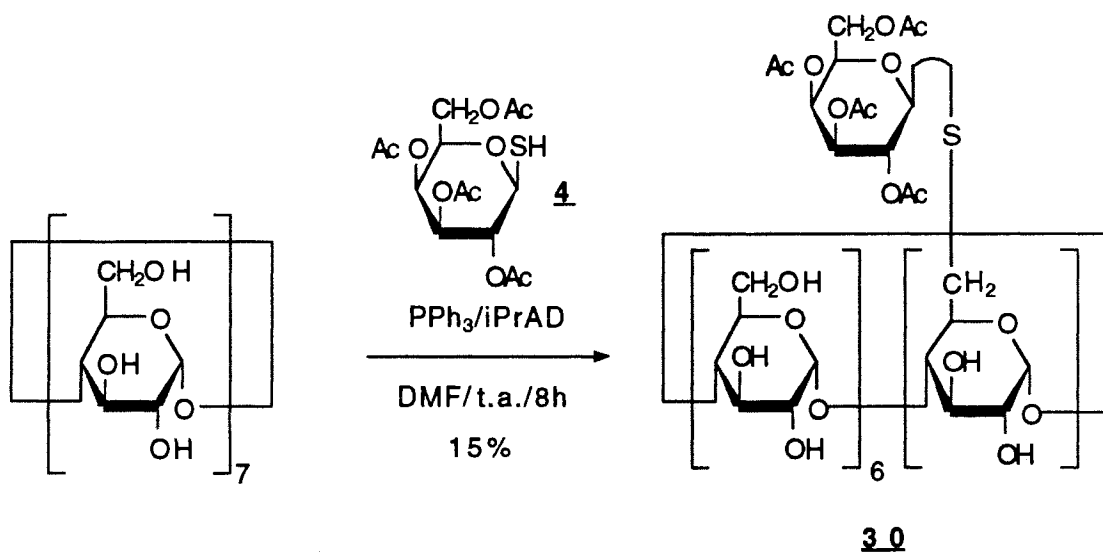


Figure 114 : Synthèse du composé **30**

Un mélange de trois produits est obtenu après 8h de réaction dans lequel le produit monosubstitué est majoritaire. La CD monogalactosylée **30** a été isolée du mélange par CLHP avec un rendement de 15%. Nous pouvons remarquer que dans ces conditions le rendement obtenu est proche de celui obtenu par synthèse multi-stades (18% à partir de la β -CD native [18]).

Plusieurs autres conditions de réaction ont été étudiées, elles sont rassemblées dans le tableau 32.

Tableau 32 : Réaction de Mitsunobu réalisée avec les substituants 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose et 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-mannopyranose.

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n $\geq$ 3
1	12	2x6 éqs	GalSH (12)	DMA	8h	+	-	-
2	12	2x6	GalSH (3)	DMF	8h-obscurité	++	+	+
3	12	2x6	GalS ⁻ Na ⁺ (6)	DMA	30h	+	-	-
4	12	4x6	ManSH (6)	DMA	30h	+	-	-
5	12	2x6	ManSH (3)	DMA	8h-obscurité	++	+	+

Le tableau ci-dessus montre que les expériences 1 et 3 fournissent exclusivement le dérivé monosubstitué en faible quantité. Dans l'expérience 3, c'est le sel de sodium **5** du thio- β -galactose qui a été utilisé. Ce composé a été préparé selon la méthode décrite par DE ROBERTIS à partir du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4** avec un rendement de 76% [163].

L'utilisation du thiolate devait permettre d'obtenir directement le produit de substitution sans étape de déacétylation et augmenter la nucléophilie du thiol pour une meilleure réactivité. L'utilisation de ce sel n'a pas amélioré la réaction.

Les expériences 4 et 5 permettent de conclure que la différence de réactivité est plutôt liée à la présence ou à l'absence de lumière. Dans tous les cas où il existe une polysubstitution, celle-ci n'est apparue qu'après la seconde addition d'iPrAD. En général, la première addition, ne produit, après 4h de réaction, que le dérivé monosubstitué en faibles quantités.

Enfin, les expériences 4 et 5, effectuées avec le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-mannopyranose montrent que dans les conditions utilisées pour cette étude, la réactivité du monothiosaccharide est indépendante de sa structure.

Conclusion :

En règle générale, les rendements de la réaction de thio-Mitsunobu restent modestes mais, cependant compétitifs par rapport à ceux obtenus dans la littérature dans le cas d'une monotosylation. Dans tous les cas, il est possible de recycler la β -CD et le thiol. Les thiols aromatiques s'avèrent les plus réactifs, en particulier l'acide thiobenzoïque puisqu'il fournit directement un produit disubstitué.

L'utilisation de la méthodologie de Mitsunobu, appliquée à la fonctionnalisation directe des CDs, s'est révélée intéressante en tant que nouvelle voie d'accès aux thio-dérivés des CDs natives. Cependant, un certain nombre de problèmes subsistent :

- la réactivité reste difficile à contrôler, elle est soit faible, soit trop importante lorsqu'on veut obtenir spécifiquement une monosubstitution. Néanmoins, des conditions raisonnables peuvent être envisagées pour obtenir majoritairement le composé monosubstitué dans un mélange, il suffit, pour cela de conduire la réaction dans les conditions générales suivantes :

- température 0°C,
- addition d'iPrAD à une solution de CD, PPh₃ et thiol (nucléophile).
- les quantités de PPh₃ et d'iPrAD sont variables selon les nucléophiles utilisés mais doivent toujours être en excès par rapport à la CD et au nucléophile dans le mélange réactionnel.

- L'addition de tamis moléculaire (4Å) entraîne une sélectivité en faveur de la monosubstitution (cas du thiophénol). L'action du tamis moléculaire n'est pas totalement claire à notre avis. Il est possible, cependant, que celui-ci joue un rôle sur la captation des molécules d'eau résiduelles dans le milieu, améliorant ainsi la cinétique de la réaction de Mitsunobu en faveur de la première étape de monosubstitution. Cependant, cet effet ne semble pas reproductible avec les autres thiols étudiés. Le rôle du solvant est difficilement discutable dans la mesure où des essais supplémentaires auraient été nécessaires uniquement pour évaluer l'influence de ce paramètre. Il semble néanmoins, en première approximation (cas du thiophénol), que la pyridine favorise la monosubstitution et que le DMA et le DMF favorisent plutôt la polysubstitution. L'utilisation de ces deux derniers solvants pourrait se révéler avantageuse lors de l'emploi de thiols peu réactifs tels que les monothiosaccharides ou pour la préparation de CDs persubstituées.

- En ce qui concerne l'azodicarboxylate : dans la majorité des cas étudiés, une addition unique de six équivalents d'iPrAD ne permet pas à la réaction d'évoluer (faible

proportion de produit monosubstitué observée). Par contre, une seconde addition d'un même nombre d'équivalents entraîne très rapidement la formation de dérivés polysubstitués. Il serait intéressant de suivre l'évolution de la réaction si la deuxième addition d'iPrAD n'était pas équivalente à la première mais inférieure.

- Temps de réaction : dans les réactions où la réactivité reste faible indépendamment des conditions employées, l'allongement du temps de réaction n'a aucun effet. D'une manière générale, des temps de réaction supérieurs à 24h sont inutiles.

- Globalement, la nécessité d'effectuer les réactions en présence d'un très large excès de réactifs conduit à formuler différentes hypothèses :

- Le PPh_3 , l'iPrAD ou l'un des intermédiaires qu'ils forment peuvent être piégés dans la cavité de la CD et de ce fait dans l'incapacité de réagir ce qui implique que seules les espèces libres participeraient à la réaction. Un exemple de l'inclusion d'un intermédiaire réactionnel a déjà été décrit dans la littérature. Ye *et al.* [234] ont montré que l'on pouvait suivre la formation et la décomposition, par spectrophotométrie, de l'intermédiaire réactionnel du couplage entre l'ion 4-toluène diazonium et la N,N-diméthylaniline en présence de β -CD. La complexation de cet intermédiaire dans la cavité de la CD bloque son accès au solvant ce qui ralentit la cinétique de la réaction et permet de détecter cet intermédiaire (Figure 115).

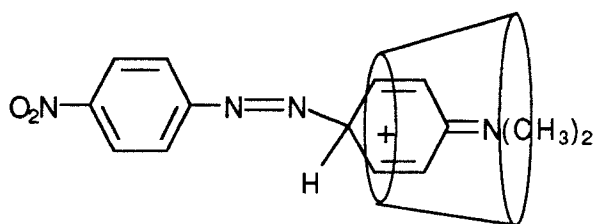


Figure 115 : Intermédiaire réactionnel piégé dans la cavité de la β -CD.

Ceci pourrait expliquer que l'utilisation d'une quantité de réactifs proche de la stoechiométrie 1:1 conduise dans tous les cas à une absence de réaction,

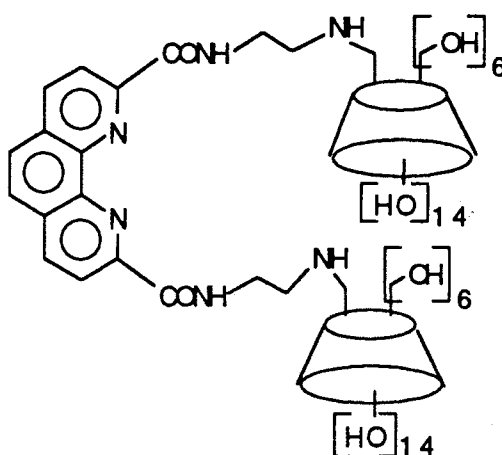
- L'utilisation d'un large excès de réactifs pourrait favoriser un mécanisme radicalaire aboutissant à la formation d'intermédiaires secondaires non réactifs. Dans ce cas une addition très lente de l'iPrAD au mélange réactionnel pourrait permettre de limiter leur formation en l'empêchant d'être en trop grand excès à un instant donné.

Le principal problème rencontré s'est avéré être la purification des mélanges complexes d'isomères. En dehors des conditions initiales, où seuls les dérivés monosubstitués étaient obtenus avec des rendements modestes, les autres conditions réactionnelles fournissent des mélanges complexes qui se sont révélés quasiment impurifiables par CLHP semi-préparative utilisant une silice greffée C18 d'où des rendements en produits isolés éloignés des rendements réels. Différents essais d'acétylation des mélanges n'ont pas permis un meilleur isolement des produits compte-tenu du nombre important de régio-isomères générés. L'utilisation de la CLHP analytique à polarité de phase inversée a parfois permis un isolement, en faible quantité, de l'un des constituants du mélange. Quelque soient les conditions chromatographiques, les chromatogrammes ont montré une faible résolution du fait de la présence des différents régio-isomères correspondant à un même degré de substitution. L'emploi de diverses silices greffées (phényl, diol) n'a pas permis d'améliorer la séparation.

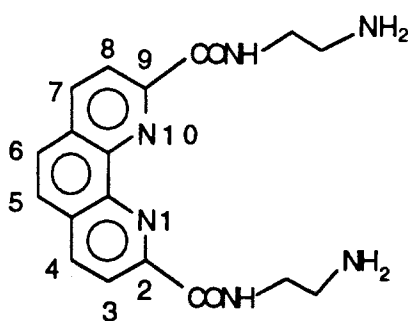
Par ailleurs, du point de vue de la méthodologie, il pourrait être intéressant de savoir si une persubstitution directe de la face des hydroxyles primaires de la CD peut être obtenue par cette méthode. Au cours de notre étude, même dans les conditions où elle aurait pu être théoriquement atteinte, jamais elle n'a été observée. Le degré maximum de substitution atteint est de quatre substituants par CD (2-mercaptobenzothiazole). L'hypothèse que les intermédiaires réactionnels soient trop volumineux pour réagir avec les hydroxyles de la CD dès que les premières substitutions ont eu lieu peut être avancée. Dès lors l'utilisation d'un dicarboxylate et d'une phosphine moins encombrés pourrait permettre d'atteindre cet objectif. L'emploi de tels composés dans les conditions étudiées précédemment, seraient, dans des conditions appropriées, susceptibles de favoriser une monosubstitution en améliorant la cinétique de la substitution pour la première molécule de nucléophile engagée.

Enfin, poursuivre l'étude des conditions de la réaction de Mitsunobu pour optimiser la fonctionnalisation directe de la β -CD avec les groupements thio-méthyl, thio-allyl et les thio-monosaccharides reste intéressant. En effet, ces composés peuvent ouvrir une nouvelle voie de fonctionnalisation des CDs et permettre ainsi d'atteindre d'autres intermédiaires-clé pour la chime des CDs.

2- Etude de la réaction de Mitsunobu avec une amine : Cas de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2**, synthèse de la bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis (1-carbox-amidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38**

**38**

*α- Synthèse de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2***

**2**

Deux voies de synthèse ont été utilisées pour préparer le 2,9-bis-(carbométhoxy)-1,10-phénanthroline **8**, précurseur de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2**. D'abord celle décrite par WANG *et al.* [235] qui permet d'obtenir le diester **8** en une seule étape à partir de la néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) (Figure 116).

La réaction s'effectue dans la pyridine anhydre, à reflux, en présence de dioxyde de sélénium. Le résidu obtenu est directement estérifié. Un mélange de mono et diester

est obtenu et purifié par chromatographie sur colonne d'alumine. Le rendement en diester **8**, obtenu par cette méthode est très faible (de l'ordre de 4%). Nous avons donc utilisé la synthèse décrite par CHANDLER *et al.* [236]. Cette méthode, plus longue, a l'avantage de fournir des rendements relativement élevés à toutes les étapes et de ne pas nécessiter de purification chromatographique (Figure 116).

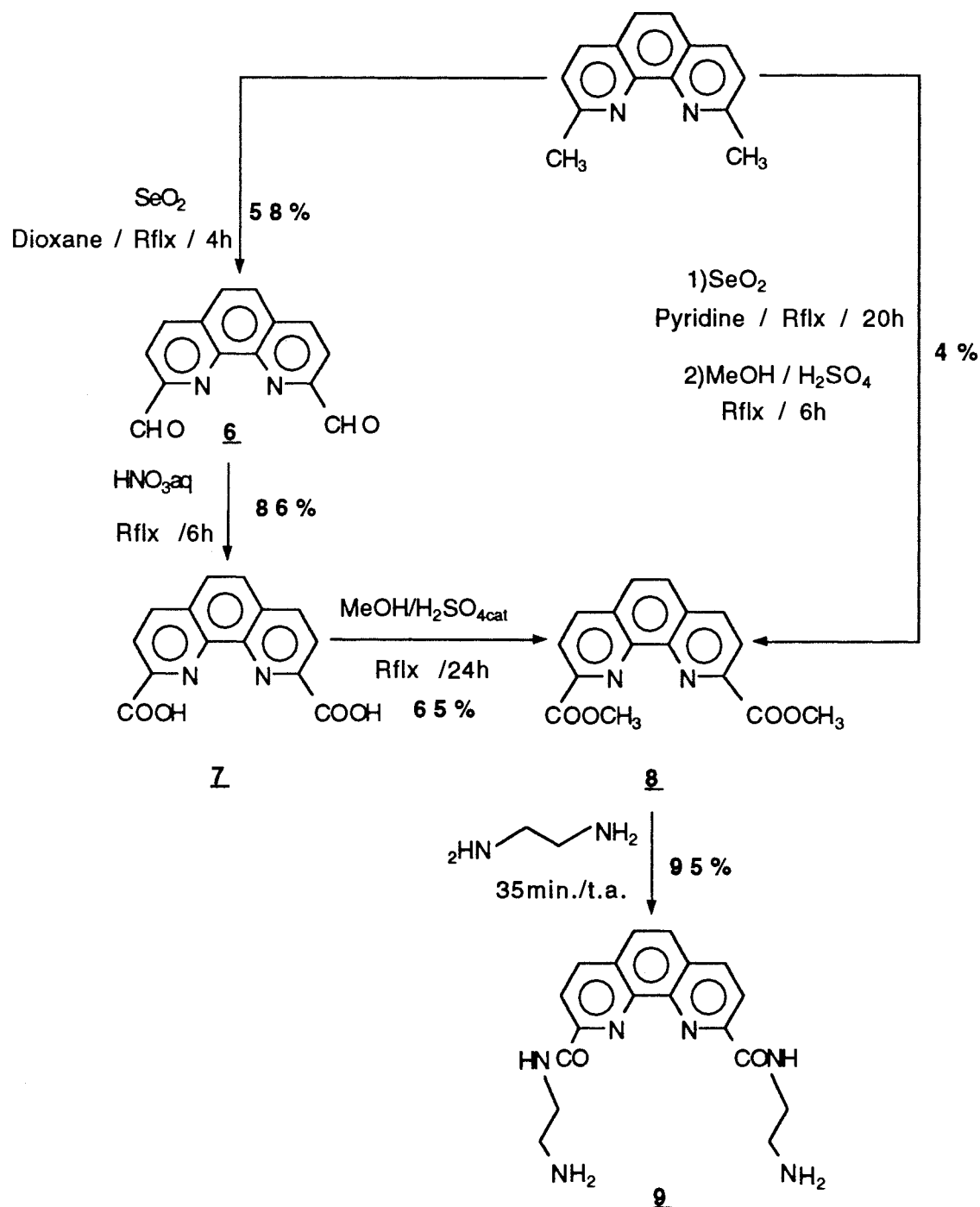


Figure 116 : Synthèse de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline

La 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxaldéhyde **6** est obtenu par oxydation de la néocuproïne par le dioxyde de sélénium dans le dioxane à reflux pendant 4h. Le sélénium formé est séparé par filtration sur célite. Le dicarboxaldéhyde **6** est obtenu avec un rendement de 58%.

L'acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique **7** est obtenu par oxydation du dicarboxaldéhyde **6** par l'acide nitrique à reflux, avec un rendement de 86% après recristallisation dans le méthanol, puis estérifié dans le méthanol pour fournir la 2,9-bis-(carbométhoxy)-1,10-phénanthroline **8** avec un rendement de 65%. Le rendement global de la réaction est de 32% à partir de la néocuproïne.

La 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **9** est préparée par aminolyse du diester **8** dans l'éthylène diamine, à température ambiante, pendant 35 minutes. Après évaporation de l'excès d'éthylène diamine, le composé **9** est précipité par addition d'éther. Le rendement est de 95%. Le spectre de masse (IE) montre un ion pseudo-moléculaire à 353 $[M+H]^+$ et l'analyse élémentaire révèle la présence de deux molécules d'eau dans la molécule. Le spectre d'absorbance UV/vis. (H_2O) montre deux maxima à 234 et 284nm. Les coefficients d'absorption molaire correspondants sont respectivement de 32570 et 19806 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ donc relativement élevés.

*b- Couplage à la β -CD native : Synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38***

Le couplage de la β -CD native à la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** a été effectué dans différentes conditions (Tableau 33).

Tableau 33 : Conditions de réaction utilisées pour le couplage de la β -CD à la diamine **2**

Exp	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	2 (éqs)	Solvant	Conditions particulières	substitution		
						n=1	n=2	n≥3
1	12	4x6 éqs	6	DMF- 125mL	24h	±	-	-
2	12	4x6	6	DMF 65mL	24h	±	-	-
3	12	1x36	6	DMF	7h-obscurité	++	++	++
4	18	1x9	3	DMF	1,5h-obscurité	++	+	-
5	18	1x6	3	DMF	2,5h-obscurité	++	+	-
6	18	1x6	3	DMF	2,5h-obscurité-ordre d'addition modifié	+	±	-
7	18	1x6	3	DMF	2,5h-obscurité- toluène	Pas de réaction		

Les premières réactions (Exps 1,2,3), effectuées en milieu dilué pour tenter de solubiliser la diamine **2**, ont échoué. La β -CD est retrouvée inchangée après 24h de réaction, même en utilisant un très grand excès de réactifs. Le fait que la diamine **2** soit entièrement solubilisée ne compense pas la grande dilution du milieu ce qui explique cette faiblesse réactionnelle. Les conditions utilisées pour les réactions suivantes nous ont permis de mettre en évidence l'importance de l'ordre d'addition des réactifs et le fait que la solubilisation complète de la diamine **2** n'était pas indispensable à la réaction (une solubilisation très partielle est suffisante). En effet, lorsque la diamine **2** est mise d'abord en suspension dans le DMF et que tous les autres réactifs sont ajoutés ensuite (l'iPrAD est ajouté goutte à goutte à une solution de tous les autres constituants du mélange), une polysubstitution apparaît rapidement (cas des exps 3,4,5). Par contre, l'expérience 6,

réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience 5, mais où la diamine **9** est ajoutée après la CD et le PPh₃ au DMF, ne montre, pour un temps de réaction identique, qu'une très faible proportion de CD monosubstituée. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par une solubilisation partielle de la diamine **9** lorsqu'elle est ajoutée au solvant avant tous les autres réactifs.

En présence de toluène (Exp 7), aucune réaction n'est observée. La même hypothèse que celle émise dans le cas du benzothiazole peut être avancée.

Le dimère **38** est synthétisé dans les conditions suivantes (Exp 5) (Figure 117).

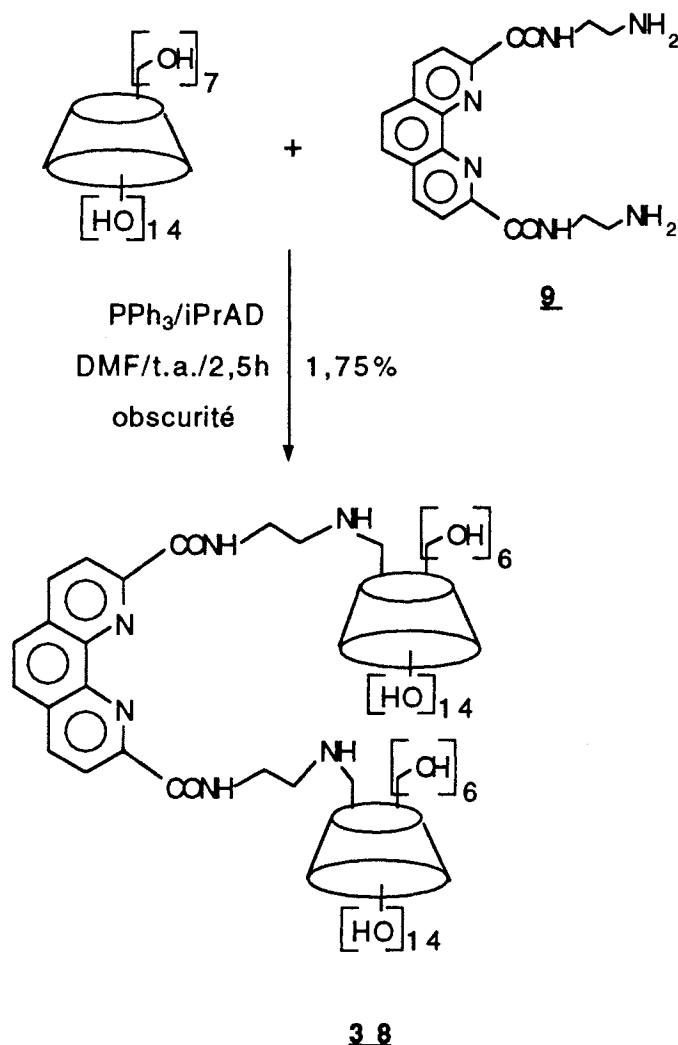


Figure 117 : Schéma de synthèse du dimère **38**

Après purification et séparation chromatographique, le dimère **38** est obtenu avec un rendement de 1,75%. Le dimère **38** s'est révélé très difficile à purifier. En effet, sur

silice greffée C18, le composé est fortement retenu. L'utilisation de la CLHP analytique à permis de définir les conditions chromatographiques optimum à la purification du dimère **38** mais ces conditions n'ont pas pu être retranscrites avec la même efficacité lors du passage en mode préparatif. Cette difficulté supplémentaire n'a donc pas permis un isolement correct de ce dimère. En effet, comme précédemment, seule une fraction réduite de dimère est éluée, la grande majorité n'est éluée que lentement et en mélange en présence de méthanol pur.

Nous avons aussi tenté de purifier ce dimère par gel-filtration sur Séphadex LH-20 (éluant : DMF / eau). Aucune séparation n'est obtenue. La chromatographie par échange d'ions pourrait peut-être fournir de meilleurs résultats.

Le spectre de masse (FAB^+) révèle un ion pseudo-moléculaire à 2657 $[\text{M}+\text{H}+3\text{Na}]^+$ et un ion à 2464 que l'on peut attribuer à la rupture de sept groupements hydroxyles. La RMN a été réalisée afin de tenter d'attribuer tous les protons de la molécule.

Dans les conditions utilisées, seul le dimère est obtenu, le monomère correspondant n'est pas isolé (les conditions pour le pontage d'une seule CD par la diamine **9** ne sont pas réunies).

II- La réaction de Mitsunobu avec la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21**

En réalisant la réaction de Mitsunobu sur la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21**, nous avons voulu savoir si la réaction se déroulait de la même façon qu'avec la β -CD native et s'il était possible d'améliorer, dans ces conditions, le rendement de la réaction de monosubstitution étant donné que tous les hydroxyles de la β -CD sont protégés.

1- Synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21**

La (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** a été synthétisée d'après une méthode décrite dans la littérature [24]. Elle est obtenue en trois étapes à partir de la β -CD native (Figure 118).

La réaction de tritylation de la β -CD native s'effectue dans la pyridine anhydre à température ambiante, en présence de chlorure de trityle. Après purification, la 6-O-trityl-cyclomaltoheptaose **19** est obtenue avec un rendement de 39%.

La monotrityl- β -CD **19** est méthylée par l'iodure de méthyle en présence d'hydruure de sodium, dans le DMF, à température ambiante pendant 24h. La (2,3-di-O-méthyl-6-O-trityl)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **20** est obtenue avec un rendement de 77%. Sa structure a été vérifiée par RMN ^{13}C . Le composé **20** est ensuite détritylé dans le chloroforme par l'acide chlorhydrique concentré pendant 30 minutes à température ambiante. La (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** est obtenue avec un rendement de 85% après purification.

Le spectre de masse (FAB^+) du composé **21** montre un ion pseudo-moléculaire à 1437 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

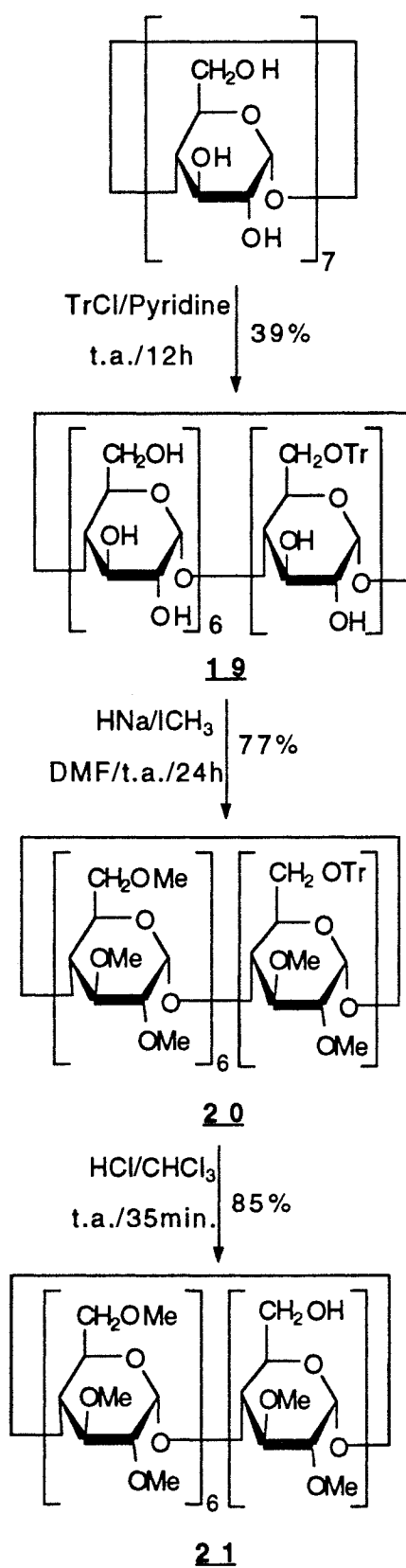


Figure 118 : Schéma de synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21**

2-Etude de la réaction de Mitsunobu en fonction du solvant et du nucléophile

Les tentatives de couplage de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** avec la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** dans les conditions de la réaction de Mitsunobu afin d'obtenir un dimère de CDs analogue au dimère **38**, ont permis de mettre en évidence l'influence du solvant.

Différents essais de couplage du composé **2** avec le composé **21** ont été réalisés dans le DMF, le THF ou la pyridine anhydre (à l'abri de la lumière). Aucun couplage n'a été observé même après 24h de réaction (Tableau 34)

Tableau 34 : Différentes conditions de réaction utilisées pour le couplage de **2** et **21**

	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	2 (éqs)	Solvant	Temps	Résultat
1	12	2x6	6	Pyridine	24h	-
2	12	2x6	6	DMF	24h	-
3	12	2x6	6	THF	24h	-
4	18	1x12	6	DMF	24h	-
5	12	1x12	6	DMF/Toluène	3h	31a
6	36	1x36	6	Toluène	4h	31a

Dans l'hypothèse où ce manque de réactivité proviendrait d'une quantité insuffisante de réactifs (comme nous l'avons déjà observé dans la préparation du dimère **38**), nous avons effectué une réaction dans le DMF, où l'excès de PPh₃ était encore augmenté (Exp 4) et où les douze équivalents d'iPrAD étaient ajoutés en une seule fois. Là encore, après 24h, aucun couplage n'est observé. Dans les expériences 5 et 6, le toluène a été utilisé soit en quantité stœchiométrique (1:1) par rapport à la CD soit comme solvant de réaction. Dans les deux cas, la c.c.m. montre rapidement la disparition totale du produit de départ **21** et la formation d'un composé unique. Ce composé a pu être isolé, purifié par chromatographie et analysé.

Les résultats ont montré qu'il s'agissait d'un produit secondaire (**31a**) issu de la condensation entre **21** et l'iPrAD ou entre **21** et la diisopropyl hydrazine dicarboxylate, produit de réduction de l'iPrAD. Ce résultat est possible dans la mesure où les réactifs

sont toujours présents en grand excès. La structure de ce produit secondaire est la suivante (Figure 119) :

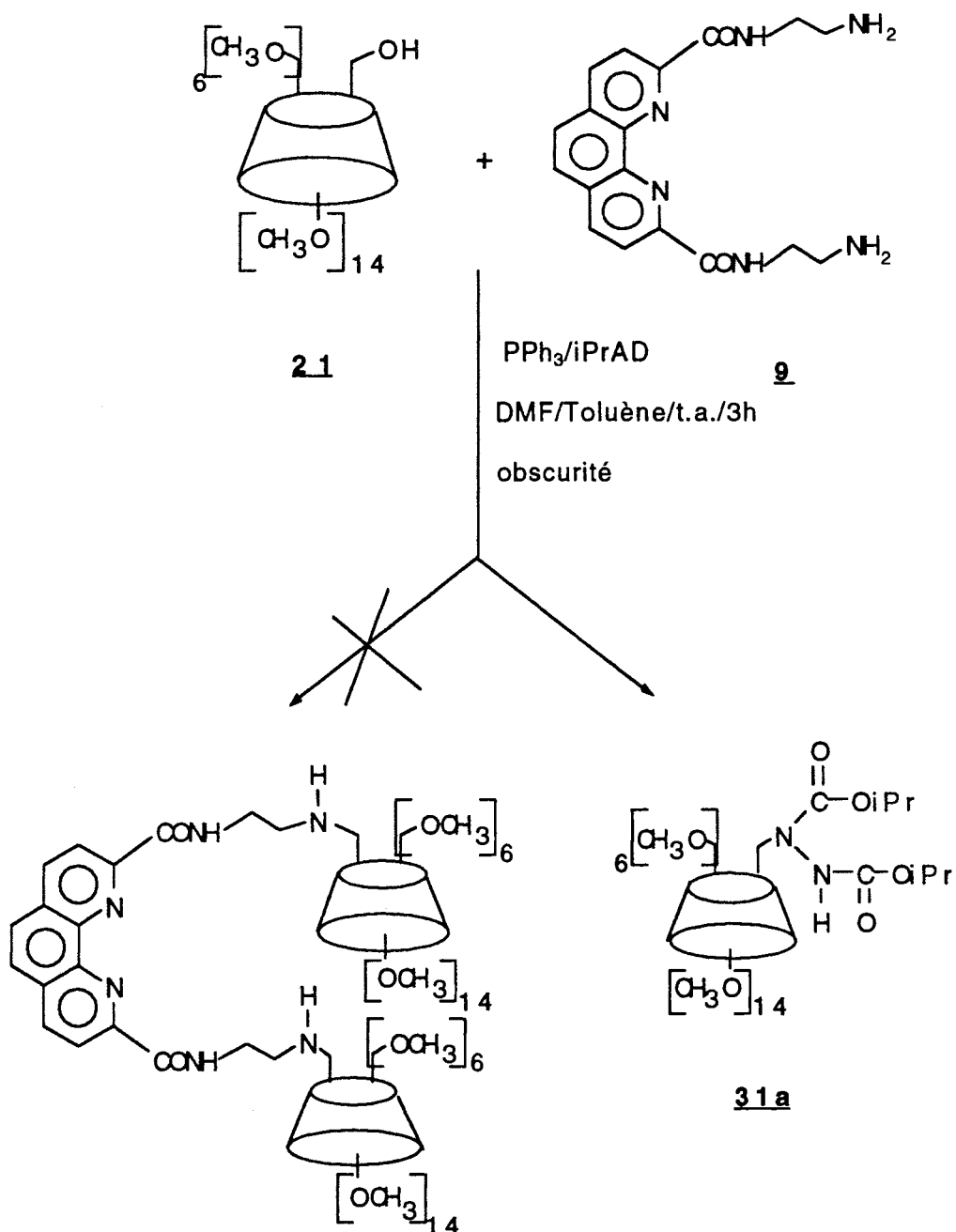


Figure 119 : Essai de couplage de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** avec la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **9**

Le spectre RMN ^{13}C du produit **31a** montre un signal à 155,9 ppm, caractéristique des liaisons carbamates et deux signaux à 22,4 et 36,3 ppm pouvant correspondre aux différents carbone du groupe isopropyl. Par ailleurs, le spectre infra-rouge de cette molécule ne possède pas de bande pouvant correspondre aux liaisons $\text{C}=\text{N}$ de la phénanthroline mais il existe une bande à 1718 cm^{-1} et à 1654 cm^{-1} pouvant correspondre à des groupements carbonyles.

L'analyse par spectrométrie de masse (FAB^+ et électrospray) et l'analyse élémentaire confirment la structure du produit secondaire. En effet, le spectre de masse (électrospray) révèle un ion à 1624 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et un ion à 1640 $[\text{M}+\text{K}]^+$ tandis que le spectre de masse FAB^+ révèle un ion pseudo-moléculaire à 1625 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Enfin, l'analyse élémentaire fournit les pourcentages suivants pour $\text{C}_{70}\text{H}_{124}\text{O}_{38}\text{N}_2$ (formule brute de la CD substituée par le dicarboxylate, **31a**) :

calc. :	C % : 52,46	H % : 7,74	N % : 1,75
trouv. :	C % : 52,48	H % : 7,90	N % : 1,92

Etant donné ces résultats et le fait que la diamine **2** s'était révélée réactive lors du couplage avec la β -CD native, nous avons voulu savoir si la réaction de thio-Mitsunobu s'appliquait à la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose **21**. Pour cela, nous avons utilisé le 2-mercaptobenzothiazole comme nucléophile, ce thiol s'étant révélé l'un des plus réactifs lors de notre précédente étude.

Différentes conditions de réaction ont été utilisées (Tableau 35), certaines ont permis la synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-déoxy-6-thio-(2-mercaptobenzothiazolyl))-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **31** (Figure 120). Toutes les réactions ont été conduites à l'abri de la lumière. A titre d'exemple, les conditions suivantes ont permis son isolement : à une solution de (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21**, dans le toluène, et sous atmosphère d'argon, sont ajoutés successivement le PPh_3 (12éqs) et le 2-mercaptobenzothiazole (6éqs). La réaction est protégée de la lumière puis de l'iPrAD (12éqs) est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé 2h à température ambiante. Le composé **31** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant éther de pétrole 70 / acétone 30) (Rdt : 50%).

Le spectre de masse (FAB^+) du composé **31** fait apparaître un ion pseudo-moléculaire à 1565 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et un ion à 1587 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

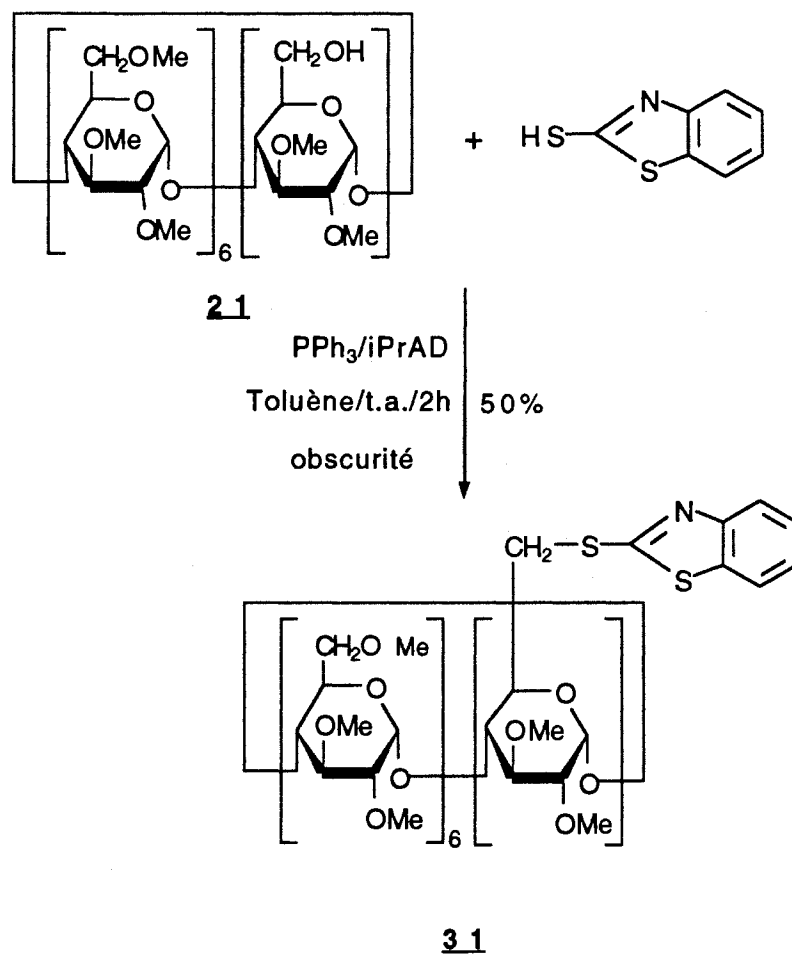


Figure 120 : Schéma de synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-déoxy-6-thio-(2-mercaptobenzothiazolyl))-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)cyclomaltoheptaose **31**

Tableau 35 : Conditions de réaction utilisées dans l'étude du couplage de **21** avec le 2-mercaptobenzothiazole

	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	Thiol (éqs)	Solvant	Temps	31
1	12	2x6	6	Pyridine	24h	-
2	12	2x6	6	DMF	24h	-
3	12	2x6	6	Toluène	4h	+
4	12	2x6	6	DMF/Toluène	4h	-
5	12	1x12	12	Toluène	2h	++
6	12	1x12	12	DMF/Toluène	3h	++
7	12	1x12	12	DMF	3h	+
8	12	1x12	12	Pyridine	1h	+
9	12	1x12	12	Pyridine/Toluène	1h	+
10	12	1x12	3	Toluène	1h	++

Comme dans le cas de la diamine **9**, il n'y a aucun couplage entre le 2-mercaptobenzothiazole et la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** dans la pyridine ou le DMF lorsque l'iPrAD est ajouté en deux fois (exps 1,2). Par contre, dans le toluène (Exp 3), après 4 heures de réaction, à température ambiante, la c.c.m. montre la formation du produit **31** (produit de départ **21** restant estimé à 50 %). Dans les mêmes conditions (Exp 4) en présence d'un équivalent de toluène par rapport à la CD, dans le DMF, aucune réaction n'est observée après 4 heures.

Afin de connaître l'influence du solvant et de l'addition d'un large excès d'iPrAD en début de réaction, plusieurs expériences ont été conduites en présence d'une seule addition de douze équivalents d'iPrAD (Exps 5,7,8,10), dans différents solvants (Toluène, DMF, Pyridine). Dans le toluène, la réaction est totale en 2 heures (exp 5) tandis que dans le DMF ou la pyridine (exps 7,8), au bout de 3 heures, il reste encore 50 % de produit de départ.

Dans l'expérience 10, effectuée dans le toluène avec seulement trois équivalents de 2-mercaptobenzothiazole, la réaction est totale en 1 heure. Dans l'expérience 3, avec deux additions successives de six équivalents d'iPrAD et malgré six équivalents de 2-mercaptobenzothiazole, dans le même solvant, le produit de départ n'est consommé qu'à moitié. Il faut donc en conclure que la quantité d'iPrAD présente au départ est un facteur important.

Au contraire de ce que nous avons observé avec la β -CD, l'addition en deux temps d'iPrAD n'apporte rien à l'évolution de la réaction. Il est nécessaire d'être en large excès de réactif dès le départ de la réaction.

Les expériences 6 et 9 réalisées, respectivement, dans le DMF et la pyridine, en présence de douze équivalents de tous les réactifs et d'un équivalent de toluène par rapport à la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** démontrent l'influence du toluène sur la réactivité. En effet, dans le cas du DMF, la réaction est totale en 3 heures et dans le cas de la pyridine, après 1 heure, 75 % environ du produit de départ est consommé. Les expériences 7 et 8 conduites dans les mêmes conditions mais sans toluène montrent une disparition du produit de départ beaucoup moins importante. En présence de toluène, la réaction est donc favorisée et accélérée.

Cette étude nous a permis d'étendre de façon avantageuse la réaction de thio-Mitsunobu aux CDs protégées. Nous avons donc décidé de coupler le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4** à la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** (Tableau 36).

Tableau 36 : Essais de couplage entre la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** et le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**.

	PPh ₃ (éqs)	iPrAD (éqs)	4 (éqs)	Solvant	Temps	Résultat
1	12	1x12	6	Toluène	3h	31a
2	12	1x12	3	Toluène	2h	31a
3	12	1x12	15	Toluène	24h	-
4	12	1x12	15	Ether	24h	-

Quelques soient les conditions utilisées, il n'y a pas de couplage entre la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** et le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**. Dans le toluène, avec trois ou six équivalents de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**, seul le produit secondaire issu de la condensation du composé **21** avec l'iPrAD ou de son produit de réduction (**31a**) est isolé comme dans le cas de la diamine **2** (Figure 121).

En très grand excès de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**, aucune réaction n'est observée. Ce manque de réactivité peut être attribué à l'encombrement stérique créé par les groupes acétyls du galactose qui réduit l'accès à l'hydroxyle libre de la CD **21** et à la faible réactivité des monothiosaccharides par rapport aux thiols aromatiques. En effet, la formation du sel d'alcoxyphosphonium intermédiaire ne peut pas être mise en cause sinon le dérivé **31**, substitué par une unité 2-mercaptobenzothiazole n'aurait pas pu être obtenu.

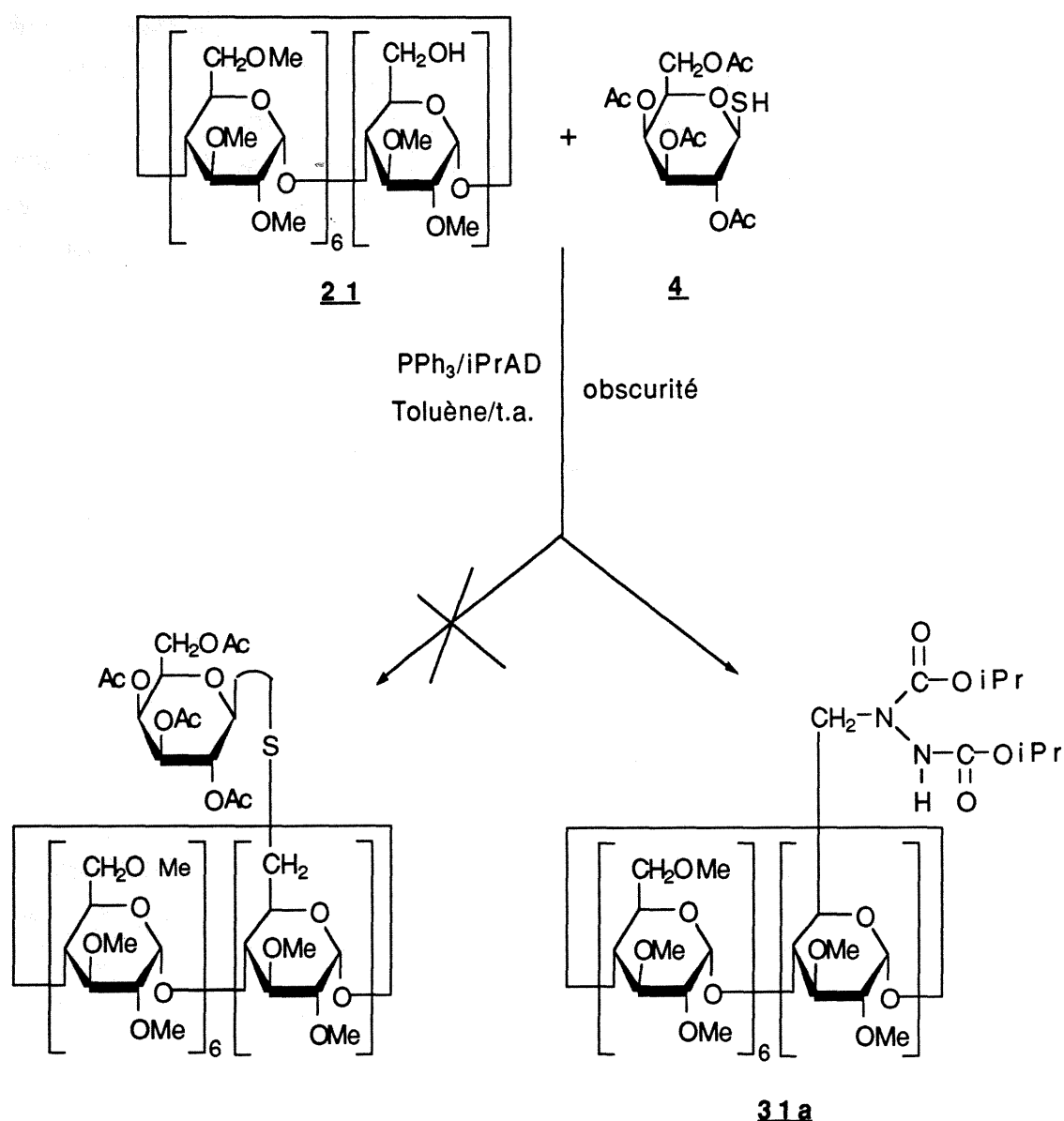


Figure 121 : Essai de couplage de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** avec le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4**

Conclusion :

Plusieurs différences de réactivité ont été observées entre la réaction avec la β -CD et la réaction avec la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose **21** :

- Influence du solvant : un solvant apolaire tel que le toluène permet le bon déroulement de la réaction alors que les solvants polaires, aprotiques sont moins favorables. Néanmoins, il est quand même nécessaire d'associer un large excès de réactifs (douze équivalents d'iPrAD) à la présence de toluène pour le bon déroulement de la réaction. Par ailleurs, l'utilisation d'une quantité stœchiométrique (1:1) de toluène par rapport à la CD dans un solvant polaire n'a pas d'effet sur la réactivité.

- Influence de la quantités d'iPrAD : tandis que dans le cas de la β -CD, deux additions d'iPrAD permettent à la réaction d'évoluer, avec la perméthyl- β -CD, il est nécessaire d'être en large excès de réactif au début de la réaction. Une deuxième addition d'iPrAD au milieu réactionnel n'a aucune influence sur l'avancement de la réaction.

Synthèse de CDs monosubstituées sur la face des hydroxyles secondaires

De nombreux travaux ont montré que les CDs, liées par liaison covalente à un fluorophore, pouvaient servir de sondes pour la reconnaissance moléculaire. En effet, la fluorescence propre du fluorophore est sensible au micro-environnement dans lequel il se trouve à un instant donné. En solution aqueuse, le fluorophore (en général, molécule aromatique organique) se situe à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la CD. L'addition d'un soluté susceptible de se complexer ("invité") dans la cavité de la CD, entre en compétition avec le fluorophore qui, en fonction de l'affinité et de la stabilité relative des complexes, change brutalement de micro-environnement. Ce phénomène se traduit par une modification du spectre de fluorescence. La sensibilité des mesures en fluorescence permet de connaître, à tout moment, l'état de l'équilibre fluorophore inclus $\leftrightarrow$ fluorophore non inclus par la mesure des variations du spectre de fluorescence.

Pour pouvoir disposer d'une sonde optique utilisable en biologie au niveau cellulaire, il faut une CD possédant à la fois un site de reconnaissance des récepteurs membranaires des cellules à cibler et un fluorophore ou un chromophore comme traceur d'événements.

Enfin, des CDs amphiphiles, substituées sur la face des hydroxyles secondaires, par un thio-galactose ont été préparées. Leur aptitude à la reconnaissance moléculaire a été étudiée par des mesures réalisées en monocouches (Langmuir-Blodgett). A notre connaissance, aucune étude en ce sens n'a été réalisée à ce jour concernant des CDs glycosylées sur la face des hydroxyles secondaires.

L'utilisation de ces outils d'investigation est le but des synthèses que nous décrivons ci-après. Toutes les synthèses décrites dans la suite de ce travail utilisent une peralkylsilyl-CD comme produit de départ. Ce composé est très soluble en milieu organique et permet de simplifier la mise en oeuvre des réactions et de faciliter les étapes de purification. D'autre part, la protection de tous les hydroxyles primaires de la CD permet la réaction exclusive des hydroxyles secondaires, moins réactifs.

I- Synthèse de l'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39**

L'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39** a été préparée d'après une méthode décrite dans la littérature [92] (Figure 122). La β -CD réagit avec dix équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle dans la pyridine anhydre à 0°C puis 12h à température ambiante. Les produits silylés sont précipités par addition d'eau au mélange réactionnel, le composé **39** est obtenu avec un rendement est de 74% après purification. L'utilisation de dix équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1,4 équivalent par unité glucose) est nécessaire pour compléter la réaction. Ceci provient certainement du taux d'anhydricité du milieu. En effet, nous avons pu remarquer que la présence d'eau dans le milieu inhibe totalement la réaction. Ceci implique de travailler en milieu parfaitement anhydre.

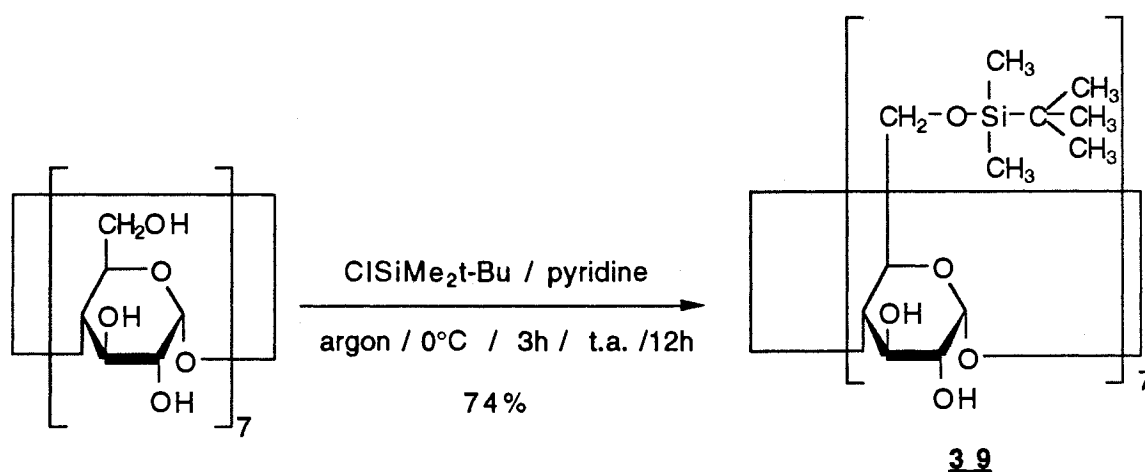


Figure 122 : Synthèse de l'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39**.

II- Couplage à partir de l'heptakis(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)-cyclomaltoheptaose **39**

1- Synthèse de l'heptakis[2-(1-(2-amino)éthylamino)-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)]- β -CD

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'heptakis(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-Tosyl)-cyclomaltoheptaose **39a**, tosylée sur tous les hydroxyles en position 2. Le but était de substituer ces groupements tosyls par une chaîne éthylène diamine puis de réaliser un couplage peptidique avec un fluorophore portant une fonction acide carboxylique sur une des fonctions amine primaires présentes (Figure 123). La CD **39a** a été préparée selon la méthode décrite par COLEMAN *et al.* [98]. La substitution des groupes tosyls s'est effectuée dans l'éthylène diamine, à 100°C pendant au moins 48h. Le mélange obtenu a été directement désilylé. La composition du résidu obtenu après la désilylation a été vérifiée par CLHP à polarité de phase inversée ce qui a permis de mettre en évidence un mélange complexe de nombreux produits de réaction de degrés de substitution différents. Quelque soient les conditions opératoires utilisées par la suite, notamment un allongement du temps de réaction et / ou une élévation de la température, il n'a pas été possible d'obtenir une persubstitution complète de la face des hydroxyles secondaires par l'éthylène diamine. Cette voie a donc été abandonnée par la suite au profit d'une méthode de substitution directe.

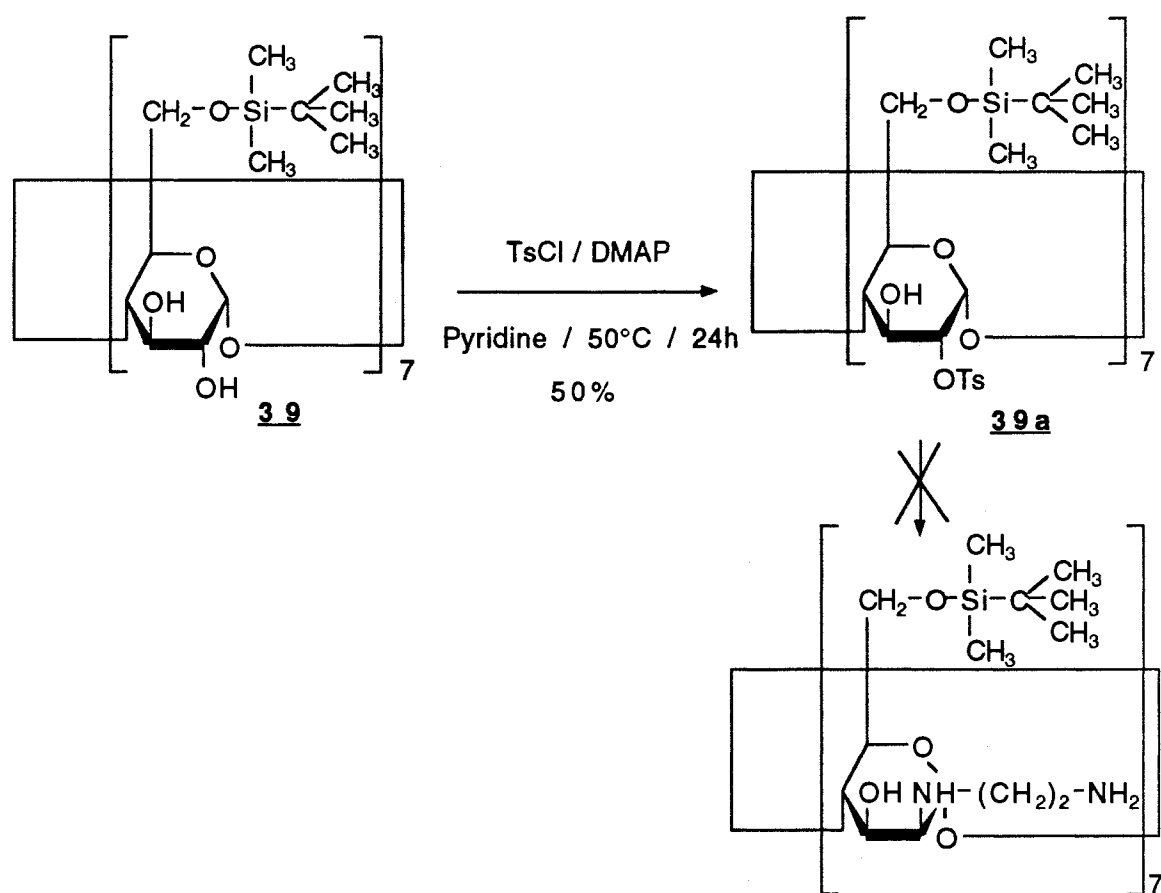
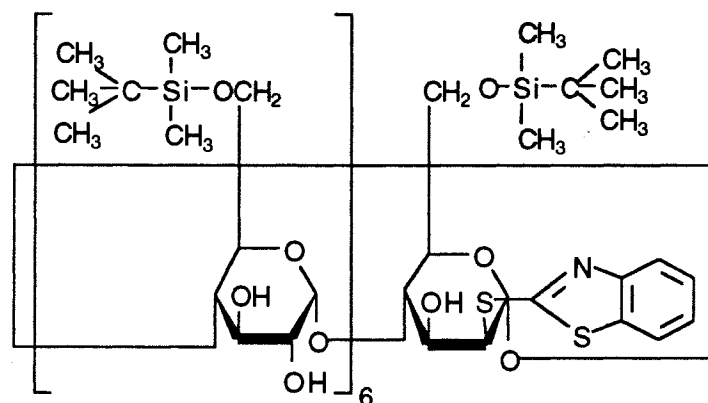
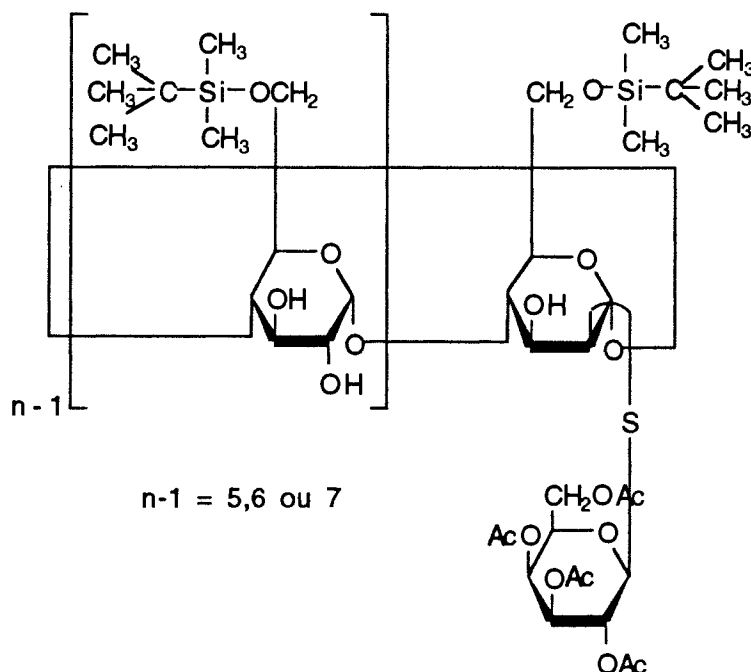


Figure 123 : Essai de substitution par l'éthylène diamine.

2- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD 40, des (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Per-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-CDs (41(α -CD), 42(β -CD), 43(γ -CD)) et de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD 44.



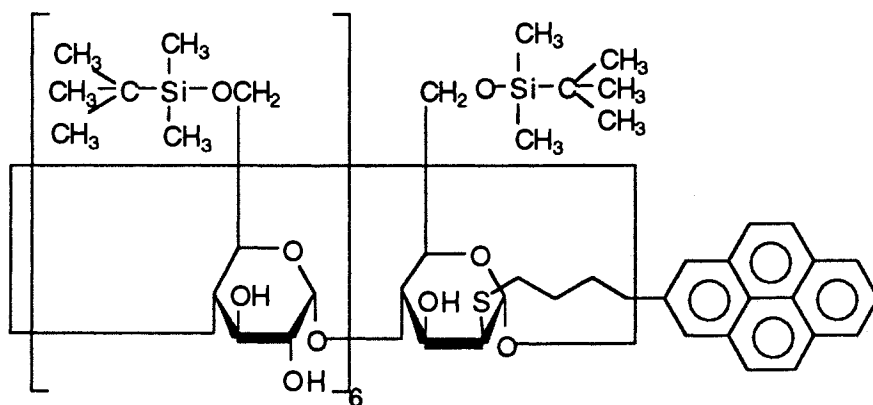
40



41 $n = 6$

42 $n = 7$

43 $n = 8$

**4.4**

En fonction des résultats obtenus avec la réaction de thio-Mitsunobu pour la fonctionnalisation des hydroxyles en position 6, nous avons décidé de tester la réaction sur les hydroxyles secondaires en positions 2 et 3, moins réactifs. La méthode peut constituer une nouvelle voie intéressante de fonctionnalisation directe de la face des hydroxyles secondaires de la CD par les thiols.

Deux types de molécules ont ainsi été obtenus :

- Des CDs monosubstituées sur la face des hydroxyles secondaires par une unité thiogalactose,
- Des CDs monosubstituées sur la face des hydroxyles secondaires par un chromophore ou un fluorophore.

*α- Synthèse des (2-déoxy-2-*S*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-thio-β-*D*-galactopyranosyl)-6-*O*-tert-butyl diméthylsilyl)-Per-(6-*O*-tert-butyl diméthylsilyl) CDs (**41**(α-CD), **42**(β-CD), **43**(γ-CD))*

Les composés **41**, **42**, **43** ont été préparés à partir des per-(6-*O*-tert-butyl diméthylsilyl)-CDs et du 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-thio-β-*D*-galactopyranose **4**, dans le THF dans les conditions de la réaction de Mitsunobu (Figure 124).

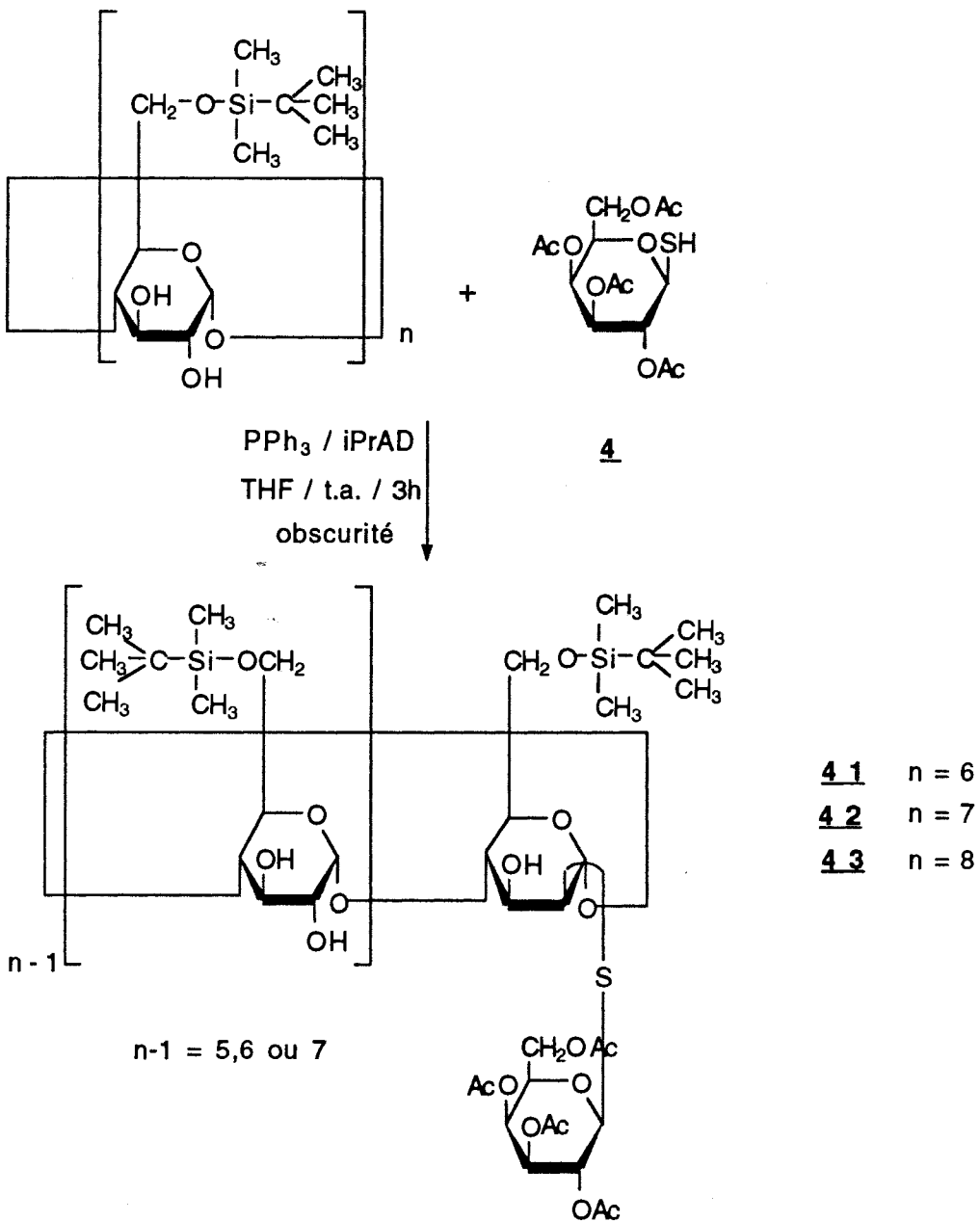


Figure 124 : Schéma de synthèse des composés **41**, **42**, **43**.

Les composés **41**, **42**, **43** sont obtenus par réaction des α -, β - ou γ -CD persilylées avec six équivalents de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose **4** (préalablement séché sous vide poussé pendant plusieurs heures) en présence de douze équivalents de triphénylphosphine et de diisopropylazodicarboxylate, dans le THF anhydre, pendant 3h à température ambiante. La réaction s'effectue, comme dans le cas des hydroxyles primaires, en milieu anhydre, sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière. L'addition d'éther au résidu d'évaporation du mélange réactionnel permet la précipitation d'une grande partie l'oxyde de triphénylphosphine et du diisopropyl

hydrazine dicarboxylate. Le mélange résultant est ensuite purifié par chromatographie pour fournir les composés **41**, **42** et **43** avec des rendements respectivement de 10, 17 et 9,5%. Ces rendements sont comparables à ceux obtenus précédemment sur l'hydroxyle primaire en position 6.

La structure des produits a été vérifiée par RMN ^1H 1D et 2D et par spectrométrie de masse (*e.g.* le composé **42** donne un ion-fragment à 2207 correspondant à M-4 acétyles de l'unité galactose).

Les tentatives de déacétylation de l'unité substituante galactose par la méthode de Zémplen n'aboutissent pas au produit de désacétylation désiré mais à la rupture de la liaison carbone-soufre et au retour au produit de départ. Une autre méthode de déacétylation est donc à envisager. En effet, il est possible que, compte-tenu des conditions basiques dans lesquelles s'effectue la réaction, les hydroxyles en position 3 soient ionisés. L'alcoolate formé peut alors attaquer le carbone en position 2 d'où la formation d'un époxyde par rupture de la liaison carbone-soufre. Ce dernier peut alors être ouvert par attaque nucléophile de l'eau présente dans le milieu.

*b- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)-Hexakis-(6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)- β -CD **40**.*

Le 2-mercaptobenzothiazole a montré une bonne réactivité dans les conditions de la réaction de Mitsunobu envers les hydroxyles primaires de la CD. Il était donc intéressant de l'évaluer dans le cas d'un alcool secondaire. La réaction est effectuée dans des conditions analogues à celles décrites pour les composés **41** à **43** à partir de l'heptakis-(6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)- β -CD **39** et en présence de douze équivalents de 2-mercaptobenzothiazole. La (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)-hexakis-(6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)- β -CD **40** est obtenue avec un rendement de 15% après purification (Figure 125).

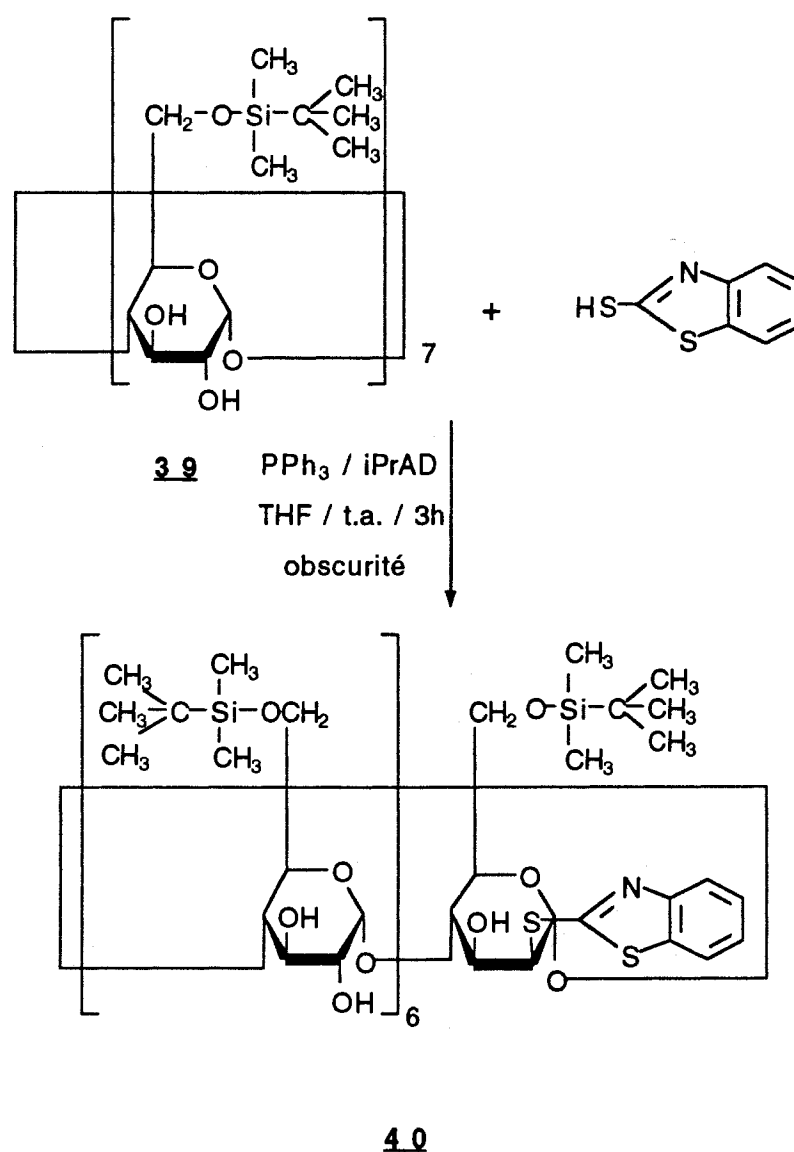


Figure 125 : Schéma de synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD

L'analyse par RMN ^{13}C du composé **40** confirme la substitution en position 2. En effet, le signal du carbone 2 se trouve à 81,4 ppm donc fortement déplacé vers les champs faibles par rapport au composé **39** de départ (vers 74 ppm). Le carbone 3 est au contraire déplacé vers les champs forts (70,6 ppm) par rapport à celui du produit de départ (73 ppm). Par ailleurs tous les signaux correspondants aux carbones aromatiques sont présents dans le spectre. Les déplacements chimiques de ceux-ci sont analogues à ceux observés lors de la substitution des hydroxyles primaires. Seul le signal correspondant au carbone aromatique lié à l'atome de soufre engagé dans la liaison

thioéther n'a pu être détecté. Le spectre de masse montre un ion à 2155 qui peut être attribué au composé **40** (complexe contenant 0,85 mole de dichlorométhane).

*c- Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)-Hexakis-(6-O-tert-butyl-diméthylsilyl)-β-CD **44**.*

Notre objectif étant de préparer une CD modifiée fluorescente, le pyrène a été choisi comme fluorophore. En effet, le pyrène est largement utilisé en biologie comme traceur fluorescent du fait de sa capacité à traverser la double couche lipidique de la membrane plasmique. De plus, la fluorescence du pyrène est très sensible au changement d'environnement.

Compte-tenu des résultats obtenus lors de la synthèse des composés **40** à **43**, c'est la même méthode de synthèse qui a été employée pour préparer le composé **44**. Cette fois encore, c'est un thiol qui a été utilisé pour la réaction de couplage à cause de la liaison thioéther qui est plus résistante aux enzymes. Nous avons choisi d'utiliser une molécule de pyrène substituée par une courte chaîne aliphatique de quatre carbone afin que le composé final **44** possède un bras espaceur augmentant la mobilité de la molécule de pyrène, et permettant ainsi la mise en évidence certains phénomènes de complexation des constituants de la membrane. Enfin, si l'on se place dans l'optique d'un transporteur de médicaments, ce type de composés peut permettre de comprendre où et quand est relarguée une molécule préalablement complexée dans la cavité de la CD.

• Synthèse du 1-(4-pyrène)-butanethiol **11**.

La préparation du composé **44** a nécessité, au préalable, la synthèse du 1-(4-pyrène)-butanethiol **11**. Ce composé est obtenu en deux étapes à partir du 1-(4-pyrène)-butanol *via* l'éthane thioate de 1-(4-pyrène)-butyle **10** (Figure 126).

L'éthane thioate de 1-(4-pyrène)-butyle **10** est obtenu par réaction du 1-(4-pyrène)-butanol avec l'acide thiol acétique dans le THF anhydre, en présence de quatre équivalents de triphénylphosphine et de diisopropylazodicarboxylate, 1h à 0°C puis 2h à température ambiante, sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière. Le composé **10** est obtenu avec un rendement de 75% après purification. La fonction thioester du composé **10** est ensuite réduite par l'hydruire d'aluminium et de lithium dans le THF à reflux pour fournir le 1-(4-pyrène)-butanethiol **11** avec un rendement de 85%.

Du fait de sa tendance à former des ponts disulfures, le composé **11** est utilisé rapidement et sans autre purification après son isolement.

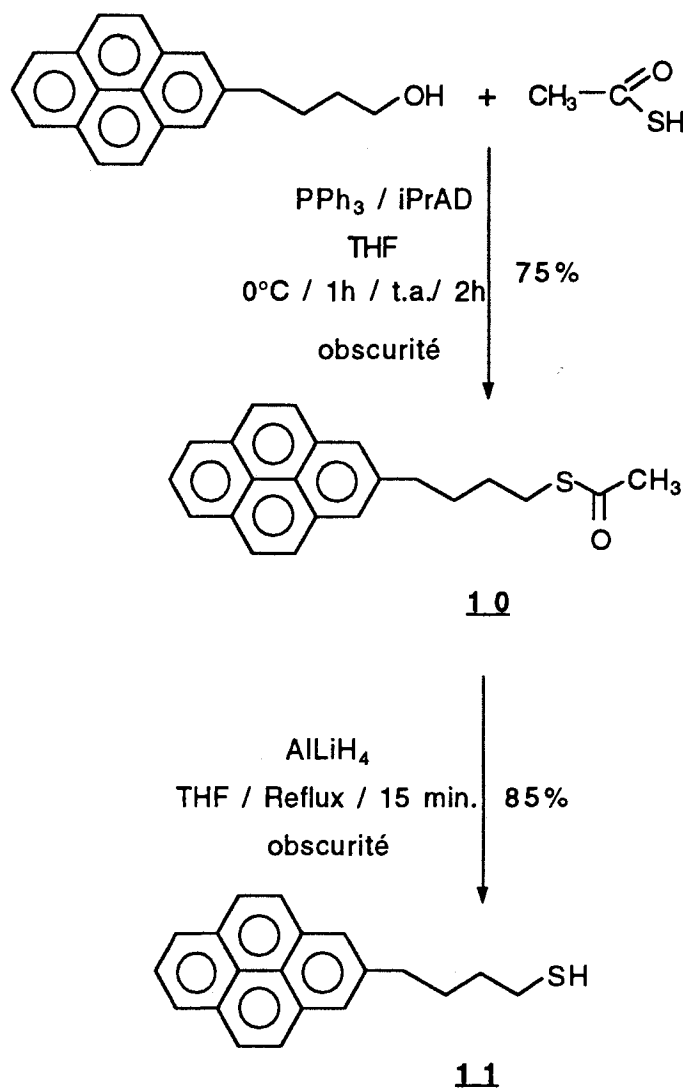


Figure 126 : Schéma de synthèse du 1-(4-pyrène)-butanethiol **11**

Les composés **10** et **11** ont été analysés par RMN ^1H et par spectrométrie de masse (IE). Le spectre de masse a permis de mettre en évidence l'absence de dimérisation du thiol **11**.

- Réaction de couplage à l'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39** : Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD **44**

La (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD **44** est préparée d'une manière analogue aux composés **40** à **43** à partir de l'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39** et de douze équivalents de 1-(4-pyrène)-butanethiol **11** dans le THF anhydre durant 24h (Figure 127). Le composé **44** a été isolé par chromatographie avec un rendement de 3%.

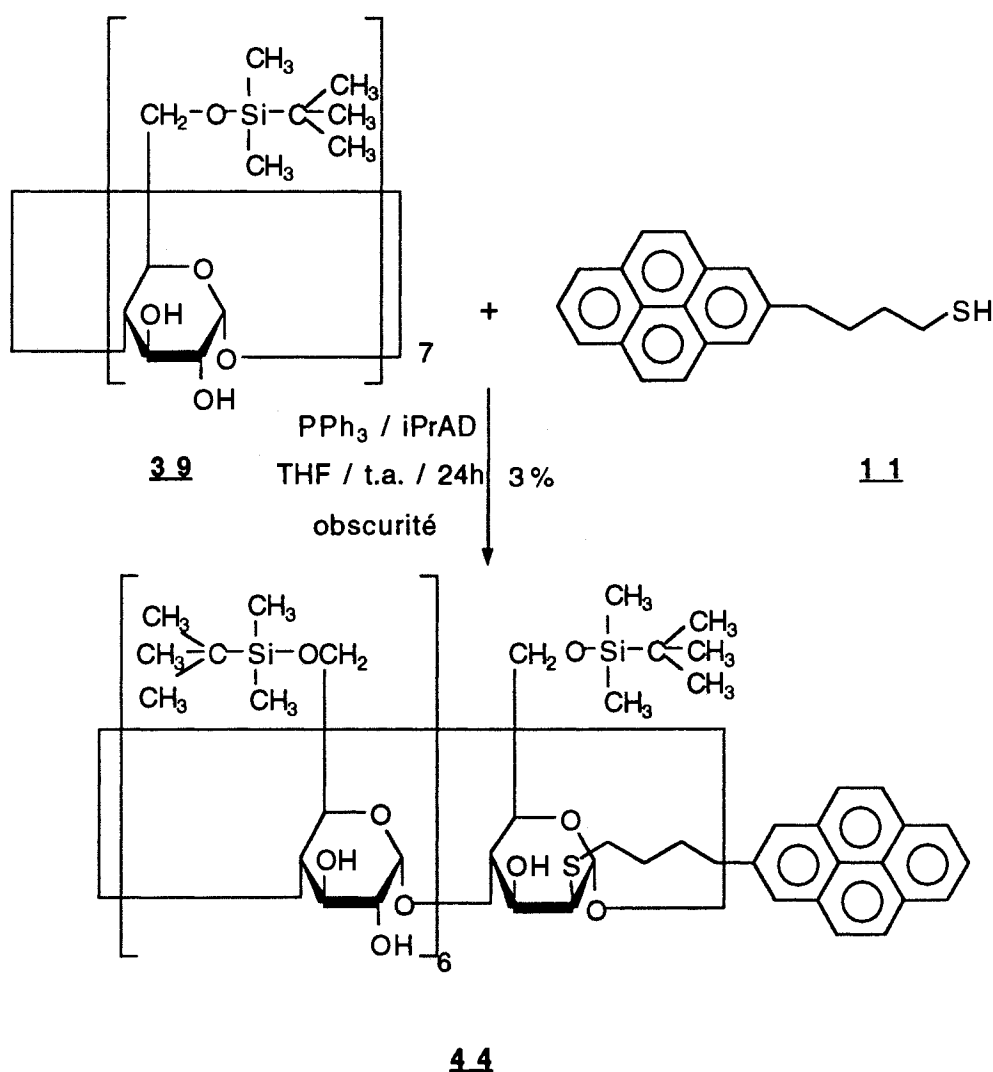


Figure 127 : Schéma de synthèse du composé **44**

Dans ce cas, la réactivité s'est révélée très faible par rapport à celle obtenue avec le 2-mercaptobenzothiazole et avec le monothiosaccharide **4**. L'augmentation du temps de réaction et de la quantité de thiol utilisée n'a pas permis d'améliorer le rendement de la réaction. La structure du composé **44** a été vérifiée par RMN ^1H dont le spectre est peu interprétable sans l'aide de la RMN 2D, mais présente des protons aromatiques et par spectrométrie de masse (FAB^+) dont le spectre révèle la présence d'un ion pseudo-moléculaire à 2206 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Conclusion :

Les rendements obtenus dans le cas de la substitution d'un hydroxyle secondaire ne sont pas optimisés et sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude avec les hydroxyles primaires. De la même façon, la présence de plusieurs hydroxyles en position 2 provoque la formation très rapide de nombreux produits de substitution et le produit de départ **39** n'est jamais entièrement consommé. Il est aussi possible que la réaction fournisse des produits secondaires. En effet, la réaction réalisée dans les mêmes conditions mais en l'absence de thiol conduit à plusieurs produits qui n'ont pas pu être identifiés. Néanmoins, il est possible d'émettre les hypothèses suivantes :

- Une réaction du diisopropylazodicarboxylate ou son produit de réduction sur l'alcool en position 2 (voir même cas avec les hydroxyles primaires),
- Une $\text{S}_{\text{N}}2_{\text{i}}$, par déplacement nucléophile et donnant des époxydes, selon le schéma réactionnel ci-après (Figure 128) :

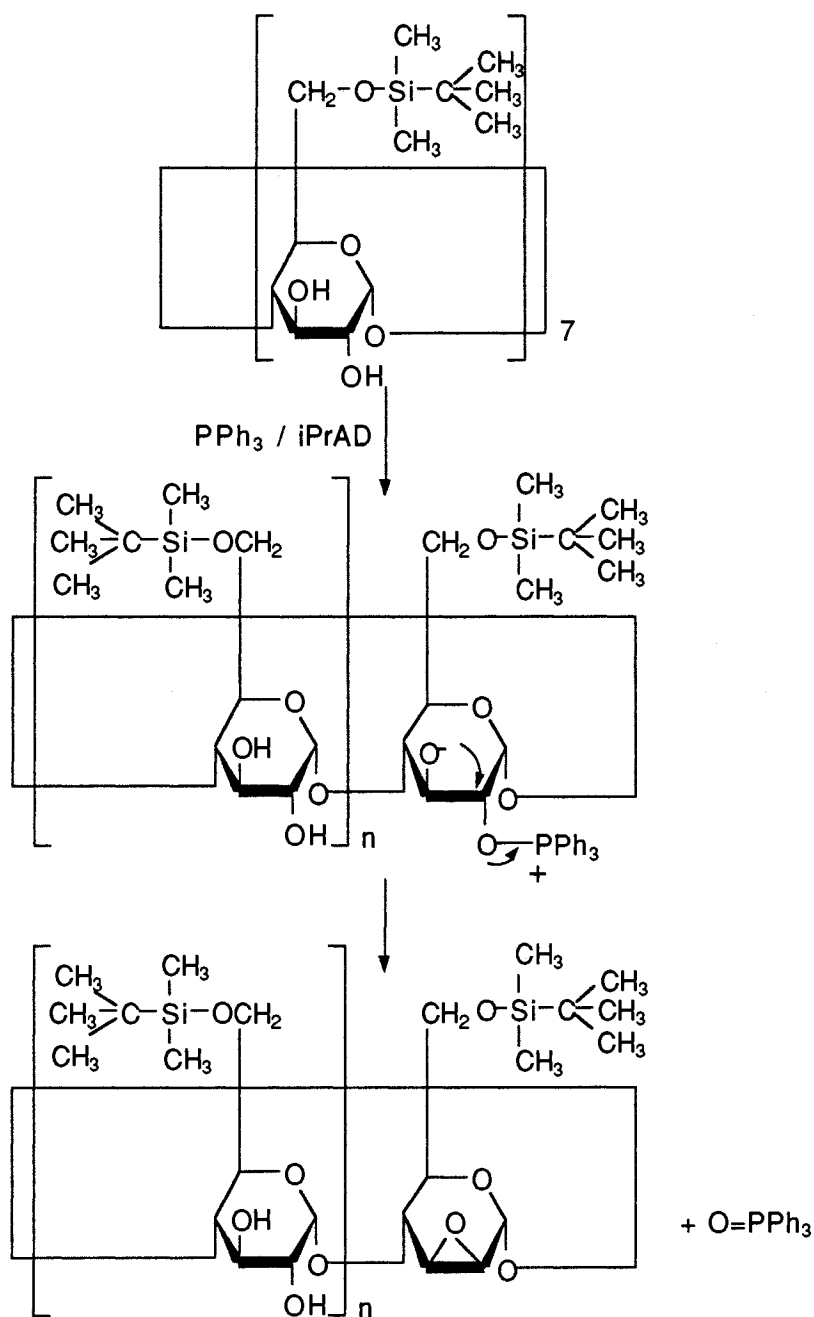


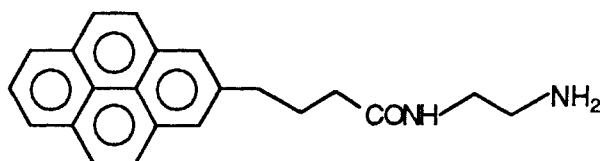
Figure 128 : Mécanisme de formation possible des époxydes.

La méthode de synthèse utilisée ici bien qu'ayant des rendements modestes, a l'avantage d'être directe et de fournir en une seule étape une CD thiosubstituée sur la face des hydroxyles secondaires en position 2. A notre connaissance, les méthodes directes de fonctionnalisation décrites jusqu'à présent dans la littérature, concernent essentiellement les liaisons éthers et non thioéthers. Par ailleurs, cette méthode bien que nécessitant, à l'évidence, des améliorations peut devenir une alternative aux synthèses

multi-stades déjà développées pour fonctionnaliser la face secondaire en position 2. En effet, la méthode la plus employée dans la littérature à ce jour consiste à monotosyler un hydroxyle en position 2, à faire l'époxyde correspondant puis à ouvrir cet époxyde par un nucléophile pour obtenir une CD substituée en position 3. L'étape de monotosylation comme dans le cas des hydroxyles primaires est limitante, son rendement est de l'ordre de 30%.

d- Couplage avec une amine primaire

Comme dans le cas de la réaction avec les hydroxyles primaires, nous avons tenté un couplage avec une amine primaire. Le N-(2-aminoéthyl)-4-pyrène butanamide **11b** a été synthétisé:



11b

La synthèse est présentée dans la figure 129. Lors de la réaction de couplage avec l'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose **39**, bien que la c.c.m. montre la formation d'un nouveau composé, il n'a pas été possible, pour l'instant, de l'identifier complètement.

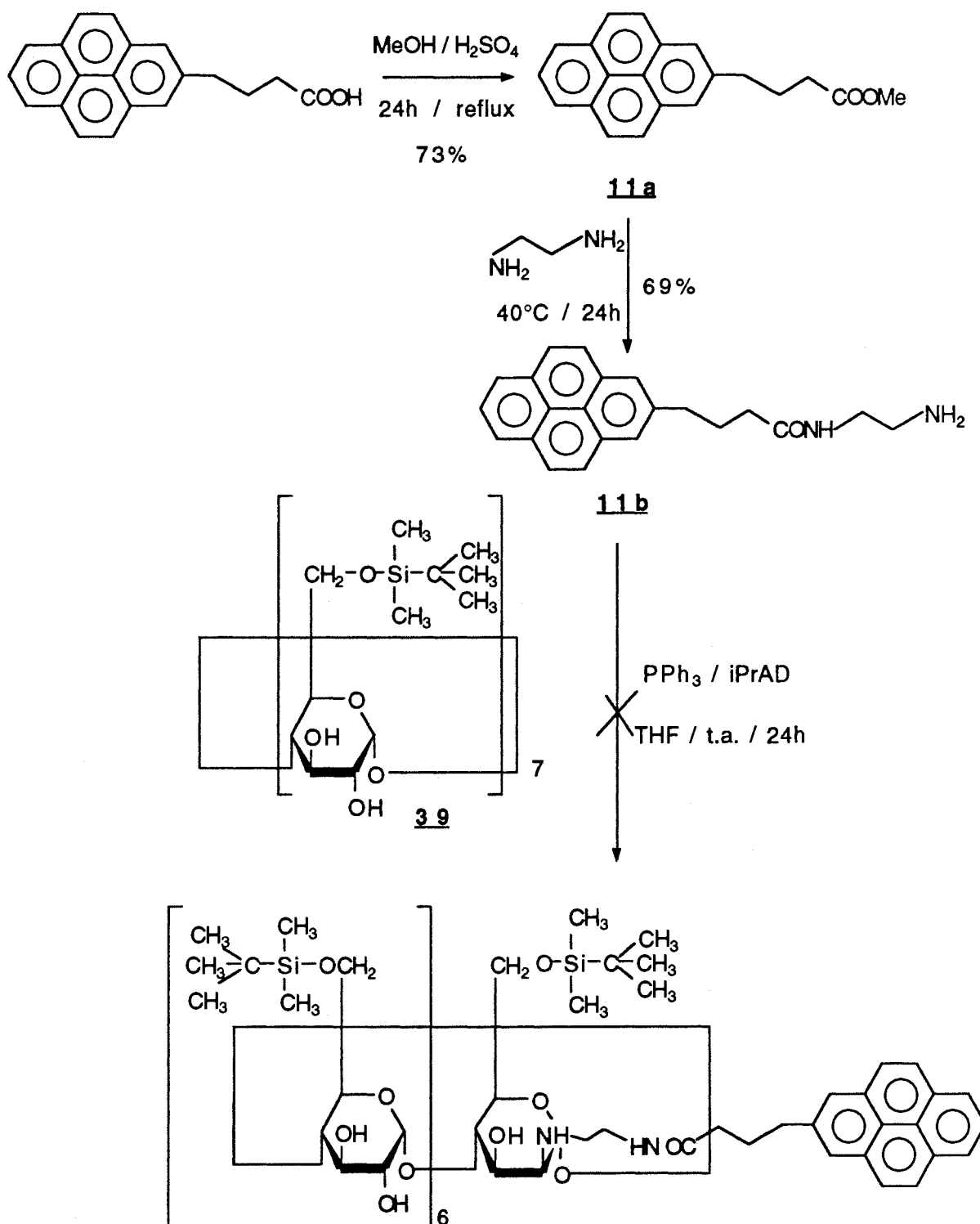


Figure 129 : Essai de couplage avec une amine

Synthèse de dimères de β -CDs

Cette synthèse a pour but d'obtenir des dimères de β -CDs possédant un site de coordination métallique associé à deux cavités hydrophobes par l'intermédiaire de bras espaceurs modulables. L'objectif de notre travail est d'élaborer des molécules, complexes métalliques, capables potentiellement de cliver les liaisons phosphodiester en particulier celles des acides nucléiques. Nous avons voulu ici élaborer un modèle d'endonucléase artificielle (Figure 130).

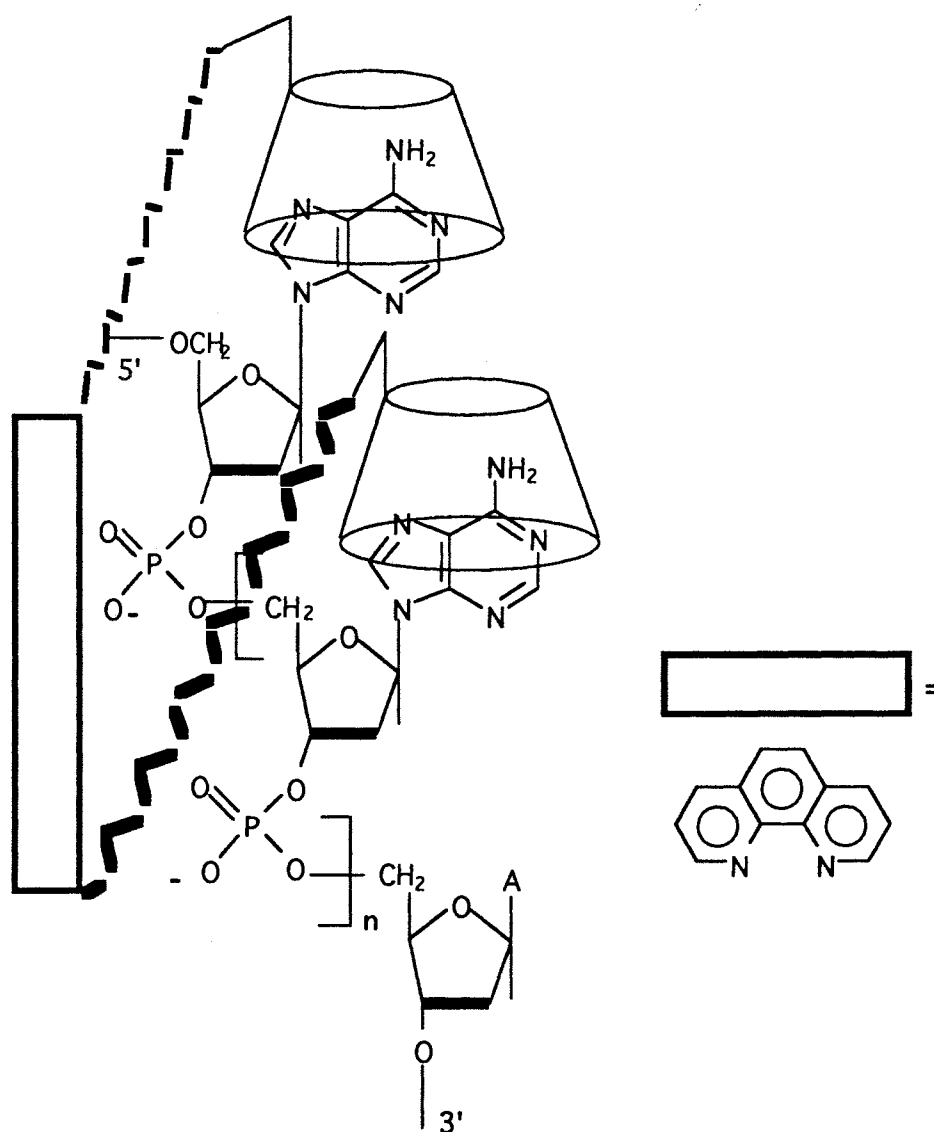


Figure 130 : Représentation schématique d'une endonucléase artificielle

Ce type de molécules peut aussi servir de transporteur de médicaments. En effet, il a récemment été montré par IKEDA qu'un groupe acridine substituant une CD (Figure 131) pouvait interagir avec la double hélice d'ADN lorsqu'une molécule "invitée" était complexée dans la cavité de la CD [237].

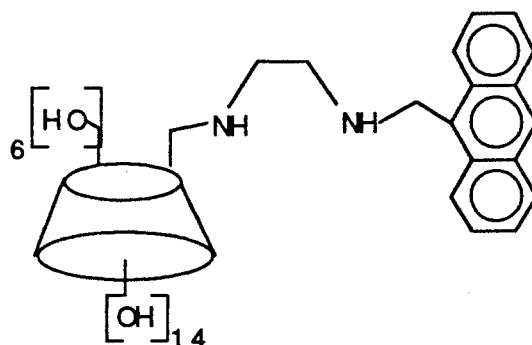


Figure 131 : Structure de la β -CD substituée par une acridine

Le noyau phénanthroline a été choisi comme site de coordination métallique. Les complexes de cuivre (II) de la phénanthroline et la 2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline sont déjà connus pour posséder une activité de type endonucléasique, ils coupent les liaisons phosphodiester de l'ADN double brin. Pour cela le noyau phénanthroline doit d'abord s'intercaler dans le petit sillon de l'ADN (voir p 128).

Différentes méthodes de couplage ont été effectuées pour obtenir ce type de dimère:

- Couplage peptidique de la 6-déoxy-6-amino-cyclomaltoheptaose [18] avec l'acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique **7**, (Figure 132)

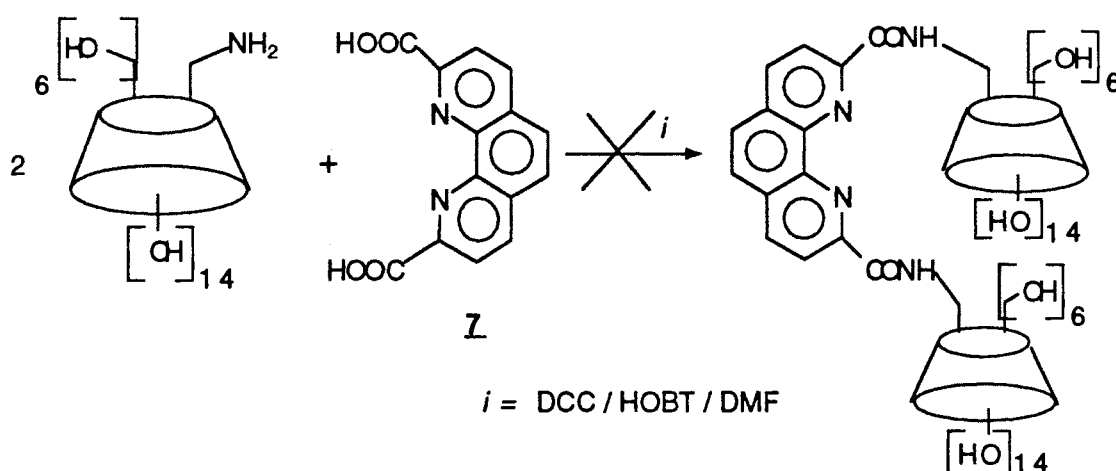


Figure 132 : Couplage de la 6-déoxy-6-amino-cyclomaltoheptaose avec l'acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique **7**

- Substitution nucléophile à partir de la 6-O-tosyl-cyclomaltoheptaose **12**, la (2,3-di-O-acétyl-6-O-tosyl)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose **13** ou la (2,3-di-O-acétyl-6-désoxy-6-iodo)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose **14** avec la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **9**. (Figure 133 et 134)

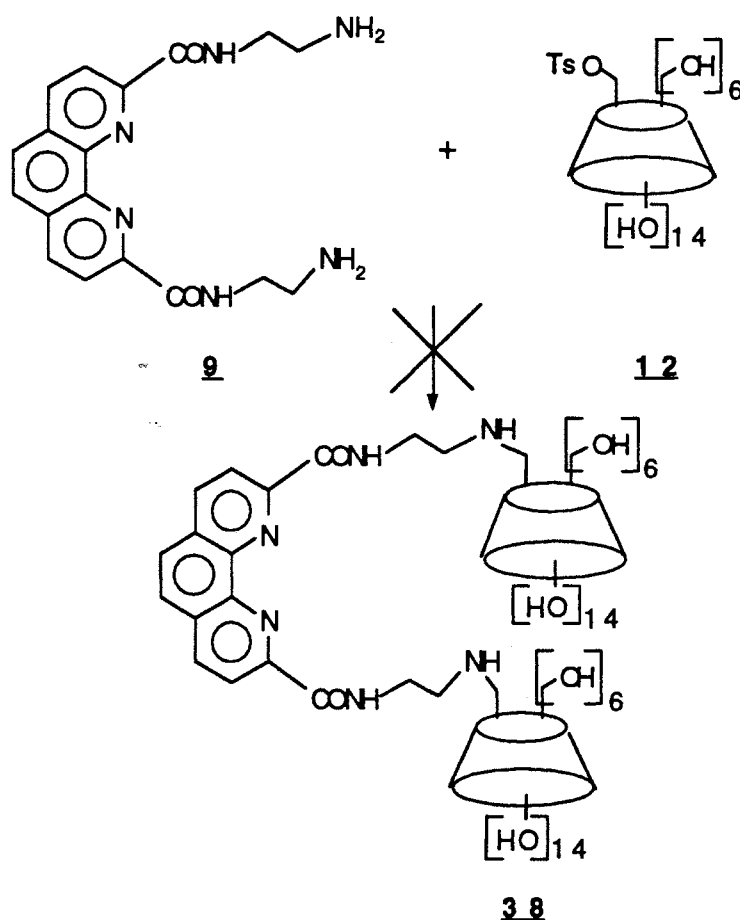


Figure 133 : Essai de couplage avec la 6-O-Tosyl-cyclomaltoheptaose **12**

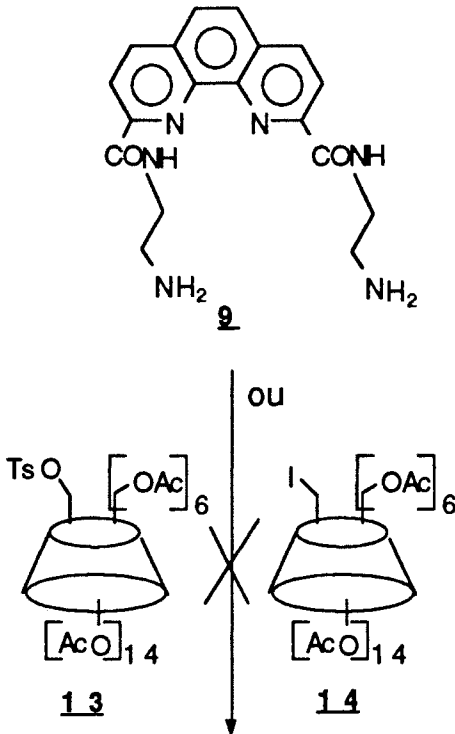


Figure 134 : Couplage avec la (2,3-Di-O-acétyl-6-O-tosyl)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose **13** ou la (2,3-Di-O-acétyl-6-désoxy-6-iodo)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose **14**

Mise à part la procédure le couplage peptidique dont la réactivité est très faible (Produit de couplage non isolable), les autres réactions n'ont pas permis d'obtenir de couplage, nous avons donc choisi une autre stratégie de synthèse.

I - Synthèse de dimères de β -CD via la réaction dite "phosphinimine"

- Généralités sur la réaction dite "phosphinimine"

Initialement, la synthèse de monosaccharides portant une fonction urée a été décrite par PINTER *et al.* [238, 239]. La réaction utilisée s'effectue en présence de triphénylphosphine (PPh_3) et de dioxyde de carbone (CO_2), à partir de l'azido monosaccharide en position anomérique et fait intervenir un intermédiaire phosphinimine. Cette étape est analogue à la réaction de Staudinger qui permet la réduction de la fonction azide en amine par le PPh_3 (Figure 135).

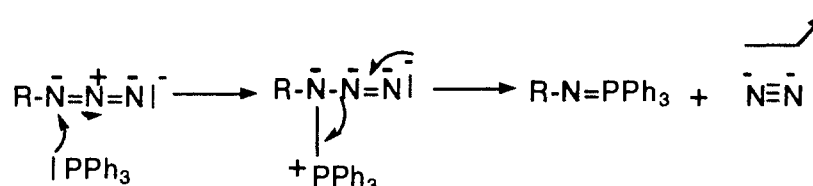


Figure 135 : Mécanisme de la réaction de Staudinger .

Le mécanisme de la réaction a été étudié récemment *via* les méthodes quantiques semi-empiriques (PM3, AM1) [240, 241]. Les calculs des différents états d'énergies des intermédiaires réactionnels proposés font apparaître un mécanisme plutôt en faveur d'un intermédiaire-clé isocyanate excluant un chemin passant par un intermédiaire oxycarbonylaminophosphonium théoriquement possible (Figure 136). L'étape de réarrangement de ce dernier est énergétiquement très défavorable ($\Delta E \approx 225 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), éliminant, de ce fait, une telle voie.

Bien que les premiers calculs aient été effectués dans le vide, ils ont été confirmés très récemment [242] en milieu solvant, et permettent d'établir la préférence d'une voie passant par un intermédiaire isocyanate pour cette réaction.

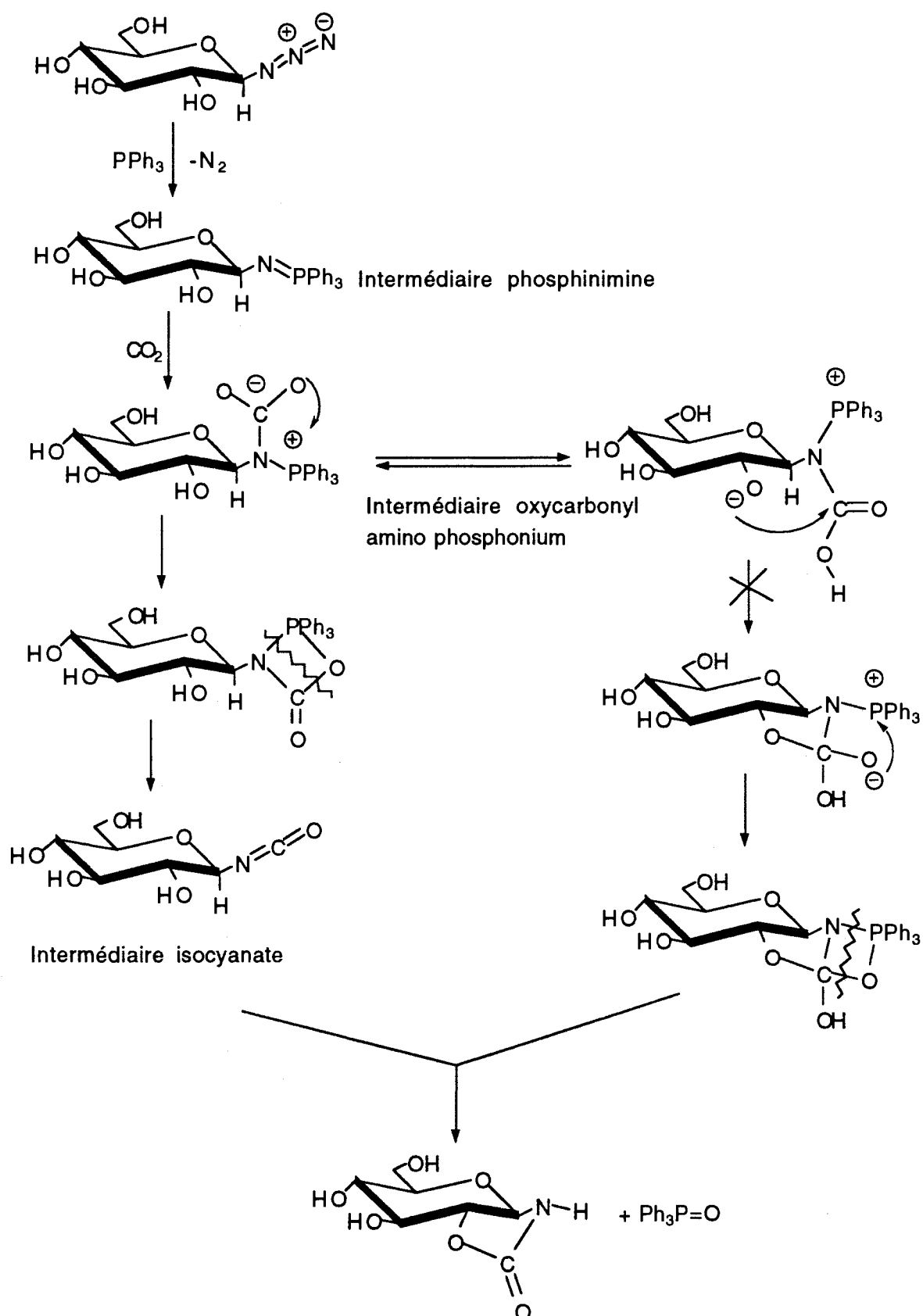


Figure 136 : Mécanisme de la réaction dite "phosphinimine" (anomère β)

La première étape est la réaction de la triphénylphosphine avec l'azidomonosaccharide qui fournit l'intermédiaire phosphinimine *via* la perte d'une molécule d'azote. Le dioxyde de carbone réagit sur la phosphinimine pour donner un intermédiaire oxycarbonyl amino phosphonium. Enfin, la perte d'une molécule d'oxyde de triphénylphosphine fournit l'intermédiaire isocyanate. La cyclisation finale amenant au carbamate cyclique se fait par attaque nucléophile intramoléculaire de l'alcoolate formé en position 2 (après transfert d'un proton sur l'azote de l'isocyanate) sur le carbone de l'isocyanate.

Nous avons décidé d'adapter cette réaction aux CDs. Dans ce cas, c'est l'hydroxyle primaire en position 6 qui doit réagir. La première synthèse a été effectuée dans les conditions décrites par PINTER *et al.* [239] et un dimère de β -CD ponté par une butanediamine (Figure 137) a été obtenu par condensation avec la butanediamine de la façon suivante : une solution de butanediamine dans le DMF anhydre est saturée par du dioxyde de carbone sec. Le carbonate d'ammonium formé précipite et l'azido-CD **32** est alors ajoutée puis une solution de PPh_3 . La réaction est laissée 24h à température ambiante. Après évaporation du solvant et l'isolation d'une quantité substantielle d'un polymère de butane diamine, le résidu est acétylé et séparé par chromatographie. Ce procédé a permis d'isoler un dimère partiellement acétylé ponté par une chaîne butanediamine (**35a**).

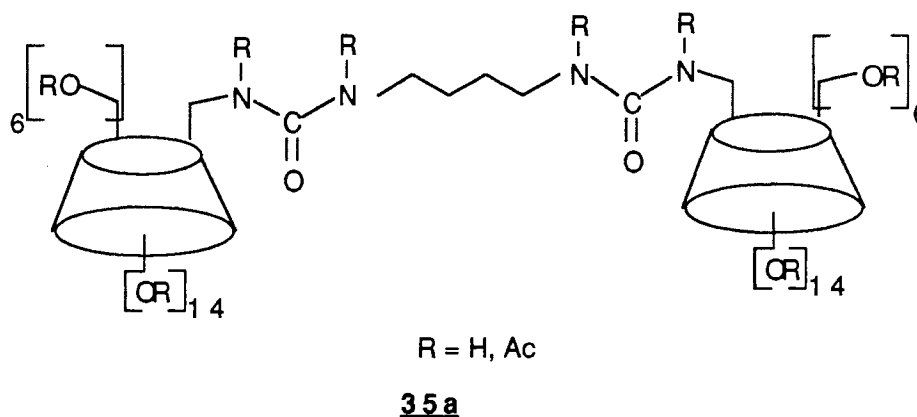
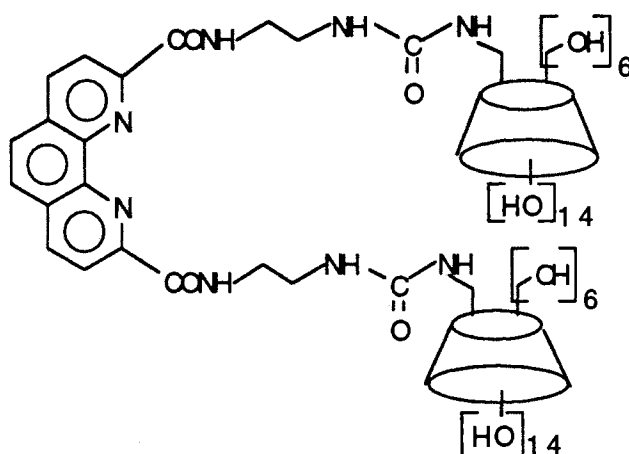
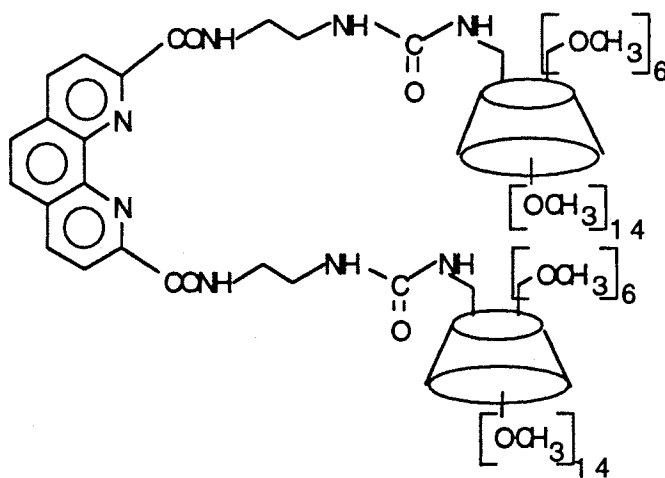


Figure 137 : Structure du dimère ponté par une butane diamine **35a**

II- Synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]-1,10-phénanthroline 36 et de la Bis-[[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-(2,3-di-O-méthyl)-cyclomalto-heptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline 37



36



37

1-Synthèse de la (2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 33 et de la (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 34

La synthèse de ces dimères a préalablement nécessité la préparation de la (2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 33 et de la (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 34.

Ces deux composés sont obtenus à partir de la 6-déoxy-6-azido-cyclomaltoheptaose 32 dont la synthèse est décrite dans la littérature [18]. La mono-azido- β -CD est obtenue en deux étapes à partir de la β -CD. La β -CD est d'abord tosylée puis l'azidation de la monotosyl- β -CD 12 s'effectue dans le DMF à reflux en présence d'azoture de sodium

La (2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 33 a été préparée selon une méthode décrite dans la littérature [27]. La 6-déoxy-6-azido-cyclomaltoheptaose 32 est acétylée dans un mélange pyridine-anhydride acétique (2:1) en présence d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine, à température ambiante (Rdt : 69%) (Figure 138).

La structure de 33 a été vérifiée par RMN ^{13}C , la présence d'un signal à 50,66 ppm confirme la présence du groupement azido. Le spectre de masse (FAB^+) révèle la présence de deux ions pseudo-moléculaires à 2002 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et 2024 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et confirme l'acétylation totale du produit.

La (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 34 a été préparée d'après une méthode décrite dans la littérature [27]. La méthylation s'effectue dans les mêmes conditions que celles de la mono trityl- β -CD 19 dans le DMF en présence d'iodure de méthyle et d'hydrure de sodium (Rdt : 75%) (Figure 138). La structure du composé a été vérifiée par RMN ^{13}C , la présence d'un signal à 52,01 ppm confirme la présence du groupement azido.

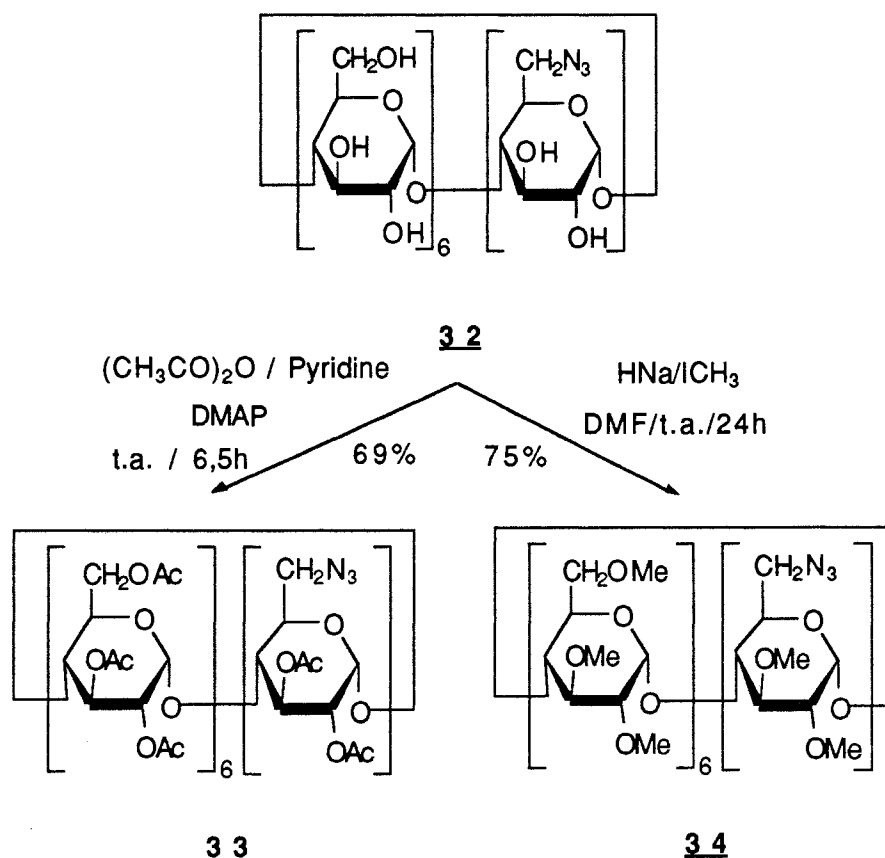


Figure 138 : Schéma de synthèse des composés **33** et **34**

2- Synthèse de la Bis-{cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline **36** et de la Bis-{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline **37**

*α -synthèse de la Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]-1,10-phénanthroline **36***

Le dimère **36** [242a] est obtenu en deux étapes à partir de la (2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose **33** et de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** dans le DMF, en présence de CO₂ sec et de PPh₃. Le CO₂ est séché à l'aide d'acide sulfurique concentré et de chlorure de calcium.

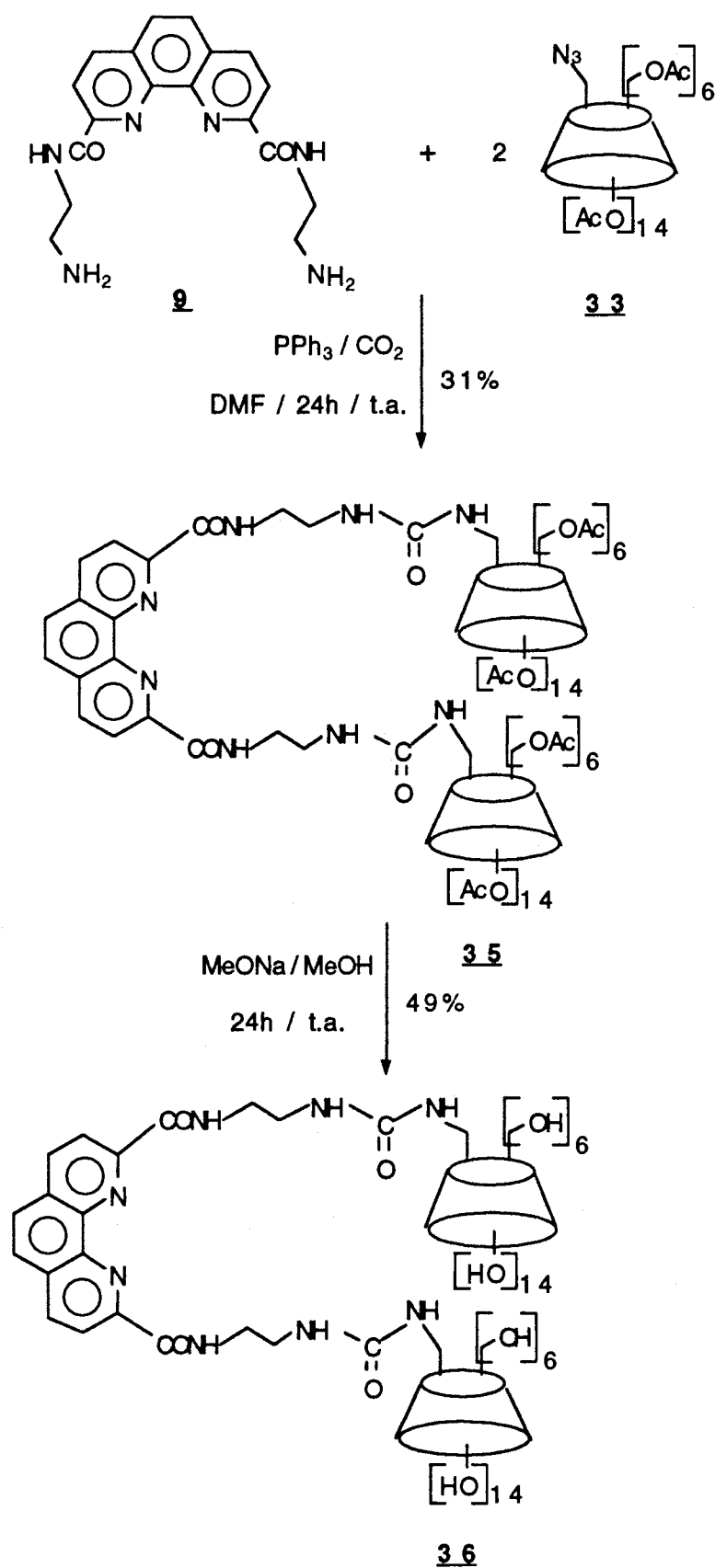
Les conditions initiales de réaction ont été modifiées pour la synthèse du dimère **36**. Nous avons préféré utiliser des azido-CDs protégées pour simplifier l'étape de purification finale qui permet de s'affranchir d'une purification par CLHP à polarité de phase inversée. L'ordre d'addition des réactifs a été modifié pour éviter la formation préférentielle d'un polymère par auto-condensation de la diamine **2**. La réaction s'effectue donc à partir d'une solution du produit **33** et de PPh_3 dans le DMF, placée à température ambiante pendant dix minutes. La diamine **2** est alors lentement ajoutée tandis que le courant de CO_2 est déclenché. La diamine **2** carbonatée se solubilise immédiatement. Le mélange réactionnel est alors laissé 24h à température ambiante en présence d'un dégagement continu de CO_2 . Après traitement, le dimère **35** est purifié et isolé par chromatographie avec un rendement de 31%. Il est ensuite déacétylé par le méthanolate de sodium dans le méthanol, à température ambiante (Zémplén) pour fournir le dimère **36** avec un rendement de 49% (Figure 139).

Les dimères **35** et **36** ont été analysés par spectrométrie de masse haute résolution (FAB^+). Les spectres révèlent la présence d'un ion pseudo-moléculaire à 4352,2979 $[\text{M}+\text{H}]^+$ confirmant la structure du dimère **35** et un ion à 2671,9026 $[\text{M}+\text{H}]^+$ confirmant la structure du dimère **36**. Les micro-analyses montrent la présence de onze molécules d'eau pour le dimère **35** et de vingt-quatre molécules d'eau pour le dimère **36**.

Enfin, les spectres RMN 2D COSY homonucléaire, le spectre d'absorbance UV et le spectre infra-rouge confirment la présence de la partie phénanthroline, des bras espaceurs et des CDs dans la structure du dimère **36**.

Les capacités du dimère **36** à complexer et à solubiliser différents antifongiques ont été étudiées. Cette molécule a aussi fait l'objet d'une étude par fluorescence. Celles-ci seront discutées dans le prochain chapitre de ce travail.

En ce qui concerne le mécanisme de la réaction, nous pouvons raisonnablement considérer qu'il faut aussi intervenir un intermédiaire isocyanate. Par contre, il s'agit, ici, d'une attaque nucléophile externe par une amine et non interne comme dans le cas des monosaccharides. Par ailleurs, la réaction s'effectue en position 6 et non en position anomérique (Figure 140).

Figure 139 : Schéma de synthèse du dimère **36**

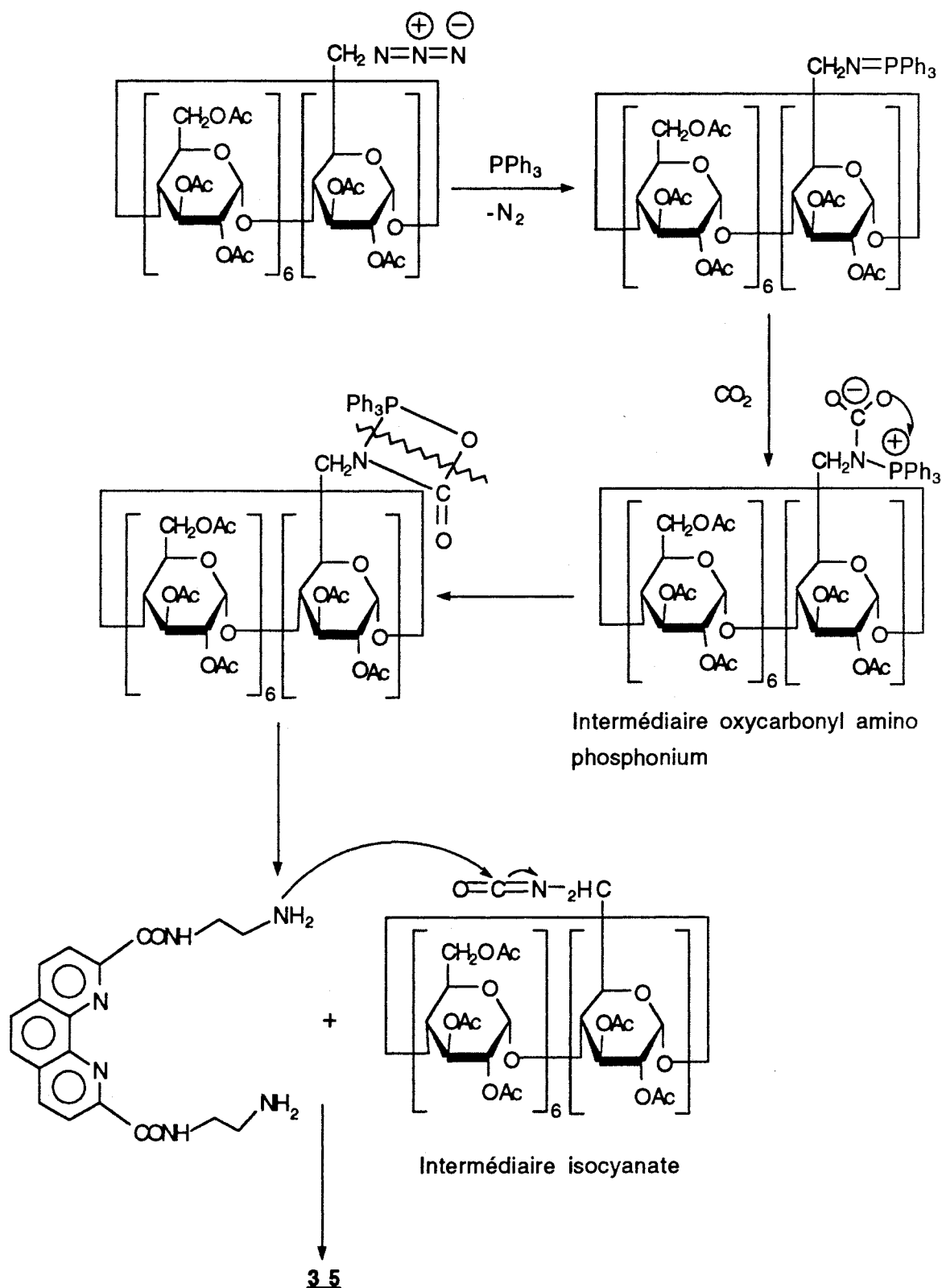


Figure 140 : Mécanisme supposé de la réaction avec les CDs

*b- Synthèse de la Bis-{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline **37***

La synthèse de la Bis-{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]}-1,10-phénanthroline **37** est analogue à la synthèse de **36**. Elle s'effectue à partir de la (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose **34** et de la 2,9-bis [(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **9** (0,6éq.) dans le DMF à température ambiante pendant 24h, dans les mêmes conditions. Le dimère **37** est purifié par chromatographie. Le rendement est de 19% (Figure 141). La structure du dimère **37** est confirmée par l'analyse en spectrométrie de masse haute résolution (FAB⁺) qui montre un ion pseudo-moléculaire à 3270,4788 correspondant à [M+K]⁺. Les spectres RMN 2D COSY homonucléaire, d'absorbance UV et infra-rouge confirment la présence de la partie phénanthroline, des bras espaceurs et des CDs dans la structure de **37**.

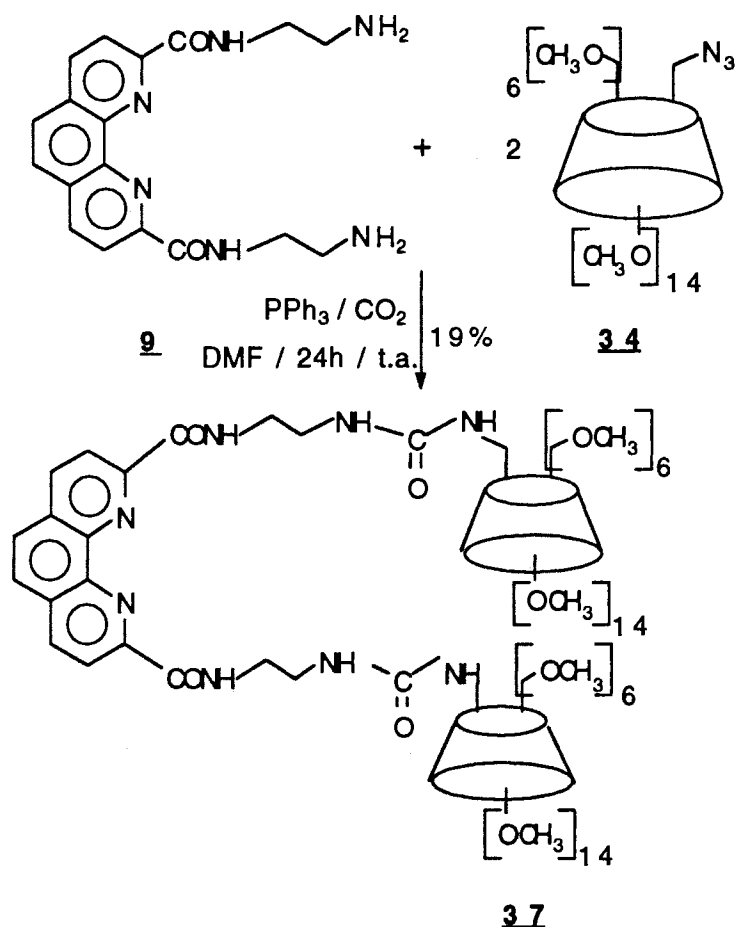


Figure 141 : Schéma de synthèse du dimère **37**

Les rendements de synthèse obtenus ne sont pas optimisés. En particulier, l'utilisation de préparations de 6-mono-azido- β -CD totalement exemptes d'azoture de sodium (ce qui n'était pas le cas de nos premières préparations) permettra d'améliorer le rendement de couplage.

L'étude du mécanisme de la réaction montre également que le contrôle de la quantité d'eau dans le milieu peut avoir une influence sur le résultat de la réaction en agissant comme nucléophile compétitif. Un milieu parfaitement anhydre est gage d'une meilleure réactivité. L'utilisation d'un agent dessicant dans le milieu réactionnel (tamis moléculaire) peut être un bon moyen de conserver le milieu anhydre pendant toute la durée de la réaction. Il est aussi possible d'imaginer l'emploi d'une β -CD préalablement azéotropée dans un solvant tel que le toluène ou la pyridine et qui contribuera à évacuer les molécules d'eau présentes, au départ, dans la cavité de la CD.

*c- Synthèse des complexes métalliques des dimères **36** et **37***

Le but de la synthèse de ces dimères est d'obtenir des modèles d'endonucléases artificielles. Les complexes de cuivre et de ruthénium des dimères **36** et **37** ont donc été préparés. Leur fluorescence a été étudiée. Les capacités du complexe de cuivre (II) du dimère **36** à hydrolyser les liaisons phosphodiester ont été étudiées et seront discutées dans le chapitre suivant.

Les complexes métalliques **36** et **37** ont été préparés par addition d'un équivalent de sel métallique (CuCl_2 , CuBF_4 ou RuCl_3) à une solution aqueuse de **36** ou méthanolique de **37**. Les solutions sont agitées 5h à température ambiante puis évaporées. Les complexes obtenus sont ensuite lyophilisés (Figures 142 et 143).

La complexation a été vérifiée par RMN ^1H dans tous les cas. Elle se traduit soit par une mauvaise résolution du spectre et l'élargissement de tous les signaux dans le cas du cuivre (effet paramagnétique), soit par un déplacement des signaux correspondant à un déblindage de tous les protons de la molécule (ruthénium). Nous avons voulu confirmer cette complexation par spectrométrie de masse (FAB^+) mais seuls les ions-fragments correspondants aux dimères **36** et **37** sans le métal ont alors été observés. Les complexes n'ont pas pu être détectés par cette méthode. Ce résultat s'explique assez facilement par le fait que la stabilité de ces complexes doit être relativement faible devant l'énergie d'ionisation qui induit la décomplexation du métal.

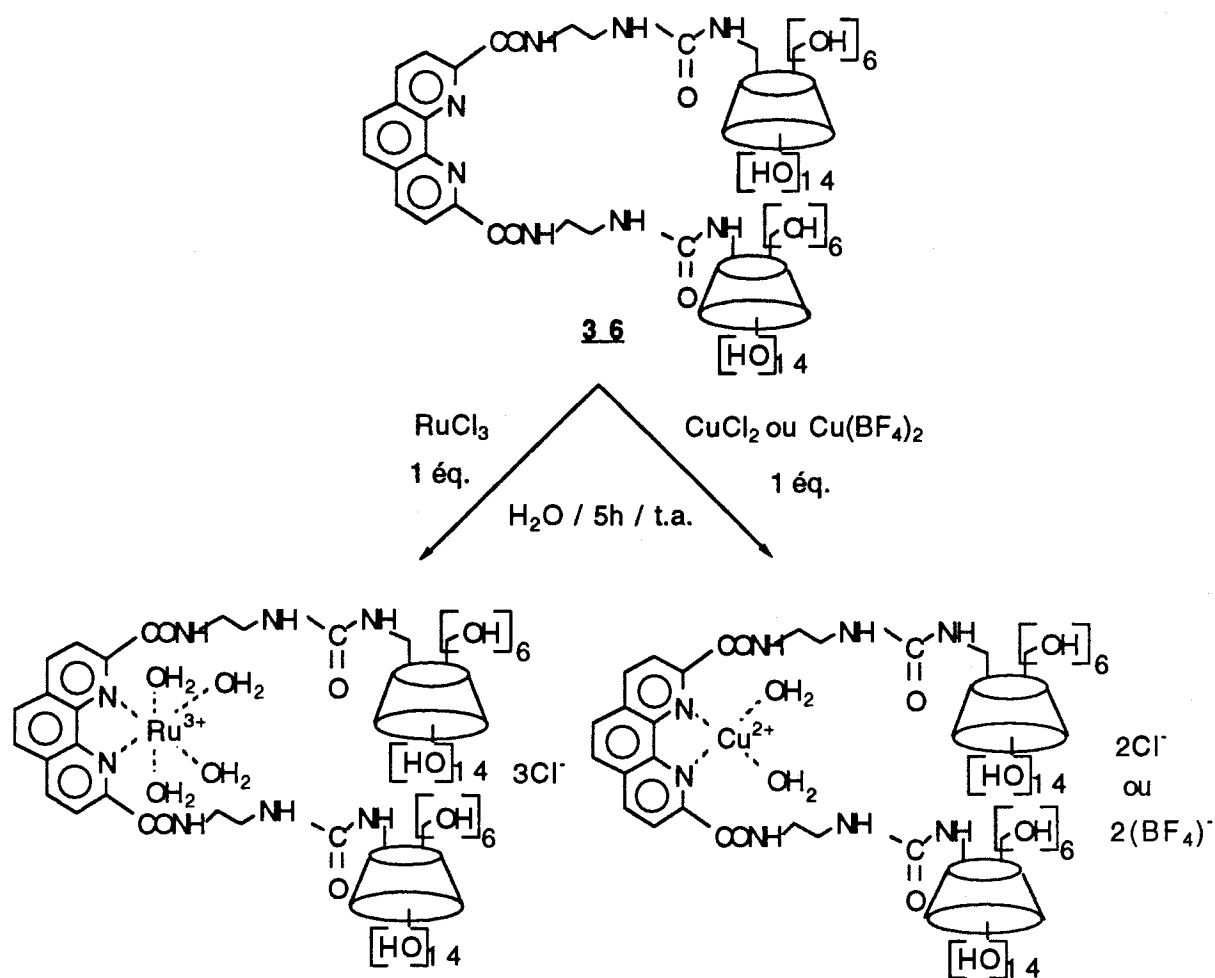


Figure 142 : Schéma de synthèse des complexes métalliques de **36**

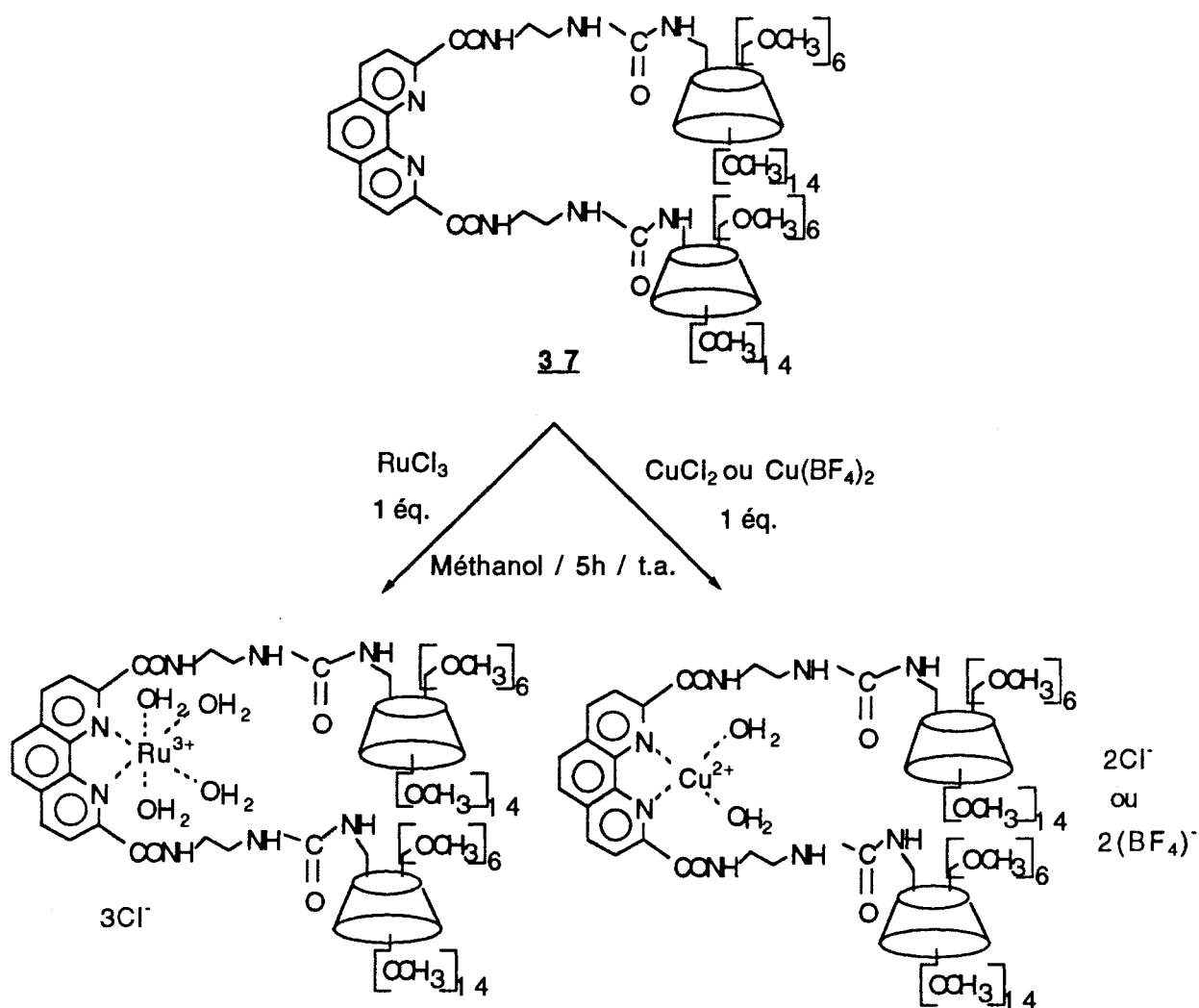


Figure 143 : Schéma de synthèse des complexes métalliques de **37**

Dérivés de CDs, Transporteurs d'Oligonucléotides

Au cours de ce travail, notre objectif était aussi de préparer des molécules susceptibles de transporter en particulier les nucléotides et les oligonucléotides. Etant donné le potentiel des amino- β -CDs, démontré par ELISEEV, dans ce domaine, nous avons préparé des amino- β -CDs mono et persubstitués.

I- Synthèse des amino- β -cyclodextrines1- Synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]-cyclomaltoheptaose **17**

La 6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]-cyclomaltoheptaose **17** a été préparée selon la méthode élaborée par MATSUI [17]. La monotosyl- β -CD **12** réagit avec l'éthylène diamine à 60 °C pendant une heure sous atmosphère d'argon pour fournir le composé **17** avec un rendement de 47% après purification (Figure 144).

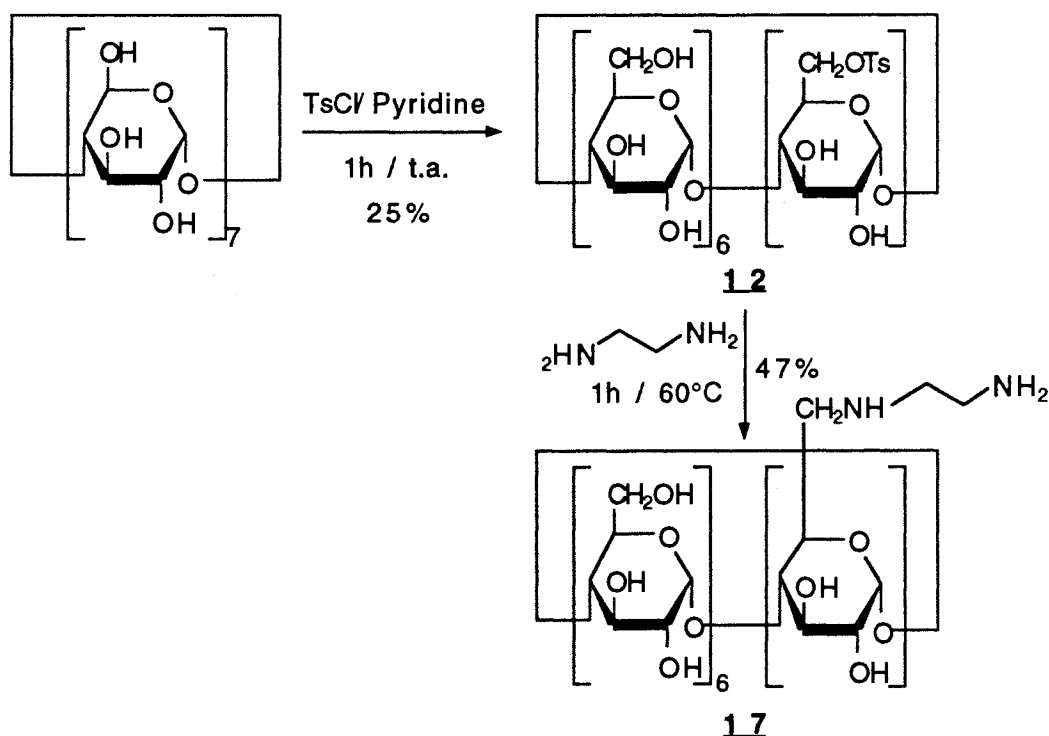


Figure 144 : Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]- β -CD **17**

Le spectre de masse (FAB⁺) du composé révèle deux ions à 1177 [M+H]⁺ et à 1199 [M+Na]⁺.

2- Synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose **18**

La 6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose **18** a été préparée par réaction de la monotosyl-β-CD **12** avec quinze équivalents d'hexaméthylène diamine dans le DMF, à 60°C pendant deux jours (Figure 145). Le composé **18** est isolé par précipitation dans l'éthanol à partir du résidu d'évaporation et purifié par chromatographie d'échange d'ions (Rdt : 34%).

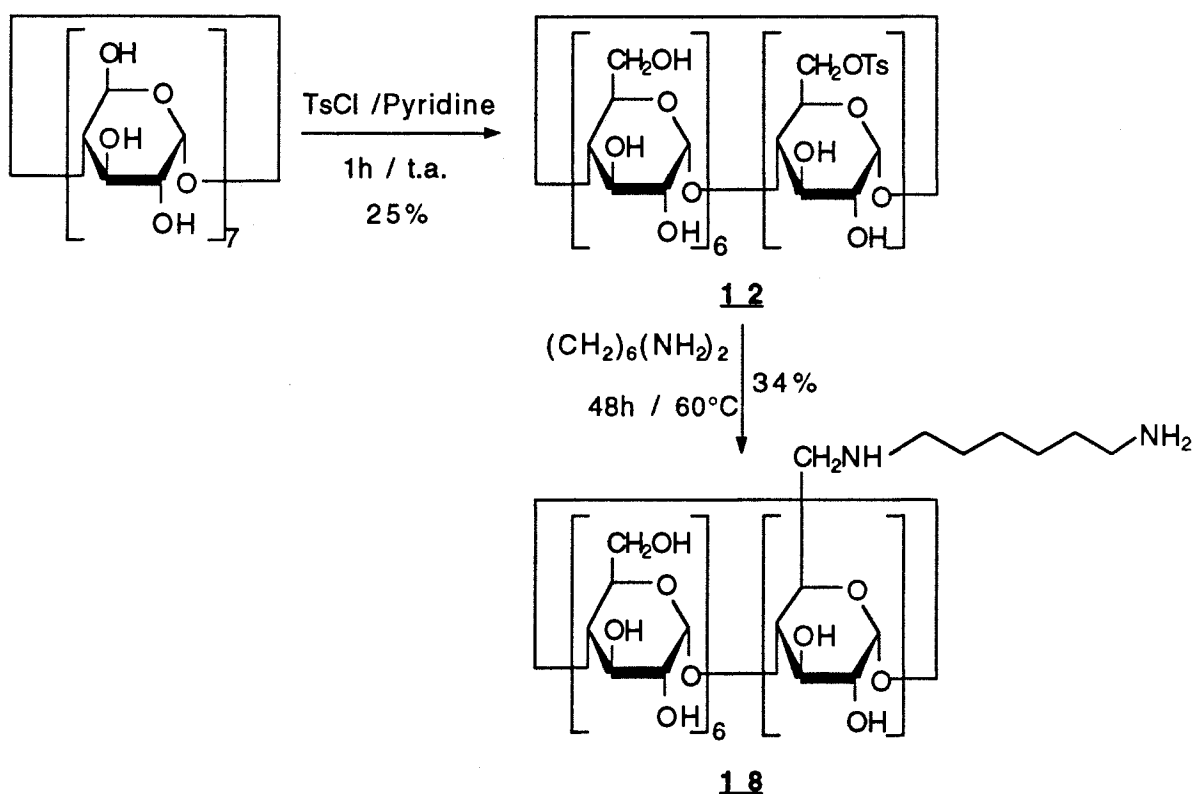


Figure 145 : Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose **18**

Le spectre de masse (FAB⁺) du composé révèle deux ions à 1233 [M+H]⁺ et à 1255 [M+Na]⁺.

3- Synthèse de l'heptakis[6-déoxy-6-(1-(2-amino)éthylamino)]-cyclomaltoheptaose 23

La synthèse de ce composé a nécessité, au préalable, la préparation de la perbromo- β -CD 22.

α - Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-bromo)-cyclomaltoheptaose 22

La perbromo- β -CD 22 a été préparée selon une méthode décrite dans la littérature [92]. Un mélange de brome et de triphénylphosphine, en solution dans du DMF, est chauffé à 60°C puis la β -CD est ajoutée et le mélange est chauffé à 80°C pendant 17h. Une solution de méthanolate de sodium est alors ajoutée pour détruire les esters de formate formés (Figure 146). Le composé 22 est isolé par précipitation du mélange réactionnel dans une solution aqueuse refroidie à 0°C. Le précipité est ensuite lavé avec du méthanol pour éliminer l'oxyde de triphénylphosphine et fournir le composé 22 avec un rendement de 85%.

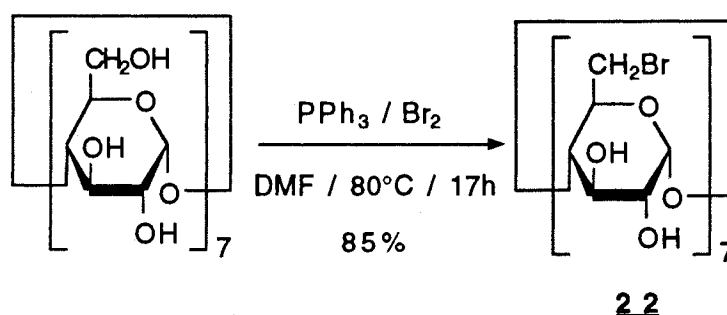


Figure 146 : Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-bromo)-cyclomaltoheptaose

Le mécanisme de la réaction est le suivant :

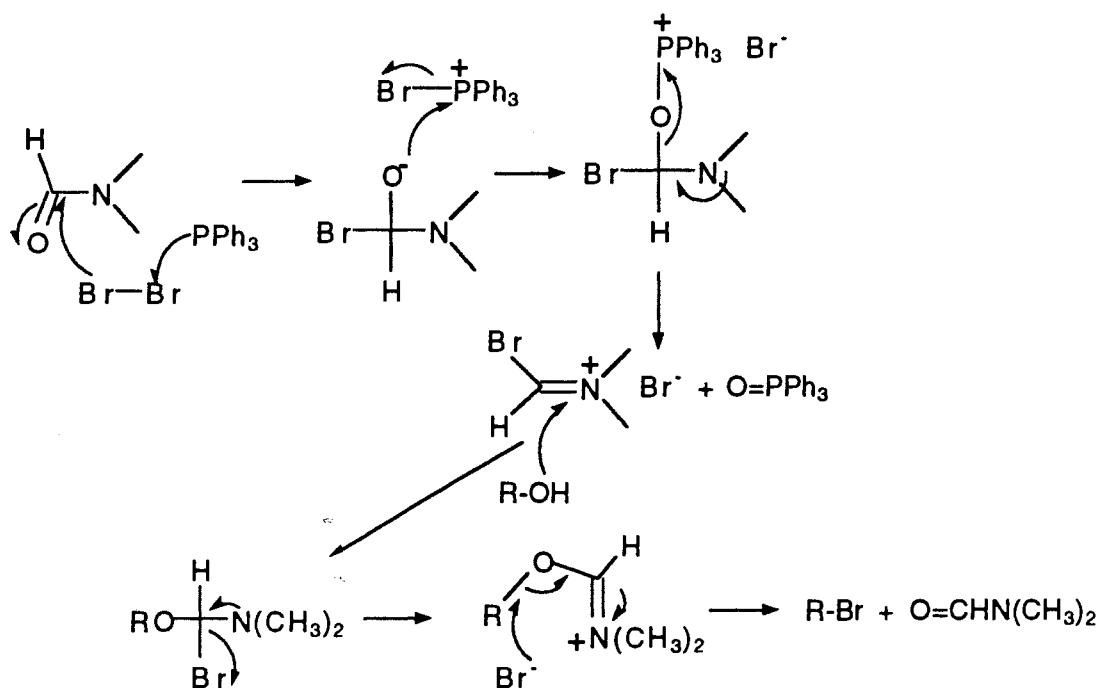


Figure 147 : Mécanisme de la réaction de bromation

*b- Synthèse de l'heptakis[6-déoxy-6-(1-(2-amino)-éthylamino)]-cyclomaltoheptaose **23***

Ce composé est préparé par réaction de la perbromo- β -CD **22** dans l'éthylène diamine, à température ambiante, pendant 4,5h. (Figure 148). l'heptakis[6-déoxy-6-(1-(2-amino)-éthylamino)]-cyclomaltoheptaose **23** est isolée par précipitation à partir du mélange réactionnel par addition d'éthanol et purifiée par chromatographie d'échange d'ions. Le rendement est de 80%.

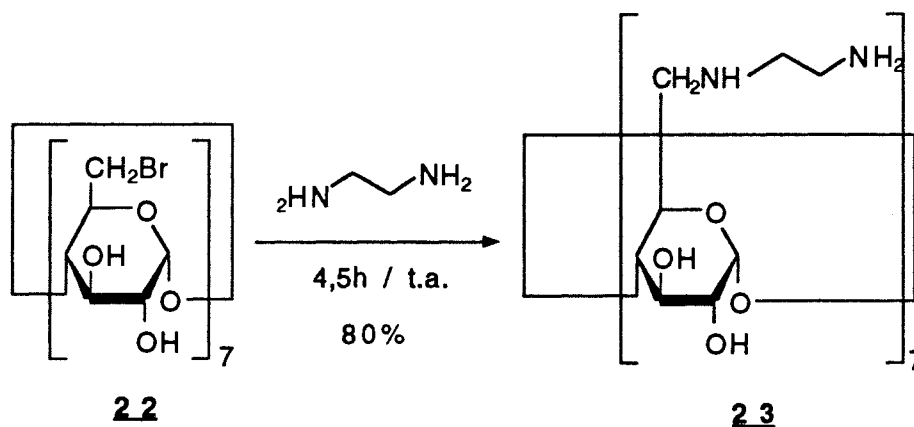


Figure 148 : Schéma de synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-(1-(2-amino)éthylamino))-cyclomaltoheptaose **23**

Le spectre de masse du composé (FAB⁺) révèle deux ions à 1430 [M+H]⁺ et à 1452 [M+Na]⁺.

Les amino-CDs préparées ont fait l'objet de tests biologiques et leurs aptitudes à complexer des molécules médicamenteuses et des oligonucléotides sont en cours d'étude.

II- Synthèse des galactosyl- β -CDs

Ces molécules ont été préparées selon les méthodes décrites dans la littérature par LANCELON-PIN [18] et DE ROBERTIS [163]. Comme les CDs aminées précédemment décrites, elles ont été utilisées lors de tests biologiques. Leur capacité à complexer des molécules biologiquement actives est actuellement en cours d'étude.

1- Synthèse de la 6-S- β -D-galactopyranosyl-6-thio-cyclomaltoheptaose 16.

Le composé **16** est issu d'une synthèse décrite par la figure 149 :

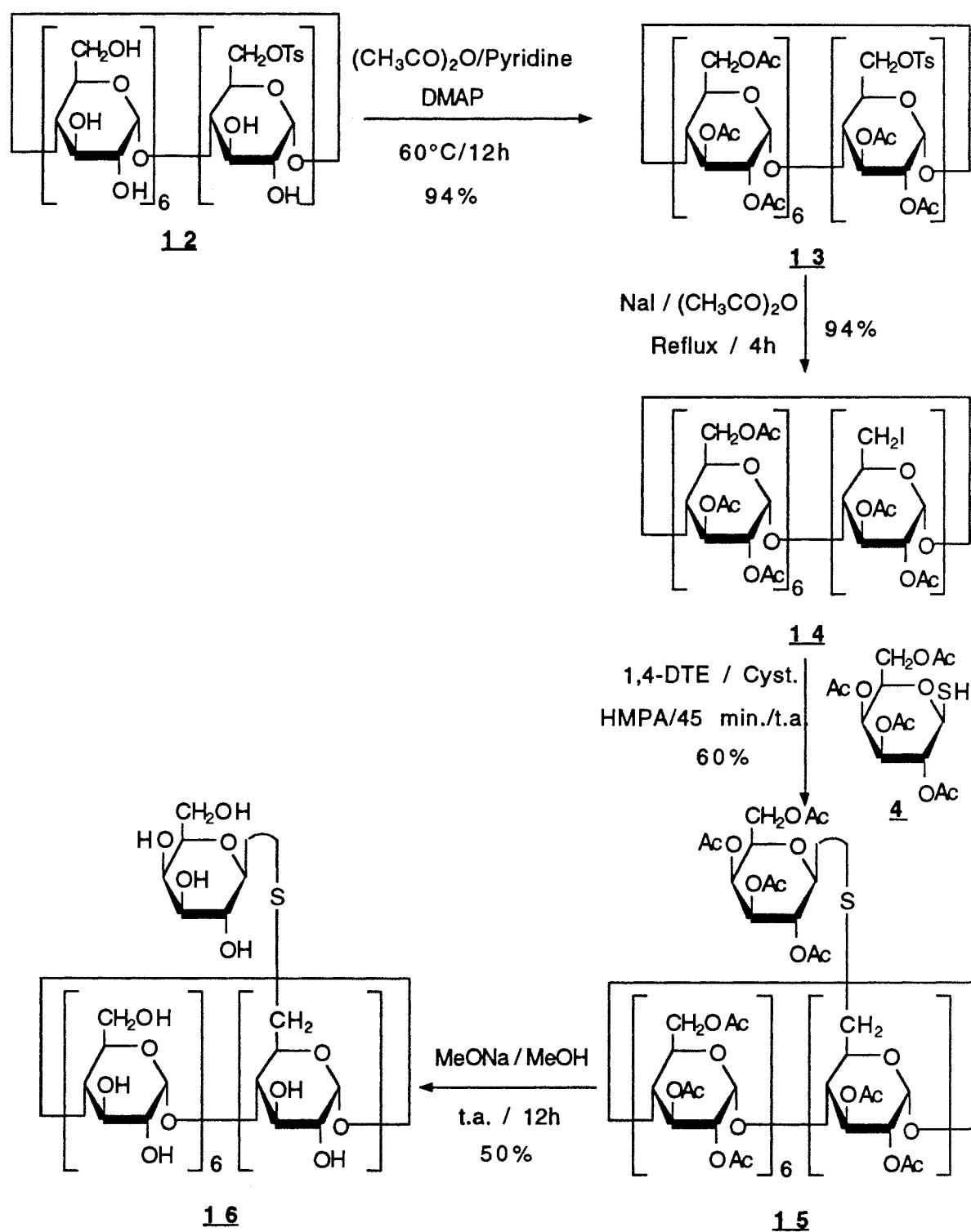


Figure 149 : Schéma de synthèse de 6-S-β-D-galactopyranosyl-6-thio-cyclomaltoheptaose **16**

2- Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-S-β-D-galactopyranosyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose **24**

Cette molécule est préparée à partir de la perbromo-β-CD **22** et du sel de sodium du 1-thio)-β-D-galactopyranosyle **5** dans le DMPU [163]. La figure 150 présente le schéma de synthèse.

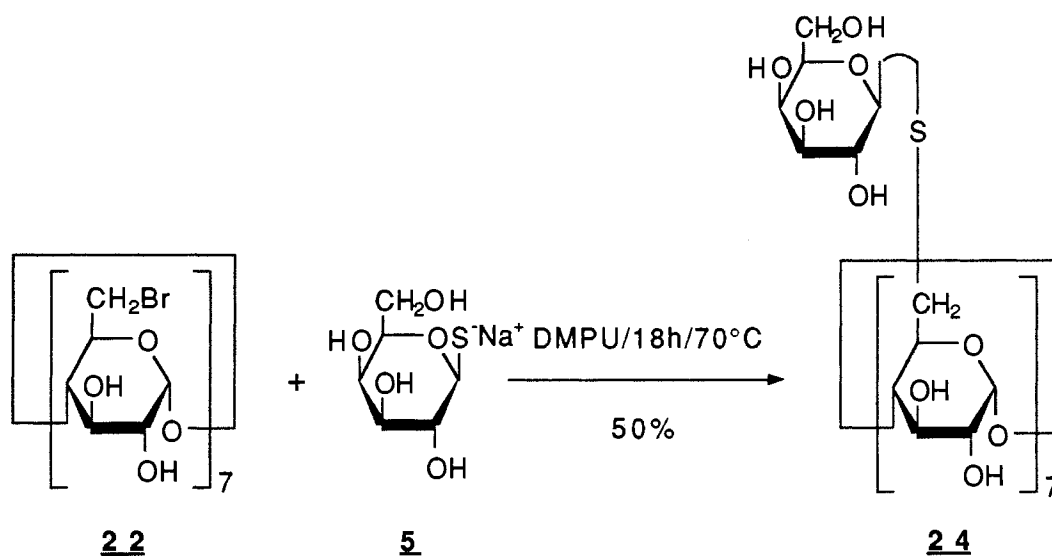


Figure 150 : Schéma de synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-S-β-D-galactopyranosyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose **24**

La structure des composés **16** et **24** a été vérifiée par RMN ^{13}C . Comme les amines, ces dérivés ont été utilisés dans des tests biologiques discutés ci-après.

3- Résultats des essais biologiques

Les travaux de biologie ont été réalisés par les équipes de Microbiologie Moléculaire et de Biochimie Microbienne de notre équipe de recherche (GEVSM).

La capacité des CDs galactosylées **16** et **24** à être reconnue par des lectines membranaires a été évaluée lors de travaux antérieurs [163], nous présenterons uniquement ici quelques résultats concernant la cytotoxicité comparée de plusieurs composés originaux.

Les tests ont été réalisés sur des cellules HRT-18 (adénocarcinome rectal humain) et montrent que pour les concentrations utilisées, les CDs galactosylées **16** et **24** présentent peu d'effet cytotoxique par rapport à la β-CD native. A forte concentration,

elles semblent même stimuler l'activité succinate déshydrogénase. Les mêmes tests ont été effectués sur les amino-CDs **17** et **23** et ont montré un effet cytotoxique important de la part de ces molécules par rapport à la β -CD native. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 37 suivant :

Tableau 37 : Cytotoxicité des dérivés de β -CDs [243]

CD	DC ₀ (10 ⁻³ M)	DC ₅₀ (10 ⁻³ M)
β -CD	>4	>4
16	0,7	>4
17	0,5	1,4
23	0,5	1,4

DC₀ : Dose cytotoxique 0 : Concentration de β -CD à laquelle commence l'effet cytotoxique

DC₅₀ : Dose cytotoxique 50 : Concentration de β -CD conduisant à une diminution de 50% de la viabilité cellulaire

Les aptitudes des CDs galactosylées à agir sur la multiplication virale du Corona Virus Entérique Bovin (BECV) ont aussi été étudiées [244]. Tandis que le composé **16**, monogalactosylé, stimule la multiplication virale, le composé **24**, pergactosylé, l'inhibe. Des expériences complémentaires semblent indiquer que cette CD interfère avec l'adsorption du virus sur ses cellules cibles. L'hypothèse avancée serait que les résidus galactoses portés par la CD se fixent sur les récepteurs portés par le virus et bloquent ainsi son adsorption.

D'autre part, la galactosyl- β -CD **24** et les amino-CDs **17** et **23** ont été utilisées pour complexer un oligodéoxynucléotide anti-sens (18 mers) dont la séquence est la suivante : 3'TGG-TAT-TAG-ATT-TGT-ACA5'. Une étude par spectroscopie UV ($\lambda=260\text{nm}$) a été réalisée, les résultats sont les suivants [244] :

- En présence des composés **17** et **24**, le spectre de l'oligonucléotide montre un léger effet hypochrome,
- En présence du composé **23**, le spectre de l'oligonucléotide montre un effet hypochrome marqué, inversement proportionnel à la concentration de CDs.

Ces résultats préliminaires, comparés aux travaux récemment parus dans la littérature, montrent une piste intéressante dans le domaine d'une vectorisation possible des oligonucléotides. D'autres travaux sont actuellement en cours pour confirmer et affiner les premières données concernant la complexation de ces actifs actuellement

considérés comme des agents thérapeutiques très prometteurs dans le domaine de la thérapie génique.

Par ailleurs, des travaux dédiés à l'étude de la complexation de principes actifs médicamenteux par les composés **17**, **23** et **24** sont en cours d'investigation avec des partenaires industriels au plan international.

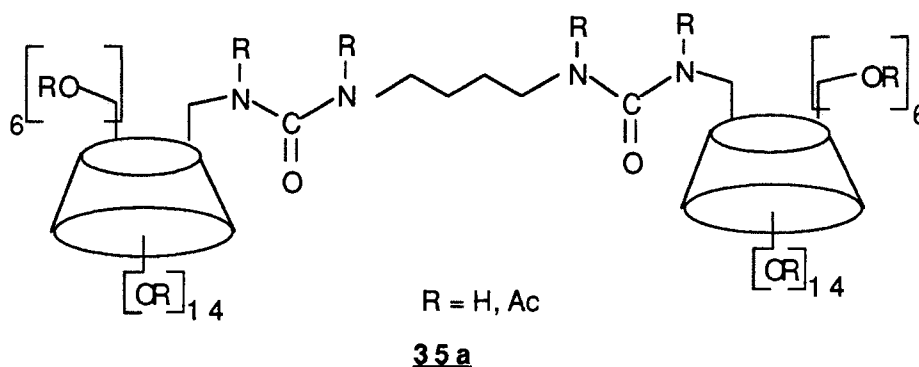
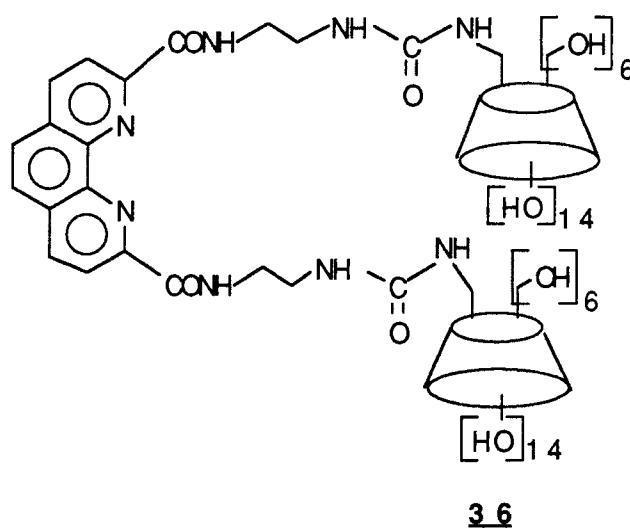
*Partie 4 : Etude Physico-
Chimique*

Etude Physico-Chimique

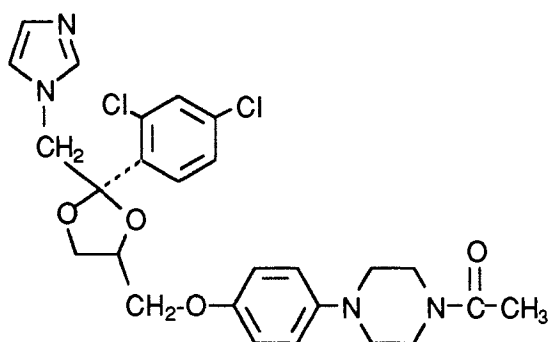
I- Courbes de complexation de molécules médicamenteuses

L'une des propriétés de la β -CD ou de ses dérivés tels que l'hydroxypropyl- β -CD est de permettre la solubilisation de molécules hydrophobes dans l'eau par la formation de complexes d'inclusion. Cette caractéristique est largement étudiée dans le domaine pharmaceutique où de nombreux principes actifs sont insolubles dans l'eau. En effet, une meilleure solubilisation des actifs peut permettre d'améliorer leur biodisponibilité et, pour certains, contribuer à la mise au point de nouvelles formes pharmaceutiques.

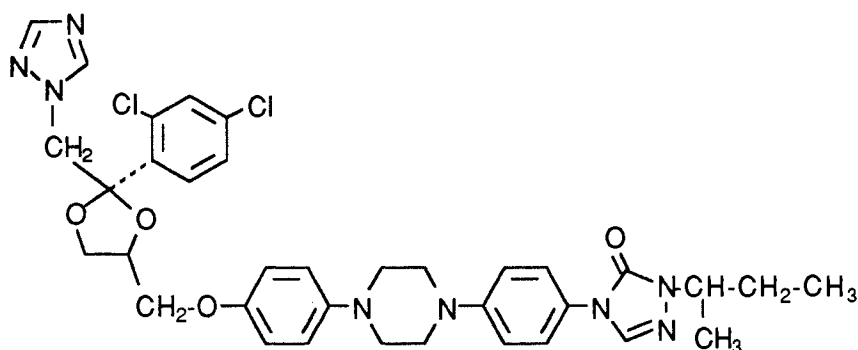
Etant donné l'intérêt que peut l'on peut espérer dans ce domaine, nous avons testé les propriétés de solubilisation de trois principes actifs par deux nouveaux dimères de CDs à notre disposition :



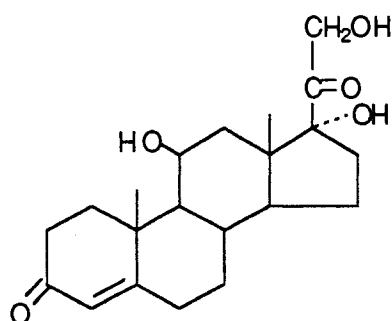
Nous avons choisi pour ce travail deux antifongiques : le kétoconazole et l'itraconazole et un stéroïde : l'hydrocortisone, dont les formules développées respectives sont les suivantes :



Kétoconazole



Itraconazole



Hydrocortisone

Ces trois composés ont une solubilité dans l'eau très faible ce qui limite leur biodisponibilité. Nous avons voulu tester la capacité de nos dimères à former des complexes d'inclusion et à les solubiliser. Différents travaux ont déjà été effectués concernant la complexation des antifongiques par les CDs. A titre d'exemple, nous citerons ceux de PEDERSEN *et al.* [245] et ceux de HOSTETLER *et al.* [246]. Les premiers ont étudié les effets antimycosiques des complexes d'inclusion entre la β -CD et deux antifongiques : l'éconazole et le miconazole. La stoechiométrie et les constantes de stabilité des complexes ont été évaluées par les diagrammes de solubilité et par les

mesures de calorimétrie différentielle. Les effets antimycosiques de ces complexes ont été étudiés sur *Candida albicans*. Il est montré que le complexe éconazole- β -CD (1:1) a un effet antimycosique supérieur à l'éconazole seul. Par ailleurs, il a été observé que la β -CD seule inhibait la croissance du micro-organisme.

HOSTETLER, a, quant à lui, étudié *in vivo* les effets des CDs sur la pharmacologie des azoles antifongiques tels que le kétoconazole et l'itraconazole. En effet, ces compés ont une biodisponibilité restreinte du fait de leur très faible solubilité en milieu aqueux. Les complexes de ces molécules avec l'hydroxypropyl- β -CD (HPCD) ont été préparés et leurs effets ont été testés *in vivo* (souris). Les résultats montrent que la concentration en itraconazole dans le sérum est augmentée lorsque le complexe est utilisé, le même phénomène, mais moins marqué, se produit avec le kétoconazole. En conséquence, l'HPCD constitue un bon candidat pour améliorer la biodisponibilité de l'itraconazole.

1- Formation des complexes d'inclusion avec le dimère 36

a- Cas de l'itraconazole et du kétoconazole

Les deux molécules antifongiques possédant un spectre d'émission de fluorescence, c'est cette technique, très sensible qui a été retenue pour construire leur courbe de complexation. En effet, l'encapsulation d'une molécule dans la cavité d'une CD induit, en principe, des changements observables du spectre d'émission de fluorescence de la molécule incluse.

Les spectres d'émission de fluorescence de l'itraconazole et du kétoconazole ont été réalisés dans le méthanol à $\lambda_{exc}=305\text{nm}$ pour des concentrations respectives de $5,1.10^{-6}\text{ M}$ et $7,53.10^{-5}\text{ M}$ (Figures 151 et 152). Les intensités de fluorescence obtenues sont exprimées en coups par secondes (cps).

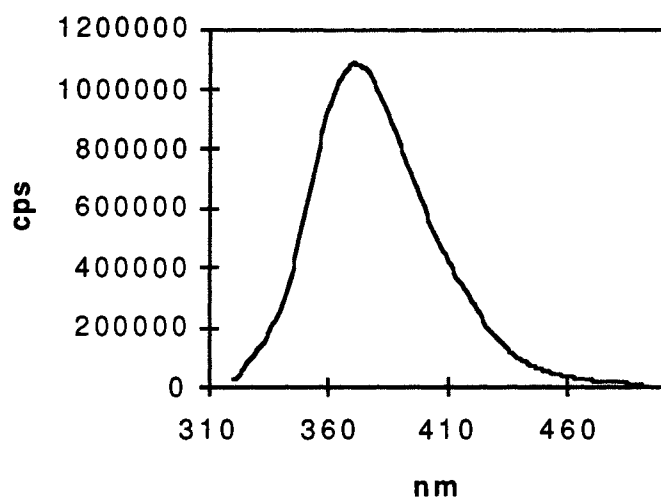


Figure 151 : Spectre d'émission de fluorescence du kétoconazole

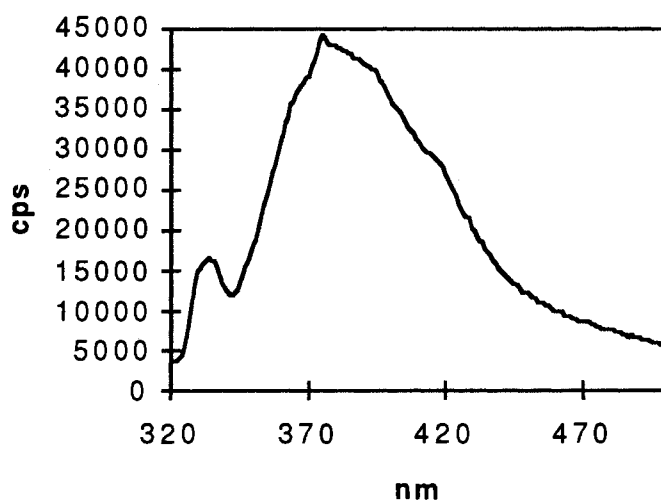


Figure 152 : Spectre d'émission de fluorescence de l'itraconazole

Les maxima d'émission de fluorescence sont alors de 373 nm pour le kétoconazole et de 376 nm pour l'itraconazole.

La méthode employée pour la construction des courbes de complexation est classique : la concentration en antifongique est maintenue constante tandis que sont ajoutées des concentrations croissantes de dimère **36**. Les concentrations utilisées en dimère **36** sont très inférieures à celles des antifongiques de façon à ne jamais atteindre la stoechiométrie 1:1 entre les deux constituants. Par ailleurs, le dimère **36** possédant lui aussi un spectre d'émission de fluorescence, il est nécessaire d'utiliser, dans ce cas, des

concentrations suffisamment faibles pour que celui-ci n'interfère pas avec ceux des antifongiques.

Nous avons dû utiliser des concentrations en CD au minimum cinq cents fois inférieures à celle de la molécule à complexer pour nous situer dans la partie ascendante de la courbe. En effet, l'emploi de concentrations plus élevées montre que l'on atteint rapidement un plateau, indiquant une phase de saturation, qui ne permet plus l'observation du phénomène.

- Le kétoconazole : Le kétoconazole (1,6 mg) est dissous dans du méthanol (1mL) puis des volumes constants (75 μ L) sont prélevés pour atteindre une concentration finale de $7,53 \cdot 10^{-5}$ M dans l'échantillon à mesurer. Des solutions aqueuses de dimère **36** de concentration croissante (variant de $4,99 \cdot 10^{-8}$ à $1,50 \cdot 10^{-7}$ M) sont alors ajoutées, le volume final de l'échantillon étant de 3 mL. La mesure de l'intensité d'émission de fluorescence est effectuée après un temps d'équilibration fixé arbitrairement à quinze minutes. Nous avons considéré que l'influence du méthanol sur la mesure de la solubilité était négligeable étant donné le très faible volume présent par rapport au volume total de l'échantillon.

La courbe de complexation a été tracée à partir des intensités d'émission de fluorescence obtenues à $\lambda=382$ nm lorsque la molécule est excitée à $\lambda=305$ nm. Dans ce cas, une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence ainsi qu'un déplacement de la longueur d'onde d'émission de 9 nm vers les grandes longueurs d'onde ont été observés. Pour plus d'homogénéité, les intensités de fluorescence ont été converties en concentrations de kétoconazole correspondantes.

L'itraconazole : La méthode employée est similaire à celle utilisée pour le kétoconazole. La courbe de complexation a été tracée à partir des intensités d'émission de fluorescence obtenues à $\lambda=373$ nm lorsque la solution est excitée à $\lambda=305$ nm. Le phénomène se traduit par une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence mais aucun déplacement de la longueur d'onde d'émission n'est observé.

Du fait de la faible solubilité de l'itraconazole dans le méthanol, des concentrations dix fois inférieures à celles utilisées pour le kétoconazole ont dû être employées.

Les courbes de complexation obtenues sont présentées dans la figure 153 ci-dessous :

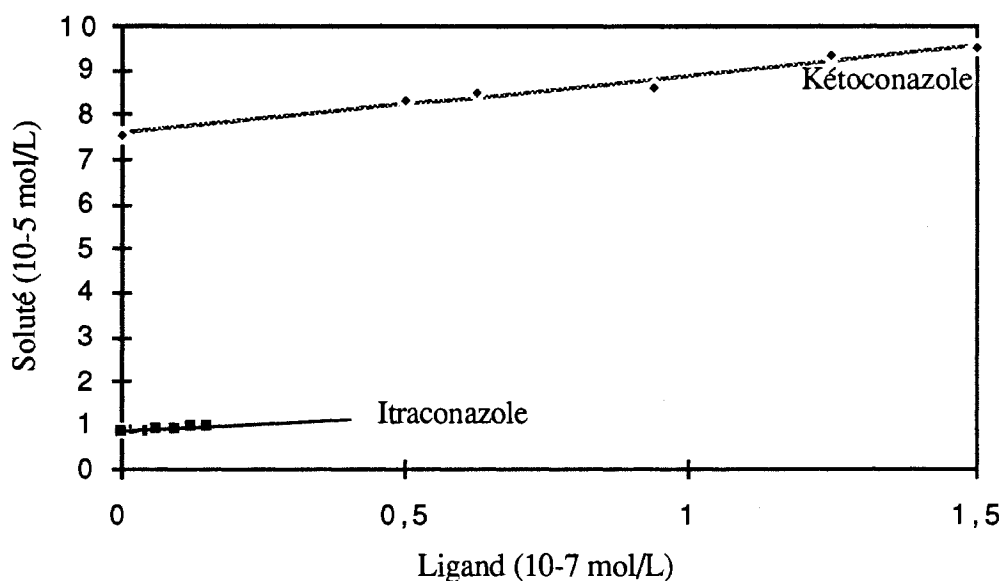


Figure 153 : Courbes de complexation de l'itraconazole et du kétoconazole

Les constantes de complexation sont données par la pente des droites obtenues et sont de $K=131,06 \text{ L.mol}^{-1}$ pour le kétoconazole et de $K=99,06 \text{ L.mol}^{-1}$ pour l'itraconazole.

b- Cas de l'hydrocortisone

L'absence de spectre de fluorescence pour cette molécule nous a conduit à utiliser la spectroscopie UV pour tracer la courbes de complexation. La méthode reste identique, la courbe de complexation a été tracée à partir des concentrations correspondant aux absorbances obtenues à $\lambda=246\text{nm}$. La concentration en hydrocortisone est de $0,87.10^{-5} \text{ M}$, celles du dimère **36** varient de $4,99.10^{-8}$ à $3,74.10^{-7}\text{M}$. Les résultats sont présentés dans la figure 154 ci-après :

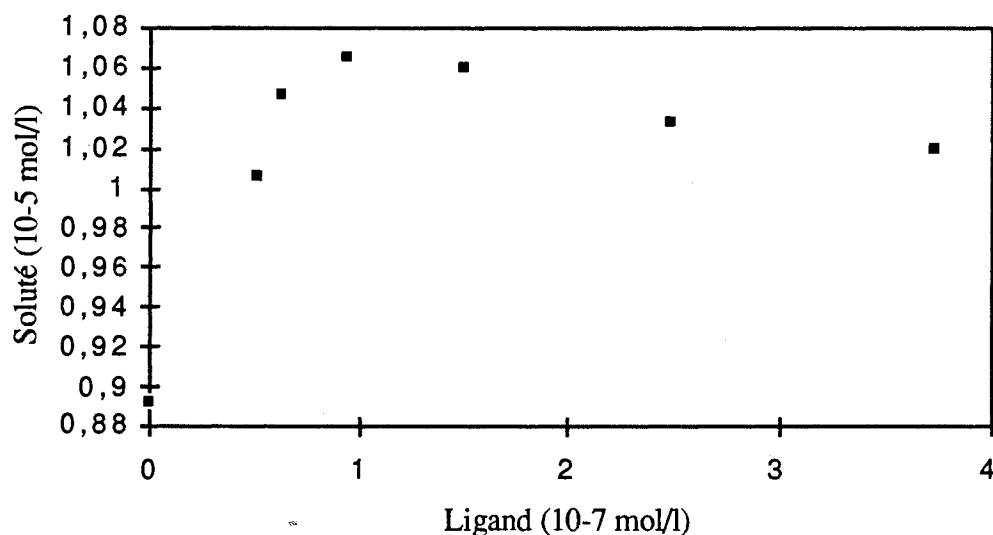


Figure 154 : Courbe de complexation de l'hydrocortisone

Nous n'obtenons pas dans ce cas une droite, ce qui indique une stoechiométrie du complexe différente de 1:1. La constante de complexation n'a donc pas pu être calculée.

2- Formation de complexes d'inclusion avec le dimère 35a

Les courbes de complexation ont été tracées avec les mêmes molécules. Ici, la complexation a été suivie par spectroscopie UV dans les trois cas. Ces tests ayant été réalisés au sein du laboratoire CYCLOLAB par le Docteur JICINSZKI, nous présenterons uniquement les résultats obtenus (Figures 155 et 156).

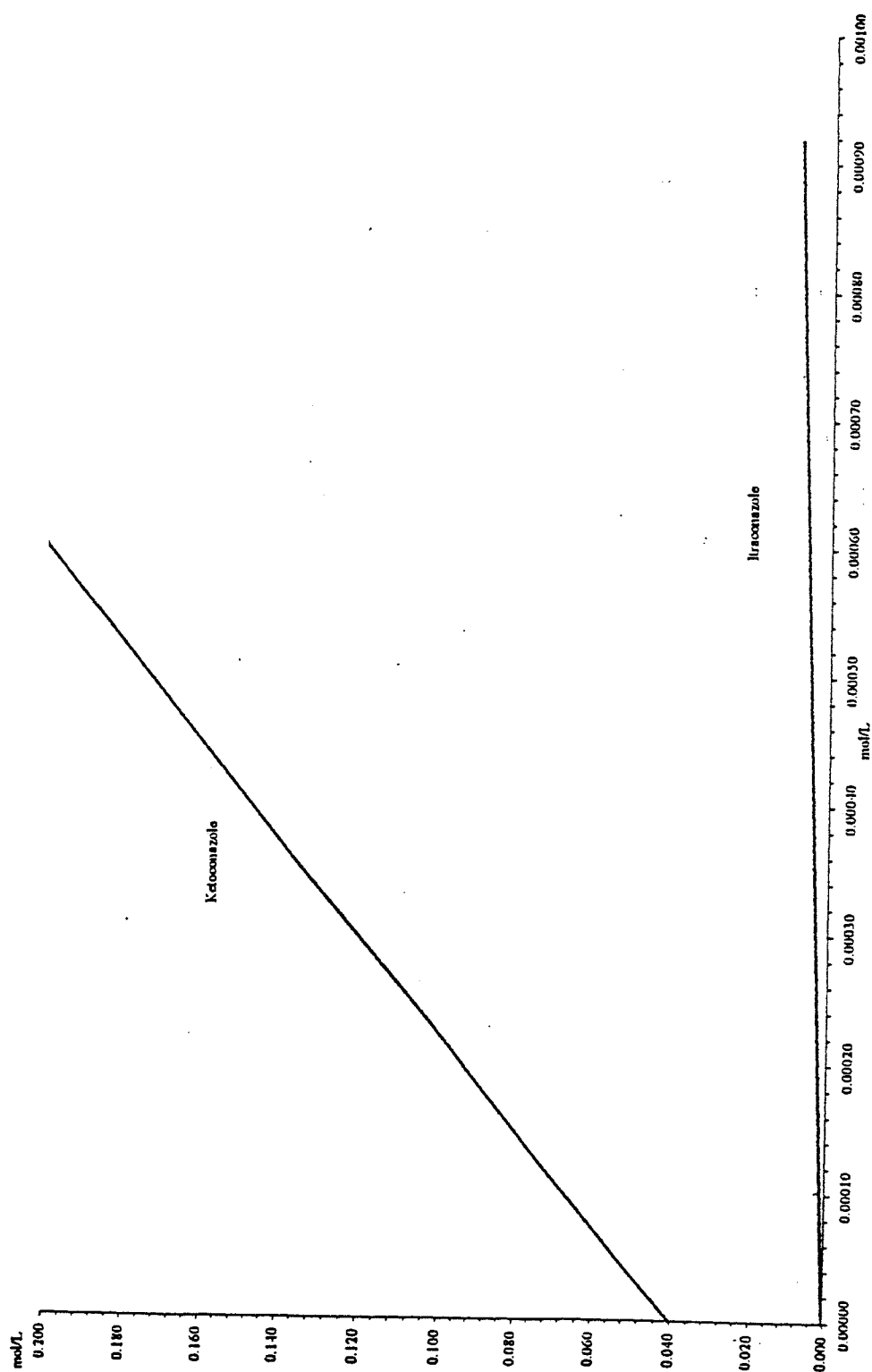


Figure 155 : Courbes de complexation du kétoconazole et de l'itraconazole

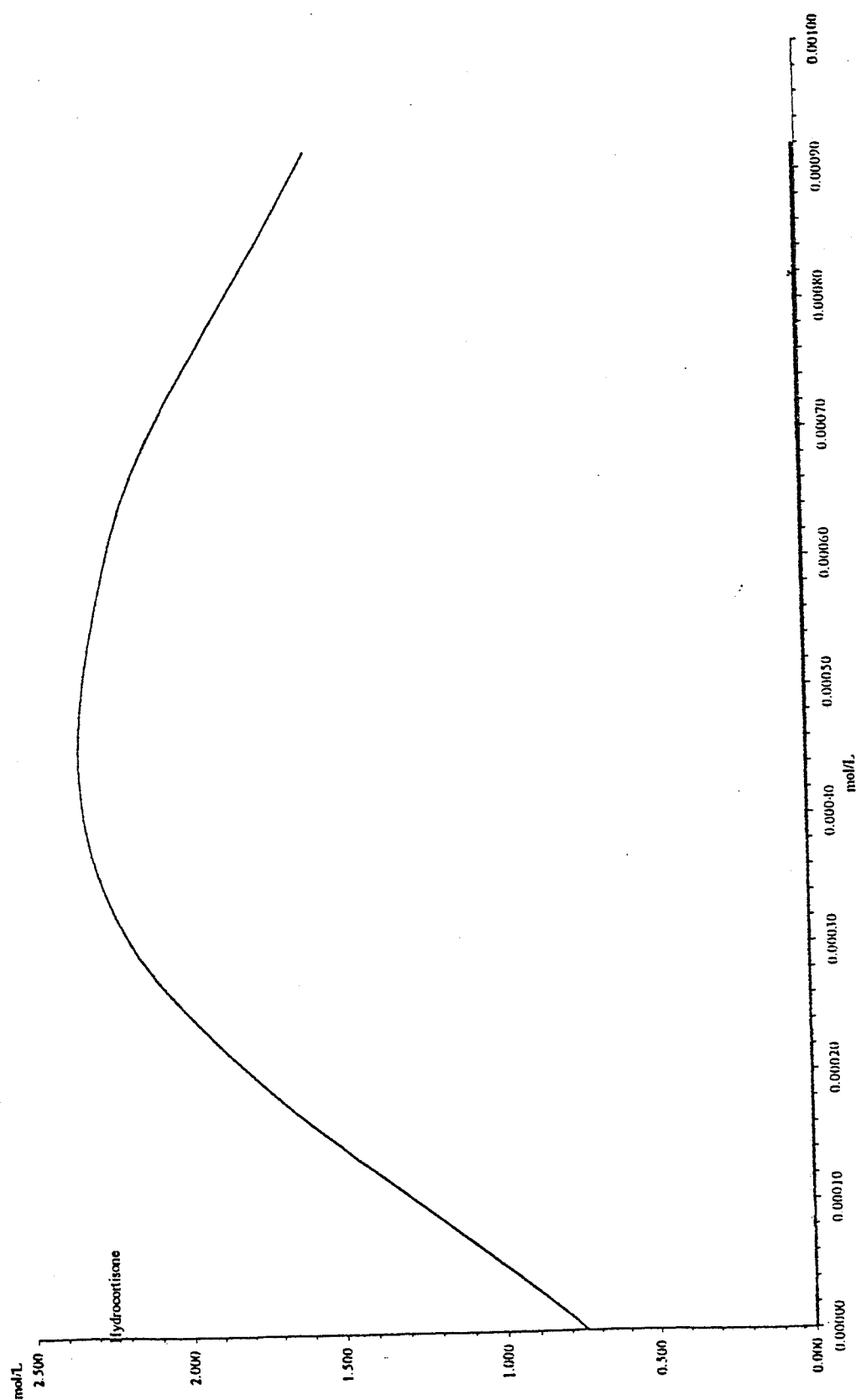


Figure 156 : Courbe de complexation de l'hydrocortisone

Comme pour le dimère **36**, les courbes de complexation obtenues pour le kétoconazole et l'itraconazole sont des droites tandis la courbe de complexation obtenue pour l'hydrocortisone est une courbe en cloche (Figures 155 et 156). Dans les deux premiers cas, la stoechiométrie du complexe est donc 1:1.

Les constantes de stabilité des complexes sont de $K=268,8 \text{ L.mol}^{-1}$ pour le kétoconazole et de $K=8,9 \text{ L.mol}^{-1}$ pour l'itraconazole.

3- Analyse des résultats

Les constantes de stabilité obtenues pour les deux dimères montrent que l'itraconazole est dix fois mieux complexé par le dimère **36** tandis que le kétoconazole est deux fois mieux complexé par le dimère ponté par une butane diamine **35a**.

Les constantes obtenues pour les deux dimères peuvent être considérées comme relativement élevées dans le cas du kétoconazole si l'on se réfère aux standards énoncés par SZETJLI [4]. Au contraire, l'itraconazole montre, dans les deux cas, une constante de complexation plus faible voire très faible avec le dimère partiellement acétylé, ce qui n'est pas surprenant compte-tenu de la structure de la molécule et indique que ces dimères ne sont pas de bons candidats pour le transport de cette molécule.

Le cas de l'hydrocortisone est particulier, la courbe obtenue semble indiquer la présence d'un mélange de complexes. Pour pouvoir conclure à son sujet, il est nécessaire de définir les stoechiométries exactes des complexes existants. Des mesures de calorimétrie différentielle pourraient certainement permettre d'accéder à ces données.

A une molécule de dimère de CDs correspond deux cavités, les différentes possibilités de complexation d'une molécule "invitée" pourraient être alors les suivantes (Figure 157):

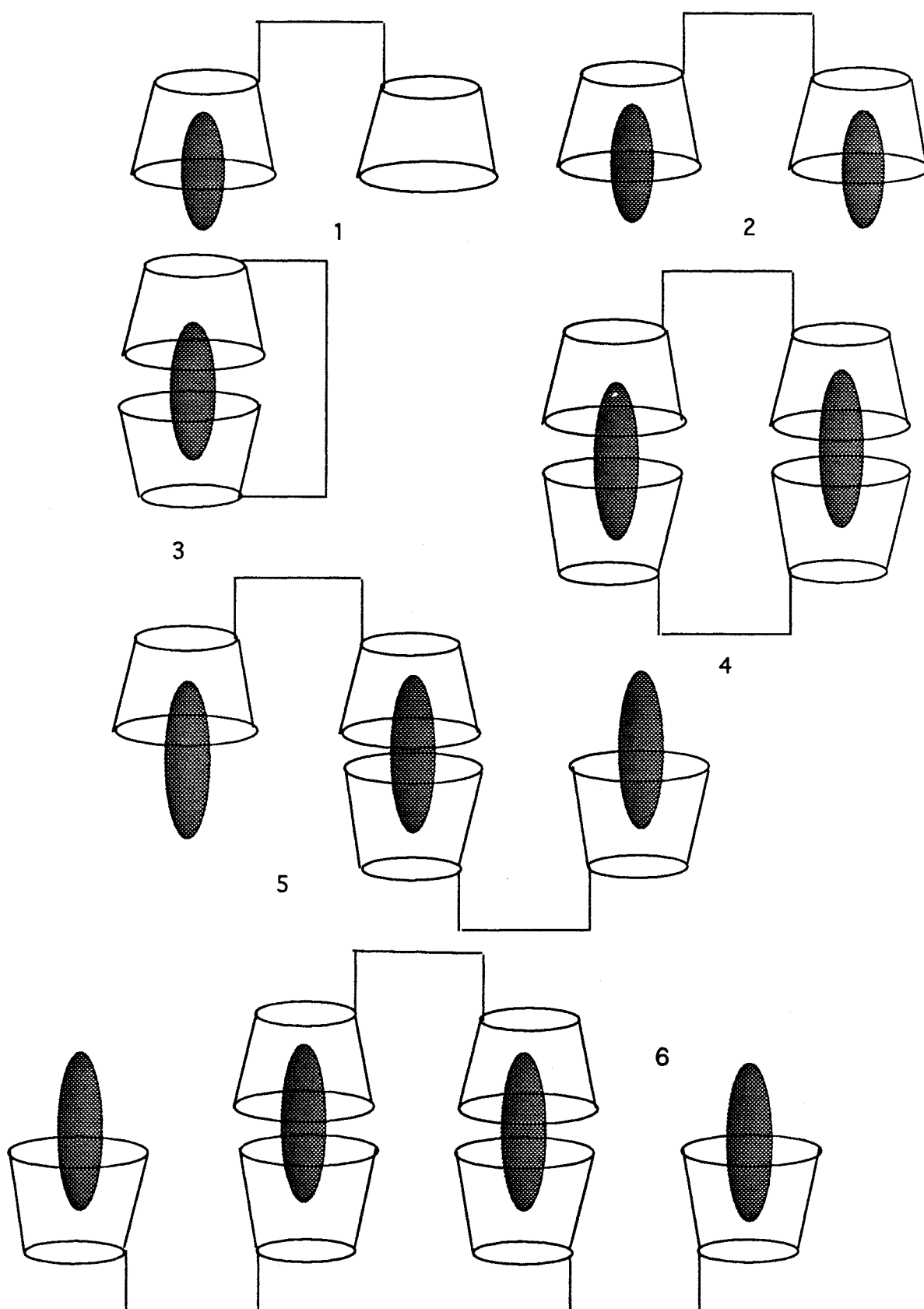


Figure 157 : Possibilités de complexation par un dimère de CDs

Nous considérerons ici qu'un complexe 1:1 est constitué d'une CD et d'une molécule "invitée" et non d'un dimère et d'une molécule "invitée" (e.g. la forme 2 est un complexe 1:1). Compte-tenu des concentrations en dimère utilisées et de la structure des molécules complexées, les formes de complexes 1, 2 et 3 sont les plus favorisées pour les antifongiques tandis que les formes 4 et 6 sont moins vraisemblables. Par contre, compte-tenu de la structure de la molécule et des résultats obtenus pour l'hydrocortisone, les formes 5 et 6 pourraient être plus favorisées.

II- Cinétiques d'hydrolyse du bis(*p*-nitrophényl)phosphate (BNPP) par le dimère **36**

Les complexes métalliques du dimère **36** ont été préparés pour évaluer leur propriétés potentielles en tant qu'endonucléase artificielle. Nous avons d'abord testé leurs aptitudes à couper une liaison phosphodiester. Pour ce faire, nous avons utilisé le BNPP comme substrat à propos duquel une étude d'hydrolyse par un dimère de cyclodextrines (Figure 158) a été publiée récemment par BRESLOW et ZHANG [215].

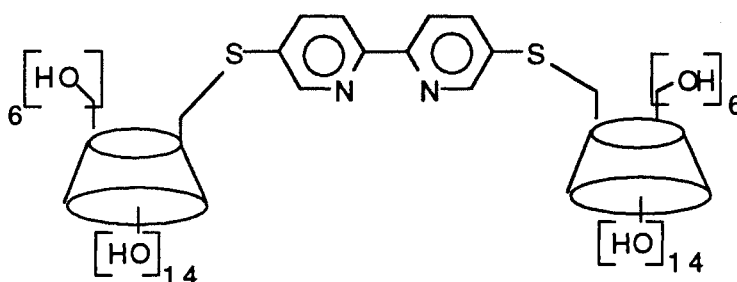


Figure 158 : Structure du dimère utilisé

Les résultats obtenus montrent que le complexe de lanthane de ce dimère catalyse de manière importante l'hydrolyse du BNPP par rapport au lanthane seul. Le phénomène est expliqué par la complexation du BNPP dans les cavités du dimère. Un même type de travail, avec le complexe de cuivre (II) analogue a montré l'aptitude de ce composé à hydrolyser différents esters avec une grande efficacité [247].

1- Résultats

Les cinétiques ont été menées dans un tampon HEPES ($50 \cdot 10^{-3}$ M), à pH 7,06, à température ambiante et en présence de peroxyde d'hydrogène ($48 \cdot 10^{-3}$ M). L'utilisation du tampon HEPES, non chélatant, permet de s'affranchir des risques de chélation du

métal par le tampon ce qui diminuerait l'efficacité du catalyseur. Les complexes sont formés *in situ* et le dimère **36** et l'ion métallique sont en quantité équimolaire ce qui permet de poser l'hypothèse que chaque complexe de **36** ne comporte qu'un seul ion chélaté. Par ailleurs les conditions utilisées sont celles d'une cinétique de pseudo-premier ordre c'est à dire que le complexe (catalyseur) est en large excès par rapport au BNPP (substrat).

Nous avons réalisé ces cinétiques avec différents métaux (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Eu^{3+}) et pour connaître l'apport des cyclodextrines dans la vitesse d'hydrolyse du BNPP, nous avons réalisé dans le cas du complexe de cuivre, la même expérience en présence du complexe de cuivre de la phénanthroline diamine **2** portant les deux bras éthylène diamine mais exempt des cavités des CDs. Dans tous les cas, des contrôles ont été effectués, dans les mêmes conditions, en présence du métal seul.

L'hydrolyse du BNPP fournissant du *p*-nitrophénol dont l'absorbance peut être détectée à $\lambda=400\text{nm}$, les cinétiques d'hydrolyse ont été suivies par spectroscopie UV-Vis à cette longueur d'onde.

Les résultats sont les suivants :

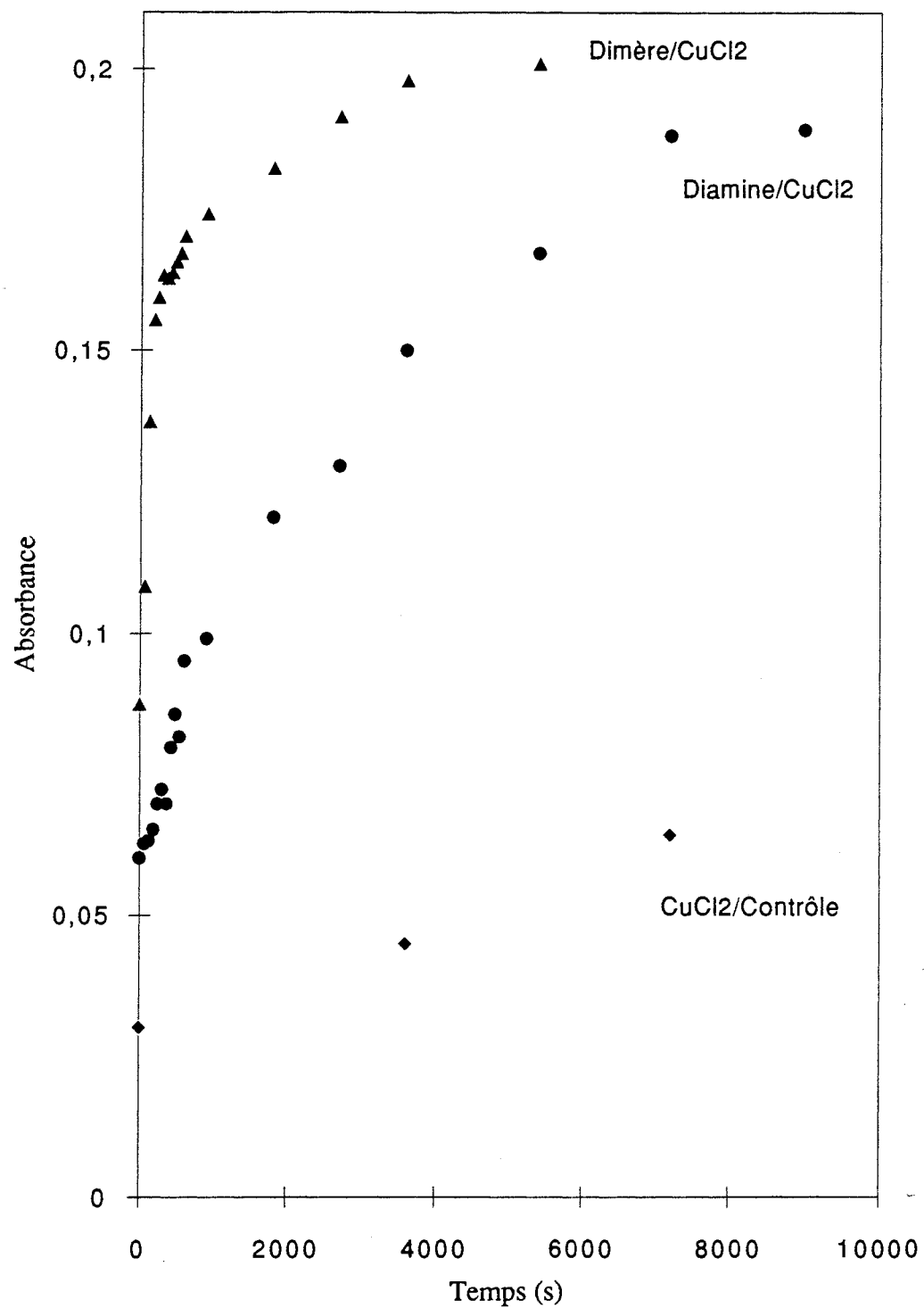


Figure 159 : Cinétiques d'hydrolyse du BNPP en présence de cuivre (II)

Les résultats obtenus pour les différents complexes métalliques sont les suivants :

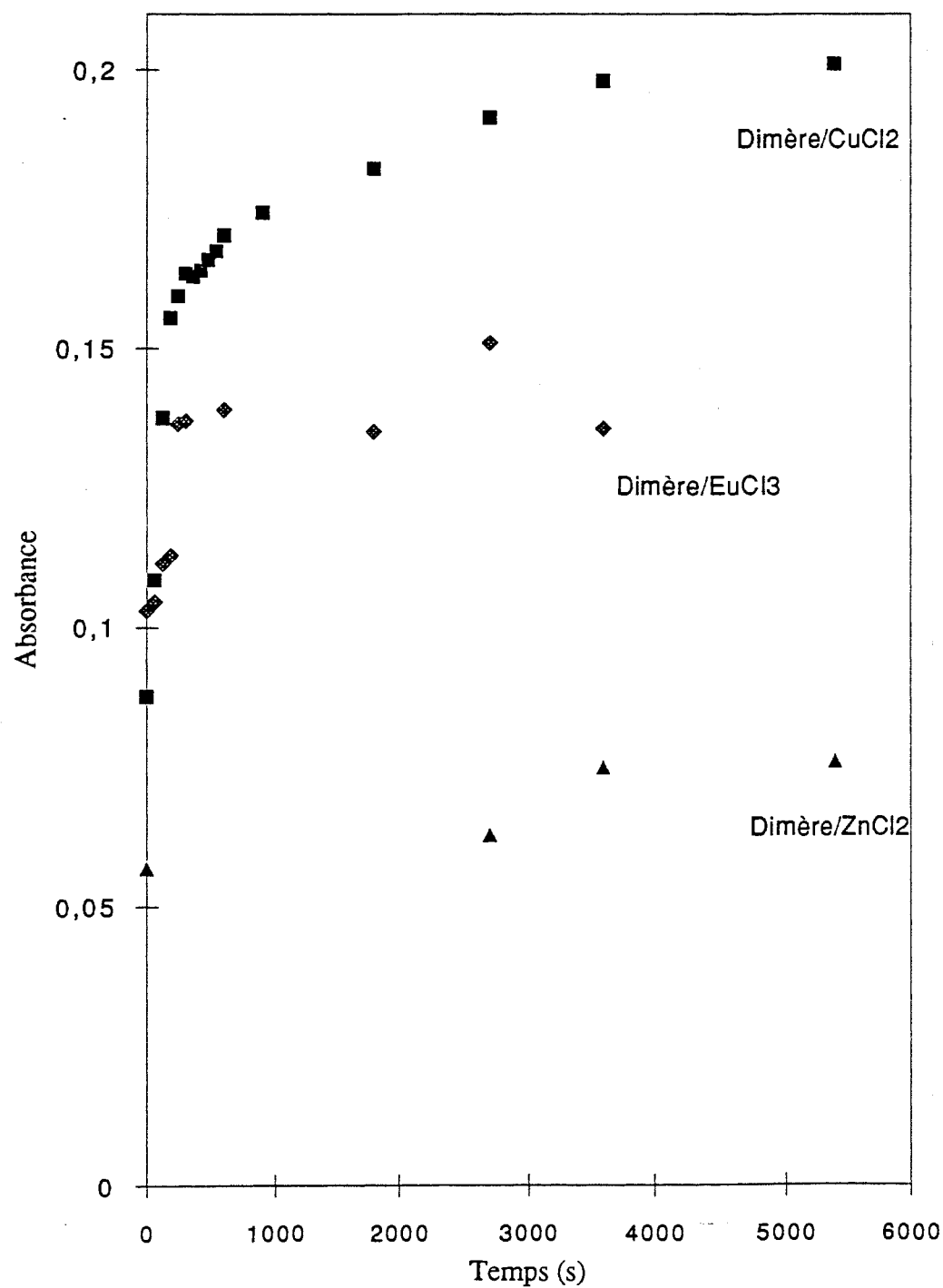


Figure 160 : Cinétiques d'hydrolyse du BNPP avec différents complexes métalliques du dimère 36

Parmi les trois complexes étudiés, le complexe de cuivre (II) s'avère ici le plus efficace. Au contraire, l'hydrolyse observée avec le complexe de zinc(II) reste faible, même après 72h.

Les courbes de cinétique obtenues nous ont permis de mettre en évidence deux domaines de vitesse : un rapide et un lent. Les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre correspondant à ces deux domaines ont été calculées. Pour cela, la méthode de calcul suivante a été employée [248].

La vitesse d'hydrolyse du phosphodiester est exprimée par la relation suivante :

$$v = k_{obs} [\text{ester}]_i = (k_1 + k_0) [\text{ester}]_i$$

v : vitesse globale de la réaction

k_{obs} : $(k_1 + k_0)$: constante de vitesse globale d'hydrolyse (s^{-1})

k_1 : constante de vitesse de pseudo-premier ordre (s^{-1})

k_0 : constante de vitesse de l'hydrolyse propre de l'ester

$[\text{ester}]_i$: concentration initiale en ester

k_{obs} indique si la réaction est accélérée en présence du catalyseur. Cette constante permet d'évaluer l'intérêt du catalyseur par le calcul du temps total nécessaire à l'hydrolyse.

k_1 a la même utilité que k_{obs} mais dépend de la concentration en catalyseur.

L'avancement de la réaction peut être exprimé par la relation suivante :

$$\log \frac{[\text{ester}]_0}{[\text{ester}]_t} = k_{obs} t$$

Après transformation par la loi de Beer-Lambert, on obtient :

$$\ln \frac{A_{inf} - A_0}{A_{inf} - A_t} = k_{obs} t$$

A_{inf} : Absorbance à l'instant $t \rightarrow \infty$

A_t : Absorbance à l'instant t du *p*-nitrophénol libéré

A_0 : Absorbance finale, correspondant à l'hydrolyse totale de l'ester

Les courbes obtenues peuvent être assimilées à des droites dont les pentes représentent les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 38.

Au cours de leur étude mécanistique sur la coopérativité des ions lanthanides et du peroxyde d'hydrogène dans l'hydrolyse du BNPP, TAKASAKI et CHIN [249] ont calculé la constante d'hydrolyse du BNPP en absence de métal et de peroxyde d'hydrogène. Cette constante d'hydrolyse correspond à la réaction non catalysée c'est-à-dire à la constante d'hydrolyse propre de l'ester k_0 . Le rapport (k_{rel}) entre les constantes de vitesse d'hydrolyse de pseudo-premier ordre et cette constante d'hydrolyse propre donne accès à l'accélération relative de la réaction en présence du catalyseur. On a :

$$k_{rel} = \frac{k_0}{k} \quad K_0 = 1,1 \cdot 10^{-11} \text{ s}^{-1}$$

Tableau 38 : Constantes de vitesses des réactions d'hydrolyse du BNPP [242a].

Contrôles et Complexes	Temps (s) (10 ²)	k_1 (s ⁻¹)	k_{rel}	Temps (s) (10 ²)	k_2 (s ⁻¹)	k_{rel}
36 -Cu ²⁺	0<t<1,80	9,55.10 ⁻⁴	8,7.10 ⁷	1,80<t<72	1,60.10 ⁻⁵	1,45.10 ⁶
Cu ²⁺	0<t<108	8,62.10 ⁻⁶	7,84.10 ⁵	648<t<972	5,69.10 ⁻⁸	5,2.10 ³
2 -Cu ²⁺	0<t<6	1,16.10 ⁻⁴	1,05.10 ⁷	54<t<234	1,20.10 ⁻⁵	1,09.10 ⁶
36 -Eu ³⁺	0<t<2,40	3,10.10 ⁻⁴	2,8.10 ⁷	3<t<900	2,10.10 ⁻⁶	1,90.10 ⁵
Eu ³⁺	0<t<702	6,45.10 ⁻⁷	5,96.10 ⁴	756<t<1638	2,39.10 ⁻⁷	2,2.10 ⁴
36 -Zn ²⁺	0<t<72	8,03.10 ⁻⁶	7,3.10 ⁵	90<t<144	1,8.10 ⁻⁷	1,6.10 ⁴
Zn ²⁺			Pas d'hydrolyse après 72h			

TAKASAKI et CHIN [249] ont montré par des mesures en RMN ³¹P que, lors de l'hydrolyse d'une mole de BNPP, il se libérait deux moles de *p*-nitrophénol et une mole de phosphate inorganique. Nous avons donc réalisé la courbe-étalon UV-vis; du *p*-nitrophénol (Figure 160) ce qui nous a permis de connaître les concentrations molaires de *p*-nitrophénol libérées dans le milieu. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 39.

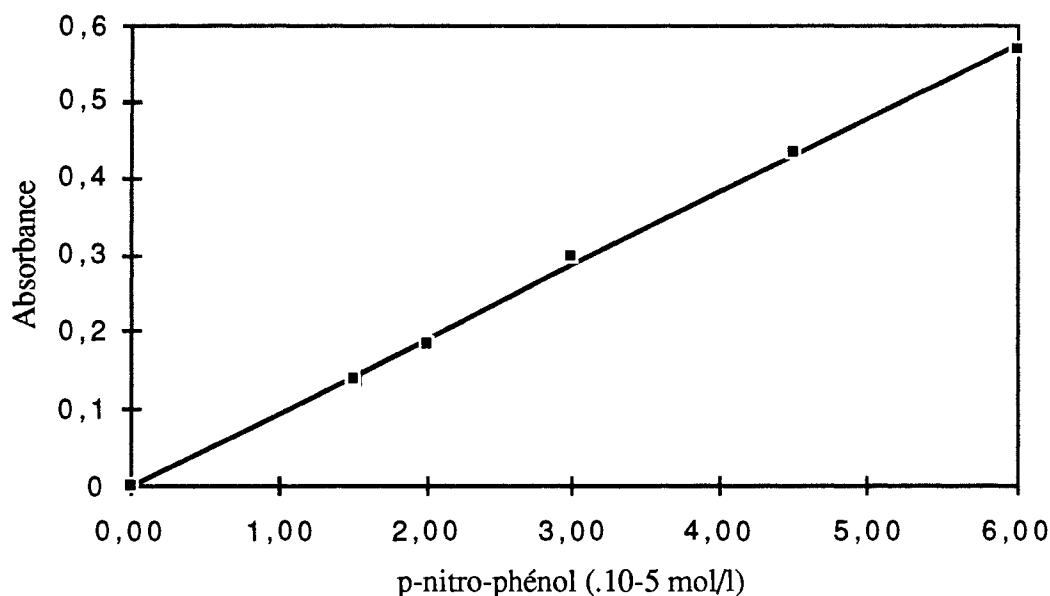


Figure 161 : Courbe d'étalonnage UV-Vis. du *p*-nitrophénol

Tableau 39 : Efficacité de l'hydrolyse du BNPP

	[<i>p</i> -nitrophénol] libéré (mol.L ⁻¹)	Pourcentage d'hydrolyse
Cu ²⁺	1,06.10 ⁻⁵	8,8
2 -Cu ²⁺	2,66.10 ⁻⁵	22
36 -Cu ²⁺	3,18.10 ⁻⁵	26,5
36 -Eu ³⁺	2,23.10 ⁻⁵	18,6
36 -Zn ²⁺	9,64.10 ⁻⁶	8

2-Analyse des résultats

Les courbes $A=f(t)$ obtenues en présence de cuivre montrent que le complexe de cuivre du dimère **36** est le plus efficace dans l'hydrolyse du BNPP. Le complexe de cuivre de la phénanthroline diamine **2** permet aussi l'hydrolyse du BNPP mais le phénomène est plus lent. Ceci est confirmé par les valeurs des constantes d'hydrolyse qui sont respectivement de $9,55 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et de $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ces résultats permettent de mettre en évidence le rôle important des cavités des CDs dans le dimère **36**. En effet, les deux CDs peuvent complexer les deux noyaux *p*-nitrophényles du BNPP et bloquer la molécule dans une position propice à l'hydrolyse.

En ce qui concerne la figure 160 qui rassemble les courbes $A=f(t)$ obtenues pour les différents complexes métalliques du dimère **36**, elles montrent là aussi une meilleure efficacité du complexe de cuivre par rapport aux autres. Le complexe d'euprômium a une efficacité moindre et celle du complexe de zinc (II) est très faible. L'inefficacité de la catalyse par le complexe de zinc peut probablement s'expliquer par une coordination différente de ce métal entre les différentes espèces en présence. Le zinc (II) seul n'entraîne aucune hydrolyse du BNPP même après 72h. Ceci est corroboré par la valeur des constantes d'hydrolyse calculées.

Dans tous les cas, les constantes d'hydrolyse obtenues avec le dimère **36** sont très supérieures à celles obtenues avec le métal seul. Par rapport à la réaction non catalysée, l'accélération induite par le complexe de cuivre est de $8,7 \cdot 10^7$ fois, celle induite par le complexe d'euprômium est de $2,8 \cdot 10^7$ fois donc trois fois inférieure. En présence du complexe de cuivre de la diamine **2**, la réaction est accélérée $1,05 \cdot 10^7$ fois donc elle est 8 fois moins rapide qu'avec le complexe de cuivre du dimère **36**. En présence de cuivre seul, la réaction n'est accélérée que 784000 fois donc elle est 111 fois moins rapide qu'en présence du dimère **36**. Ces résultats permettent d'affirmer que le BNPP est complexé dans les cavités des CDs et qu'il existe une coopérativité entre les deux cavités hydrophobes des CDs et le site de coordination métallique. La courbe-étalon UV-vis du *p*-nitro phénol a été réalisée et nous a permis de connaître la concentration maximum de *p*-nitrophénol libérée dans le milieu dans chaque cas. La concentration en BNPP présente dans le milieu est de $0,06 \cdot 10^{-3} \text{M}$, ceci implique que la concentration maximum de *p*-nitrophénol qui peut être présente dans le milieu (si l'hydrolyse est complète) est de $0,12 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Ceci nous a permis de constater que le BNPP n'est jamais complètement hydrolysé même dans le cas du complexe de Cu(II) du dimère **36** pourtant le plus efficace. Seules $3,18 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ sont libérées dans le milieu soit 26,5 %. Ce résultat est à rapprocher du fait que nous avons observé, dans tous les cas, une diminution de l'absorbance survenant au niveau du plateau de chaque courbe. Les cinétiques ont d'ailleurs été stoppées, à chaque fois au niveau de ce point. Cette diminution d'absorbance pourrait correspondre à la complexation du *p*-nitrophénol ou du phosphate inorganique libérés dans la cavité des CDs. Ceci expliquerait que l'hydrolyse ne soit jamais complète, le produit d'hydrolyse du BNPP prenant sa place dans les cavités des CDs. Il y a donc un phénomène d'inhibition de la réaction d'hydrolyse par les produits de la réaction.

Par ailleurs, les propriétés du complexe de cuivre du dimère **36** ont été testées sur un ADN circulaire. Les premiers résultats montrent que le complexe de Cu(II) de ce dimère peut cliver les liaisons phosphodiester d'un ADN et joue donc bien un rôle

d'endonucléase puisque l'hydrolyse dans ce cas peut ne se faire à partir d'une extrémité libre. D'autres essais sont évidemment nécessaires pour déterminer le mécanisme détaillé de l'hydrolyse. Des études seront également menées sur d'autres substrats (*e.g.* oligonucléotides) pour évaluer les propriétés de sélectivité d'hydrolyse de ces nouvelles molécules. Une réelle sélectivité dans le clivage des liaisons phosphodiester le long de la chaîne d'ADN est une propriété que nous rechercherons aussi *via* la modulation de la longueur des bras espaceurs entre le site catalytique et les sites de complexation hydrophobes des CDs.

3- Mécanisme de la réaction

TAGASAKI et CHIN [249] ont étudié le mécanisme de la réaction d'hydrolyse du BNPP par les ions lanthanides en présence de peroxyde d'hydrogène et ont montré que deux ions lanthanides étaient impliqués dans le mécanisme d'hydrolyse *via* une activation type acide de Lewis. Le rôle du peroxyde d'hydrogène est de placer les deux ions lanthanides suffisamment proches l'un de l'autre pour ponter le BNPP. Il pourrait agir aussi comme catalyseur basique ou nucléophile dans le clivage de la liaison phosphodiester. Pour l'ion cuivre (II), un tel mécanisme est aussi possible.

En présence d'un dimère de CDs, seul un ion lanthanide ou un ion cuivre est engagé dans le mécanisme d'hydrolyse et une seule molécule de peroxyde d'hydrogène.

L'état de transition proposé par BRESLOW est alors le suivant pour l'ion lanthane [215] (Figure 162) :

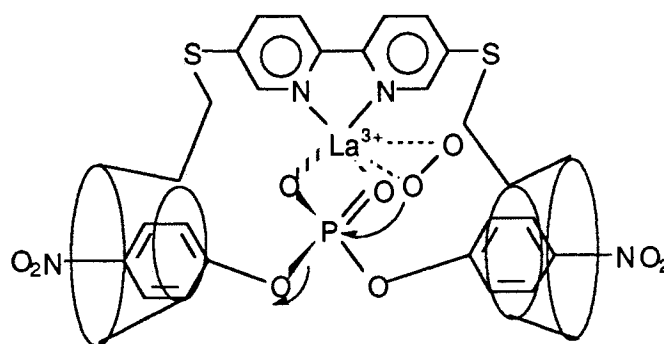


Figure 162 : Mécanisme d'hydrolyse du complexe de lanthane d'un dimère de CDs

Pour le cuivre (II) [247], l'état de transition proposé est analogue (Figure 163).

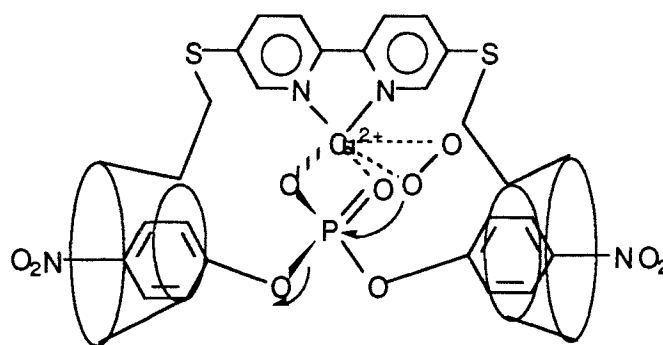


Figure 163 : Mécanisme d'hydrolyse du complexe de cuivre d'un dimère de CDs

Le dimère **36** possédant, à priori, les mêmes propriétés de coordination que ceux schématisés précédemment, nous pouvons raisonnablement considérer que dans notre cas, le mécanisme d'hydrolyse du BNPP est probablement identique à celui décrit par BRESLOW.

III- Etude par spectroscopie de fluorescence

DESCHENAUX *et al.* [250] ont étudié les propriétés photophysiques de complexes métalliques de dimères de CDs substitués par une 2,2'-bipyridine et ont montré que celles-ci étaient similaires à celles des complexes métalliques de 2,2'-bipyridine seuls. La présence des CDs n'a aucune influence sur les propriétés photophysiques du ligand.

Afin de savoir si le même phénomène se produisait avec nos molécules, nous avons effectué des mesures de fluorescence sur les dimères **36** et **37** et sur l'ensemble de leurs complexes métalliques ainsi que sur la phénanthroline diamine **2**.

Le spectre d'émission à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$ de la phénanthroline diamine **2** ($C=1,136.10^{-5}\text{M}$) dans l'eau présente deux maxima à $\lambda=347\text{nm}$ et $\lambda=368\text{nm}$ et deux épaulements à $\lambda=357\text{nm}$ et $\lambda=385\text{nm}$ (Figure 164). Pour la même longueur d'onde d'excitation, le spectre d'émission de fluorescence du dimère **36** dans l'eau ($C=1,87.10^{-5}\text{M}$) présente deux maxima à $\lambda=347\text{nm}$ et $\lambda=370\text{nm}$ donc identique au composé **2** (Figure 165). Nous retrouvons donc ici un phénomène identique à celui observé en spectroscopie UV à savoir que le spectre d'émission de fluorescence du dimère **36** correspond à celui de la phénanthroline diamine **2**.

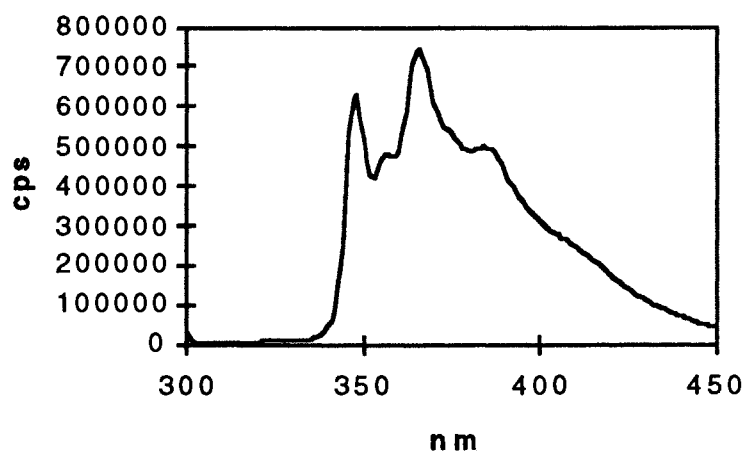


Figure 164 : Spectre d'émission de la phénanthroline diamine **9** dans l'eau à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$.

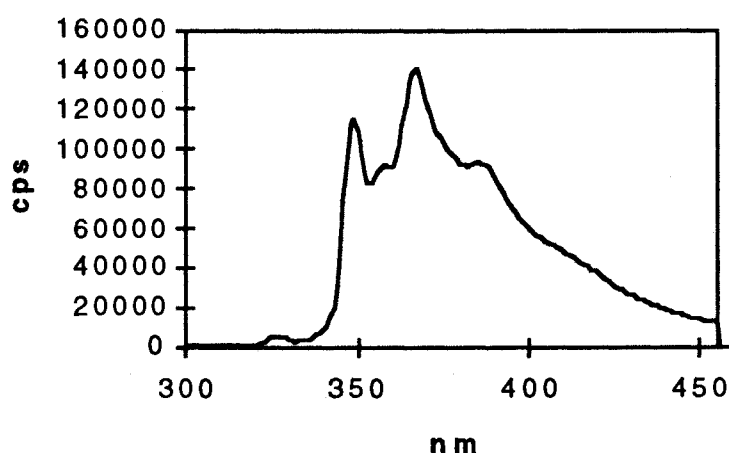


Figure 165 : Spectre d'émission du dimère **36** dans l'eau à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

Les spectres d'émission de fluorescence des complexes métalliques du dimère **36** ne présente pas de différences avec ceux de la molécule non complexée, ceci est aussi vrai pour le complexe de ruthénium. Dans ce cas, la spectroscopie de fluorescence ne constitue pas une bonne méthode pour mettre en évidence la complexation du dimère **36**. A titre d'exemple, nous présenterons le spectre d'émission du complexe de cuivre du dimère **36** réalisé dans l'eau ($C=8,79.10^{-6}\text{M}$) (Figure 166).

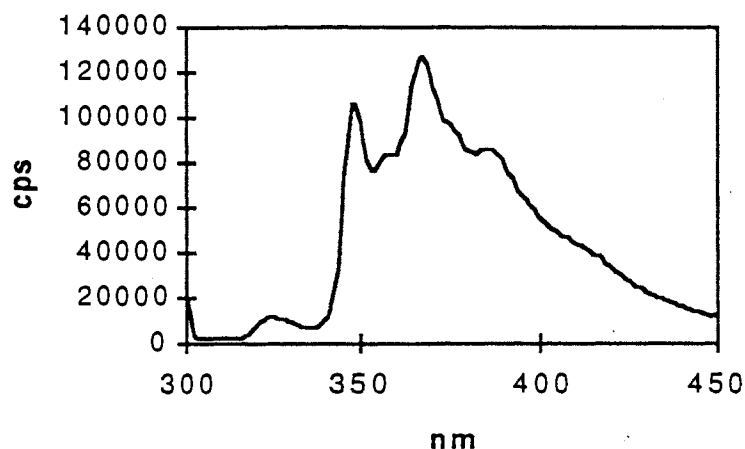


Figure 166 : Spectre d'émission du complexe de cuivre du dimère **36** dans l'eau à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

Le spectre d'excitation de la diamine **2** dans l'eau pour $\lambda_{em}=366\text{nm}$ présente deux maxima à $\lambda=295\text{ nm}$ et $\lambda=323\text{ nm}$ (Figure 167). Des maxima similaires ($\lambda=293\text{ nm}$ et $\lambda=326\text{ nm}$) sont retrouvés au niveau des spectres d'excitation à $\lambda_{em}=366\text{nm}$ du dimère **36** et de ses complexes métalliques. A titre d'exemple, les figures 168 et 169 présentent les spectres obtenus pour le dimère **36** et son complexe de cuivre.

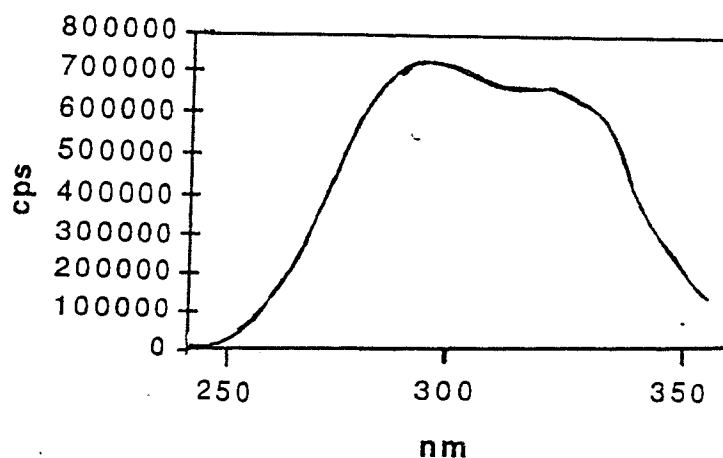


Figure 167 : Spectre d'excitation de la diamine **2**

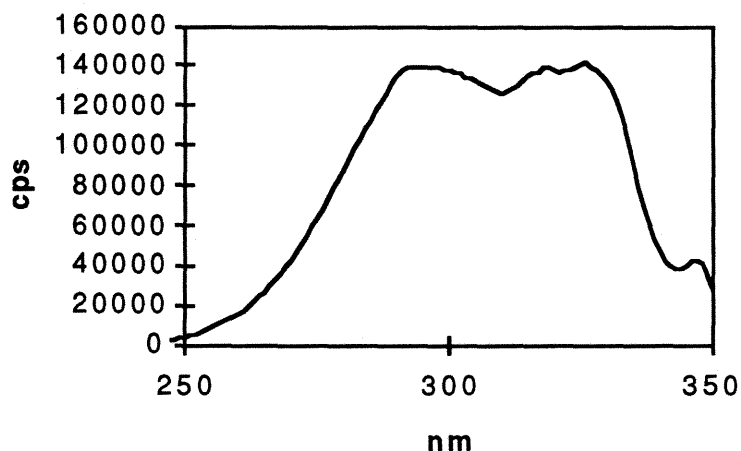


Figure 168 : Spectre d'excitation du dimère **36** à $\lambda_{em}=366nm$

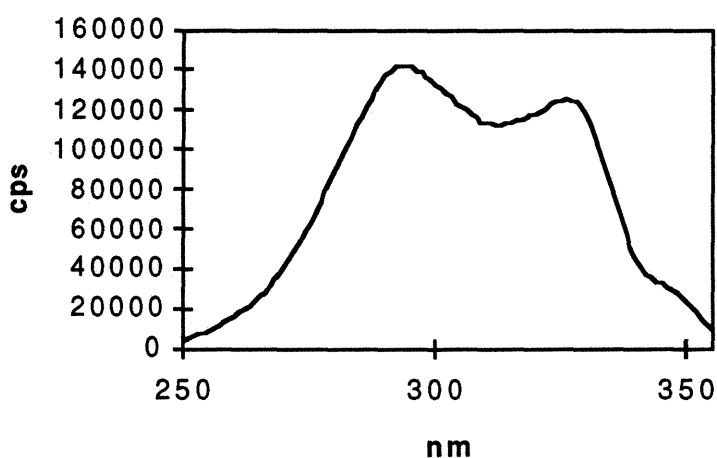


Figure 169 : Spectre d'excitation du complexe de cuivre (II) du dimère **36** à $\lambda_{em}=366nm$

Il est à noter que le spectre d'excitation des composés ne retranscrit pas exactement le spectre d'absorbance. En effet, tandis que le spectre d'absorbance révèle deux maxima à $\lambda=232\text{ nm}$ et $\lambda=284nm$, le spectre d'exitation montre deux maxima, déplacés vers le rouge, à $\lambda=295nm$ et $\lambda=323nm$.

Les mêmes remarques peuvent être faites à propos des caractéristiques de la fluorescence du dimère méthylé **37** et de ses complexes métalliques. A titre d'exemple, nous présentons les spectres obtenus pour le dimère **37** et de son complexe de cuivre (II) (Figures 170 à 173). Néanmoins, une bande de transfert de charge peut être observée sur la figure 171 vers $\lambda_{em}=320nm$ ce qui met en évidence la complexation du cuivre (II). Les mesures ont été réalisées dans l'acétonitrile pour des concentrations respectives de $1,55.10^{-5}M$ et de $7,35.10^{-6}M$.

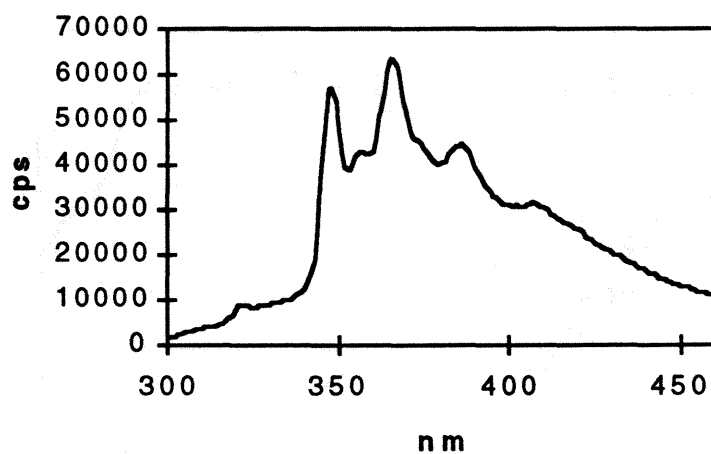


Figure 170 : Spectre d'émission de fluorescence du dimère **37** à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

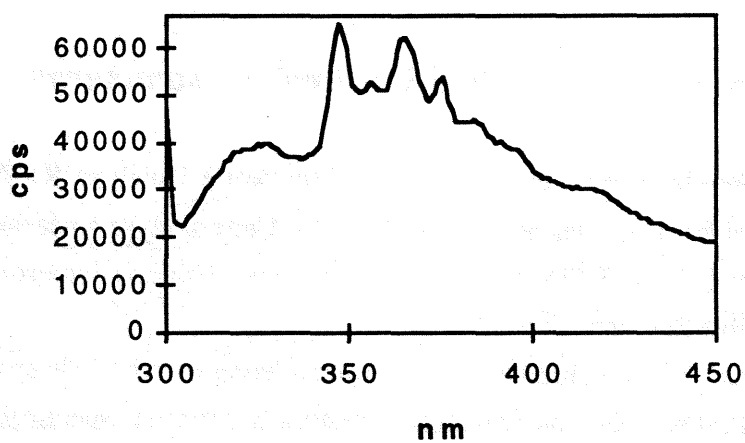


Figure 171 : Spectre d'émission de fluorescence du complexe de cuivre (II) du dimère **37** à $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

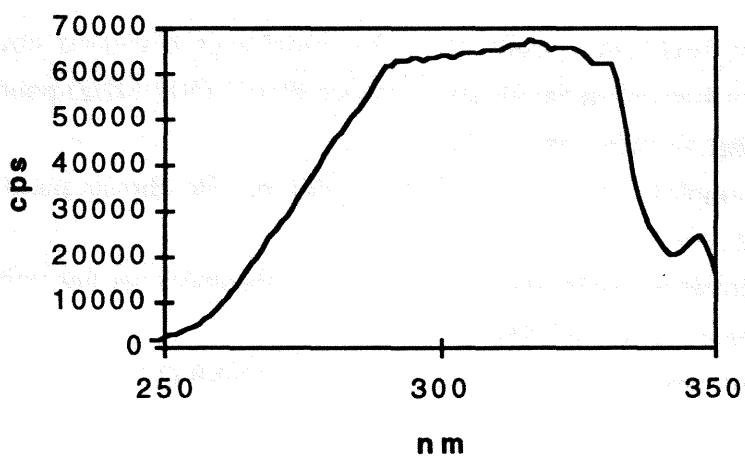


Figure 172 : Spectre d'excitation de fluorescence du dimère **37** à $\lambda_{em}=366\text{nm}$

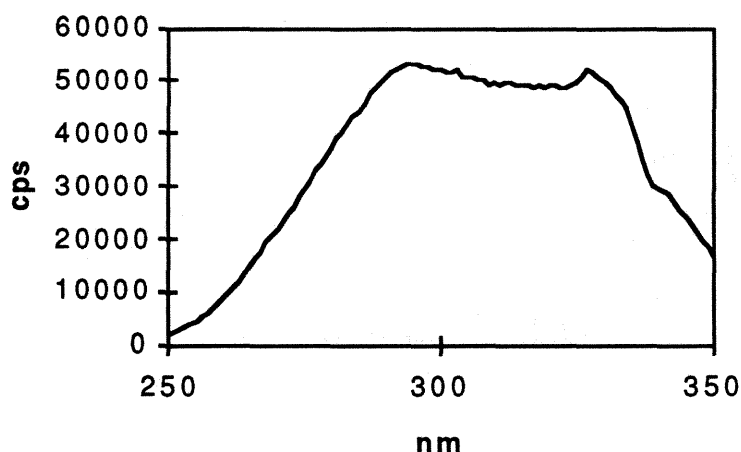


Figure 173 : Spectre d'excitation de fluorescence du complexe de cuivre du dimère **37** à $\lambda_{em}=366$ nm

IV- Spectroscopie de RMN 1H : Analyse structurale

Nous développerons en détail dans cette partie l'analyse RMN de quelques exemples parmi les nouvelles molécules obtenues. Cette analyse a nécessité l'emploi de plusieurs techniques de RMN bidimensionnelles afin d'obtenir l'interprétation la plus complète possible des signaux observés.

Cette interprétation requiert généralement l'enregistrement de spectres de type : COSY et COSY-DQF (Double Quantum Filtration Correlation Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy), ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) et l'enregistrement de spectres en mode transfert de polarisation tels que les spectres HOHAHA (Homonuclear, Hartmann, Hahn) ou TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).

La complexité des structures et les problèmes d'analyse nous ont conduit également à utiliser des appareils de puissance élevée (500 MHz) pour permettre une interprétation des spectres enregistrés.

Les exemples analysés dans cette section ont été choisis parmi trois familles moléculaires, à savoir :

- les dérivés persilylés des α -, β - et γ -CDs substituées par une unité galactose,
- les phénantrolyl-bis-CDs,
- les complexes de coordination des phénantrolyl- β -CDs.

1- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD 42

Les interactions que l'on peut attendre d'une RMN, en solution, sont résumées dans la figure suivante :

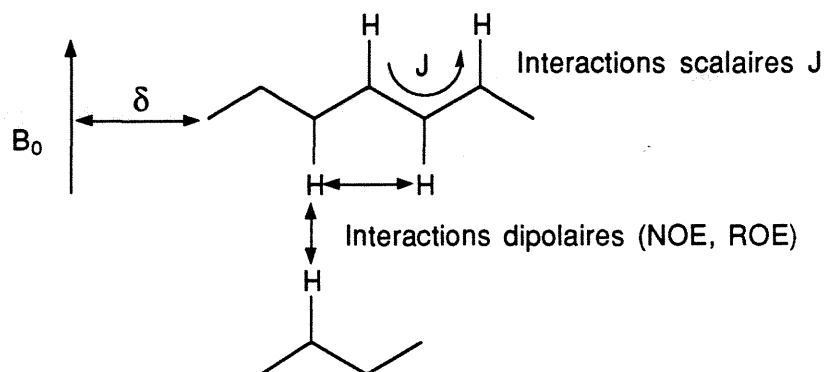


Figure 174 : Représentation schématique des interactions de spins en RMN.

Deux situations limites peuvent théoriquement se présenter dans notre cas, elles concernent la position de l'unité thiogalactose par rapport à la cyclodextrine comme le montrent les représentations simplifiées suivantes (Figure 175) :

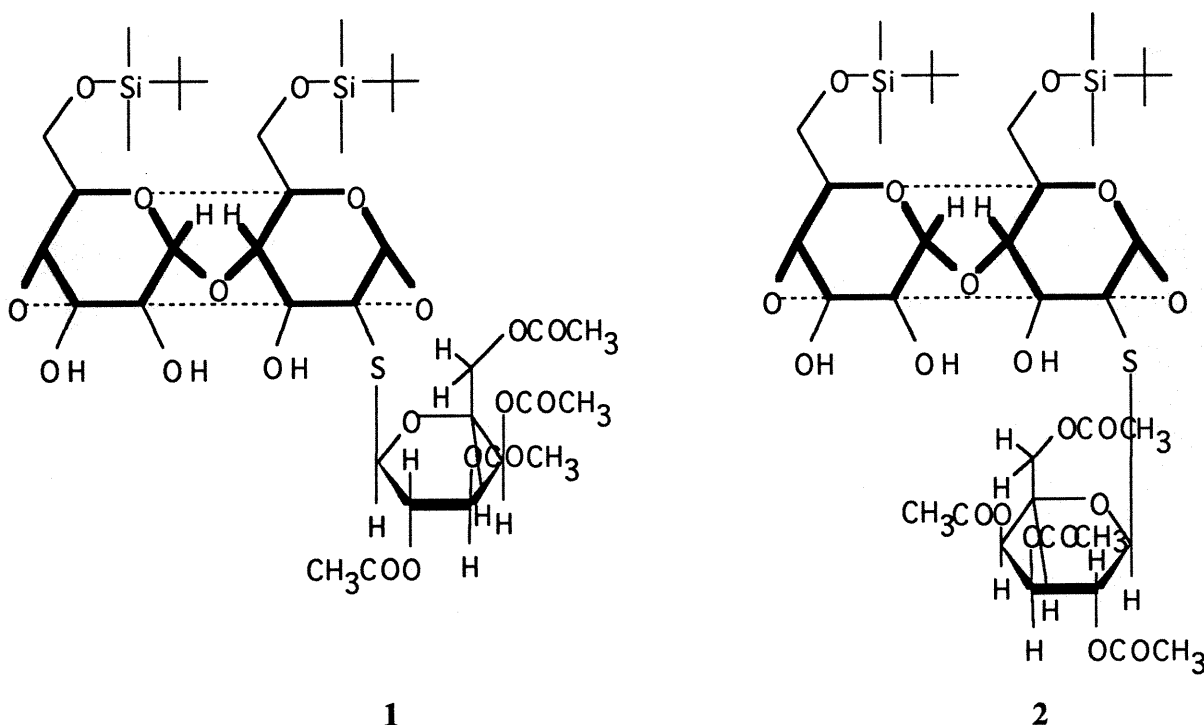


Figure 175 : Positions possibles de l'unité galactose par rapport à la CD.

L'examen de la carte de COSY-DQF et du cycle 1D permet d'attribuer les déplacements chimiques des principaux protons de la molécule.

En première analyse, on peut distinguer facilement le signal du proton anomérique H1 de l'unité thiogalactose à 5,15 ppm; à 4,95 ppm le proton anomérique de l'unité glucose substituée de la cyclodextrine et à 4,88 ppm les protons anomériques des unités non substituées de la β -CD. L'attribution des protons du groupe silyle et des acétates est faite directement à partir du spectre 1D, soit : δ $(\text{CH}_3)_2\text{-Si}$ à 0,00 ppm ; δ $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ à 0,85 ppm ; $\text{CH}_3\text{C=O}$ à 1,25 ppm.

Les principales interactions scalaires des systèmes couplés (J^3), dans les trois principales parties de la molécule, peuvent être déterminées à partir de la carte COSY-DQF.

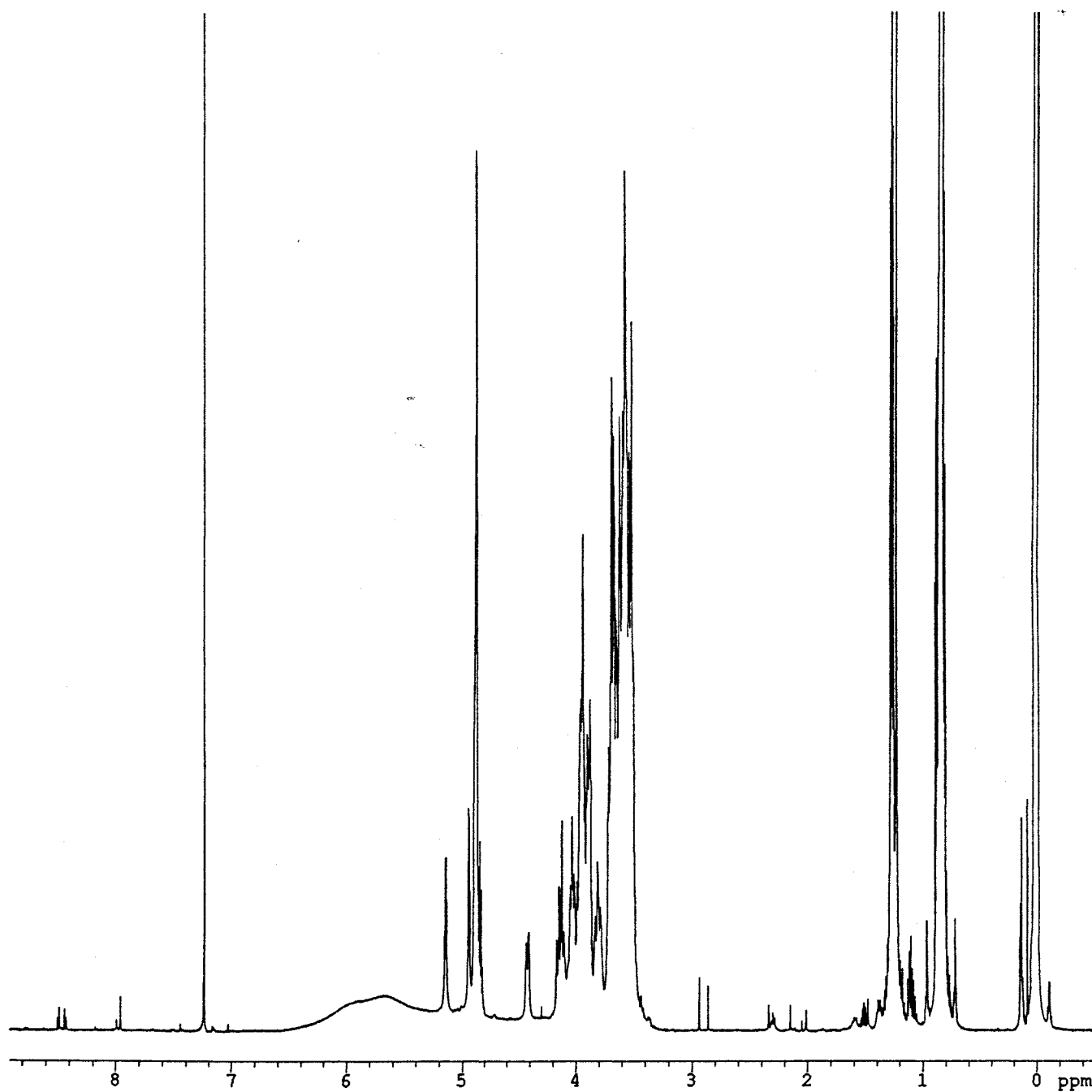


Figure 176 : Spectre RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*- butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42**

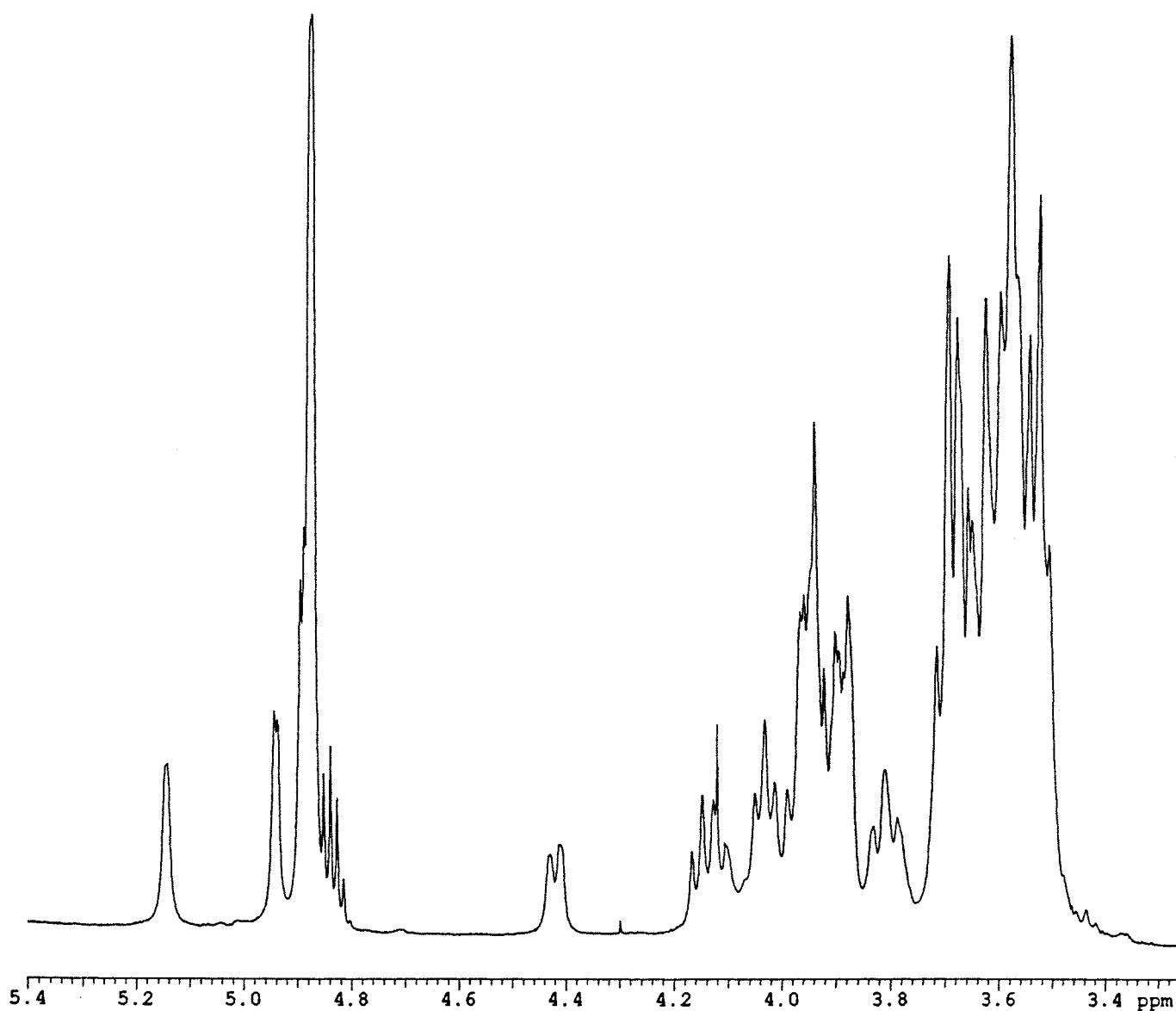


Figure 177 : Spectre RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*- butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** (agrandissement entre 5,4 et 3,35ppm)

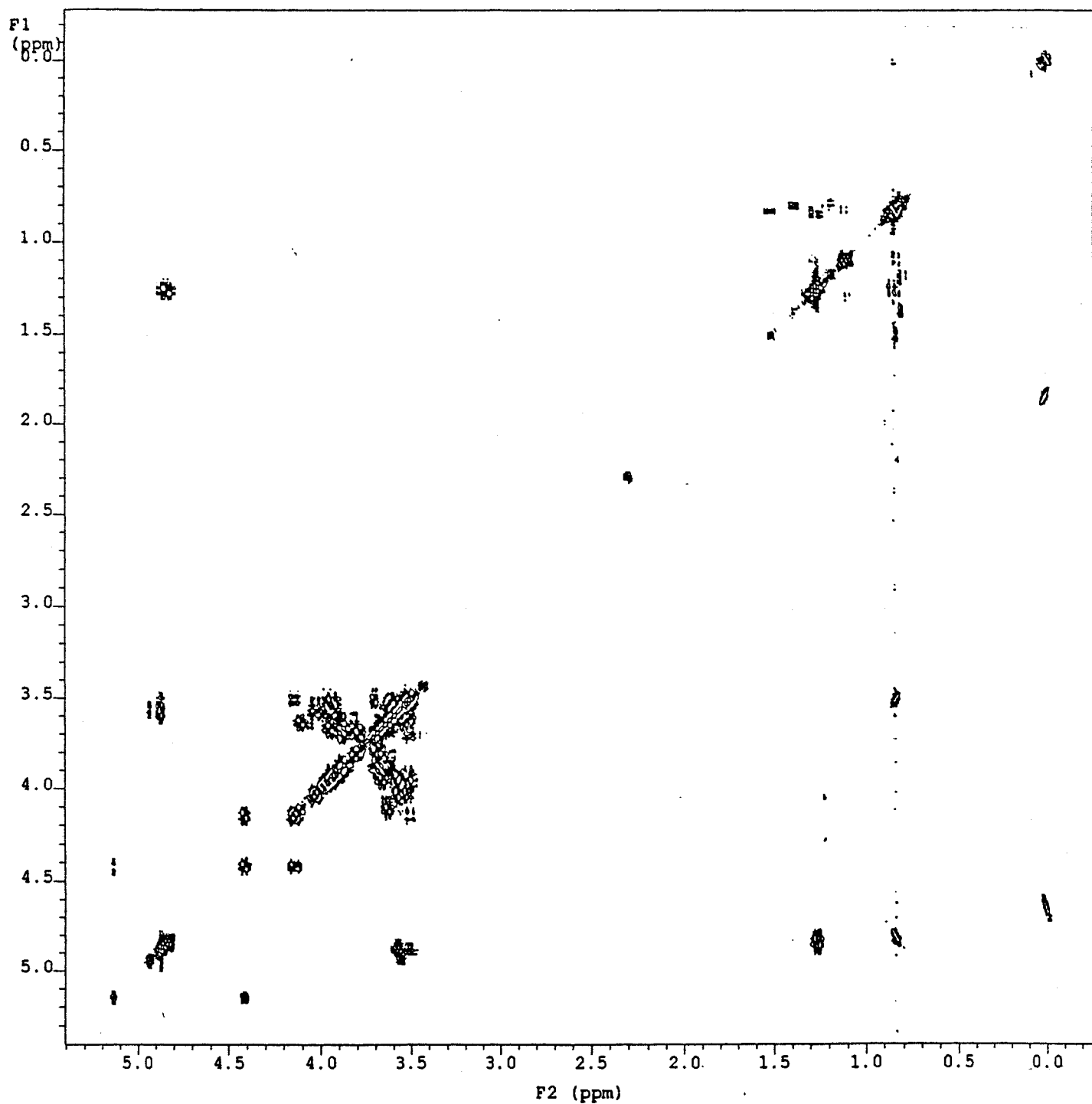


Figure 178 : Corrélation COSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD42

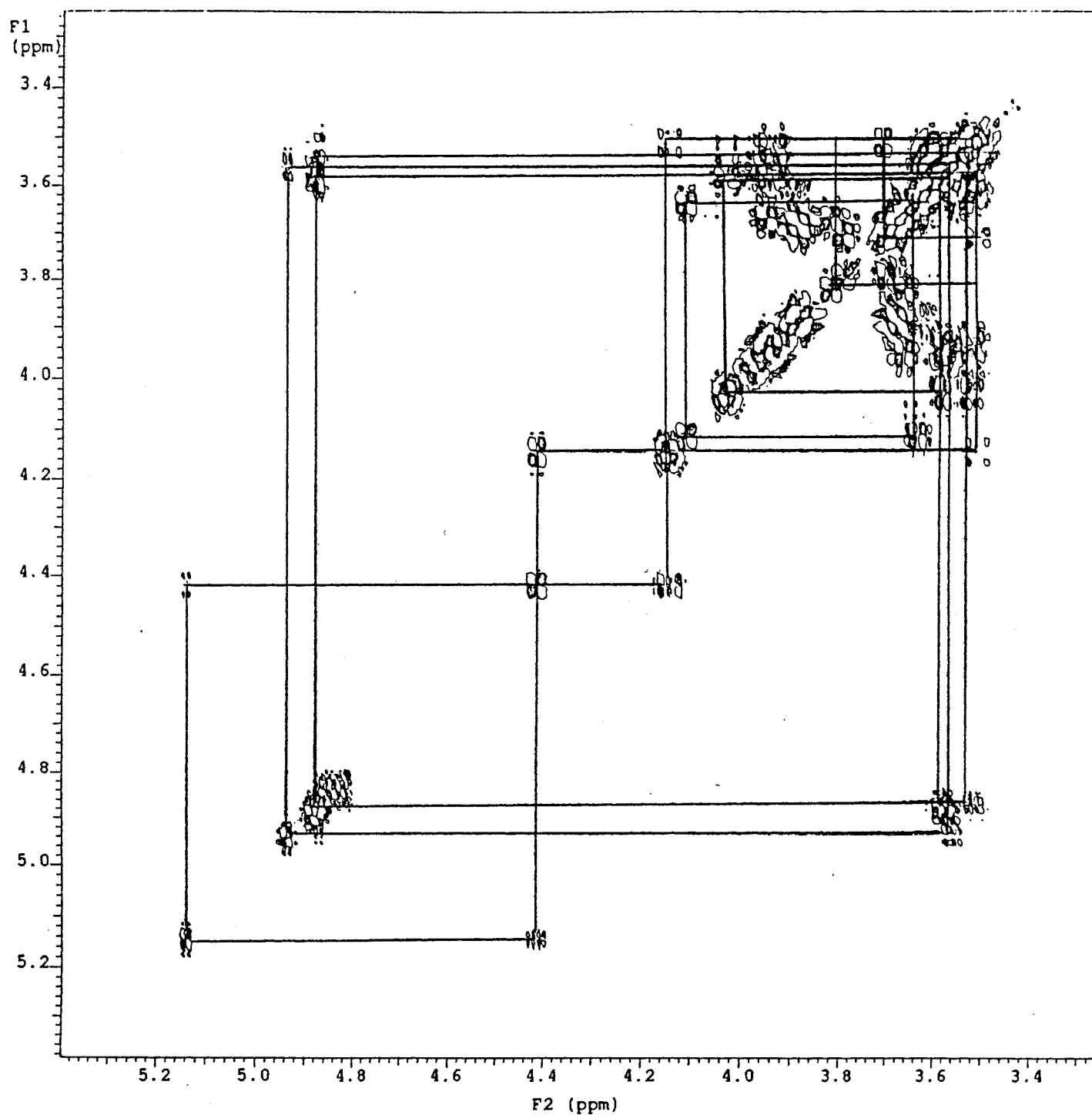


Figure 179 : Corrélation COSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm).

Les déplacements chimiques concernant les protons de l'unité thiogalactose sont les suivants : δH_2 à 4,42 ppm ; δH_3 à 4,15 ppm ; δH_5 à 3,70 ppm ; δH_4 à 3,50 ppm.

- Ceux de l'unité substituée de la cyclodextrine sont les suivants :

δH_3 à 3,94 ppm ; δH_2 à 3,58 ppm.

- Ceux les autres unités de la β -cyclodextrine sont les suivants :

δH_3 à 4,20 ppm ; δH_5 à 3,82 ppm ; δH_2 à 3,58 ppm.

L'attribution correcte des différents résidus est confirmée par le spectre

TOCSY

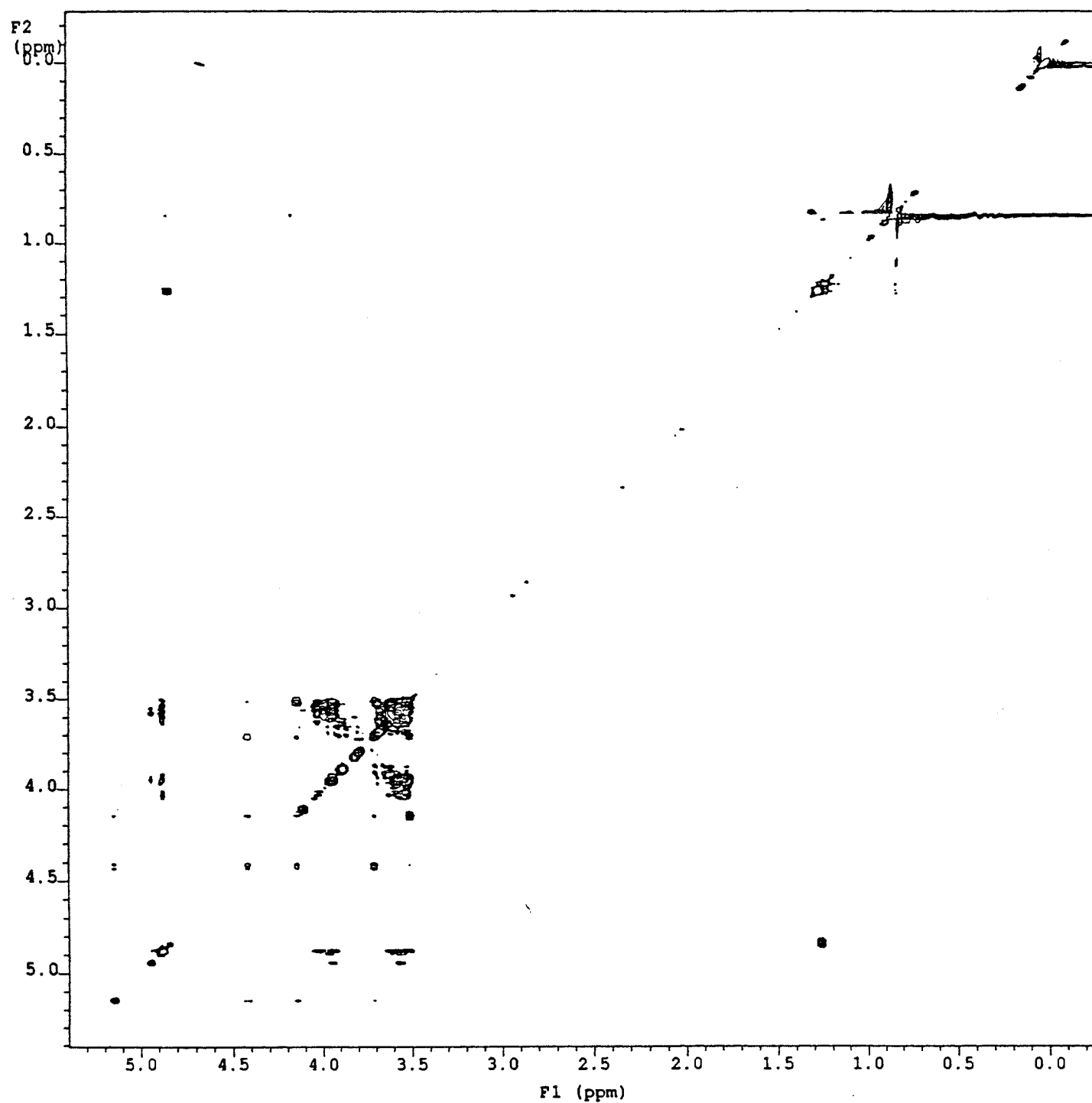


Figure 180: Corrélation TOCSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD₄₂

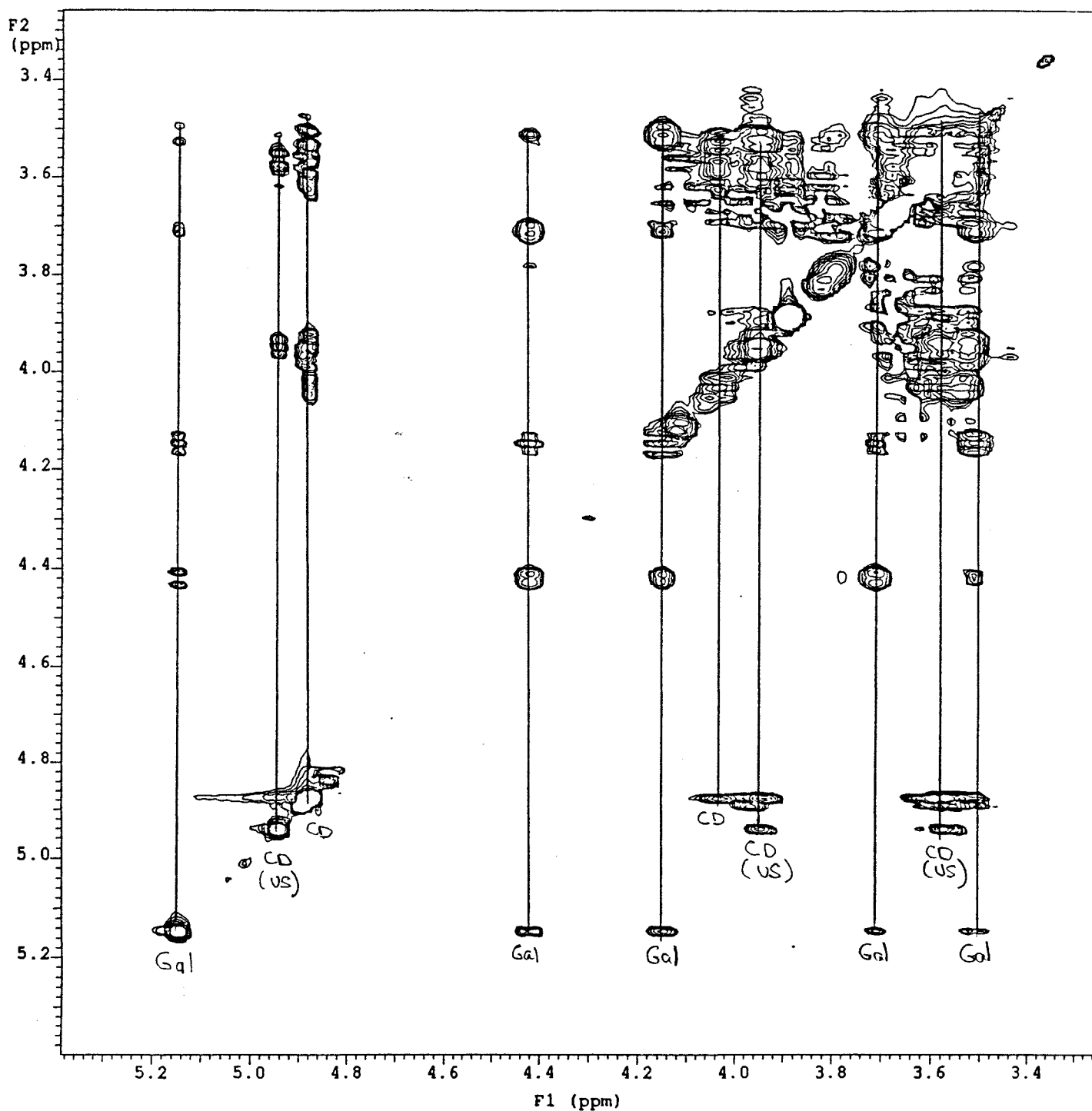


Figure 181: Corrélation TOCSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm).

- Les corrélations et l'identification des différents résidus sont anotées sur la carte, on voit nettement apparaître les relais entres H₁ et H₃, H₂ et H₄, H₃ et H₅, H₁ et H₄ dans l'unité thiogalactosyl et les relais entre H₁ et H₃ dans l'unité substituée de la cyclodextrine ou celui des unités non substituées.

Le domaine à champ fort entre 4,00 ppm et 3,50 ppm, avec de nombreux signaux croisés et relais, ne peut pas être analysé directement. Une analyse séparée et l'emploi de fonctions filtres (fonctions d'apodisation), seraient nécessaires de même que l'utilisation de temps de mixages plus courts pour permettre une suppression partielle ou totale des signaux-relais.

L'analyse des cartes NOESY et ROESY-2D montre de nombreuses corrélations dipolaires entre les protons de l'unité thiogalactose et de l'unité glucose substituée de la cyclodextrine.

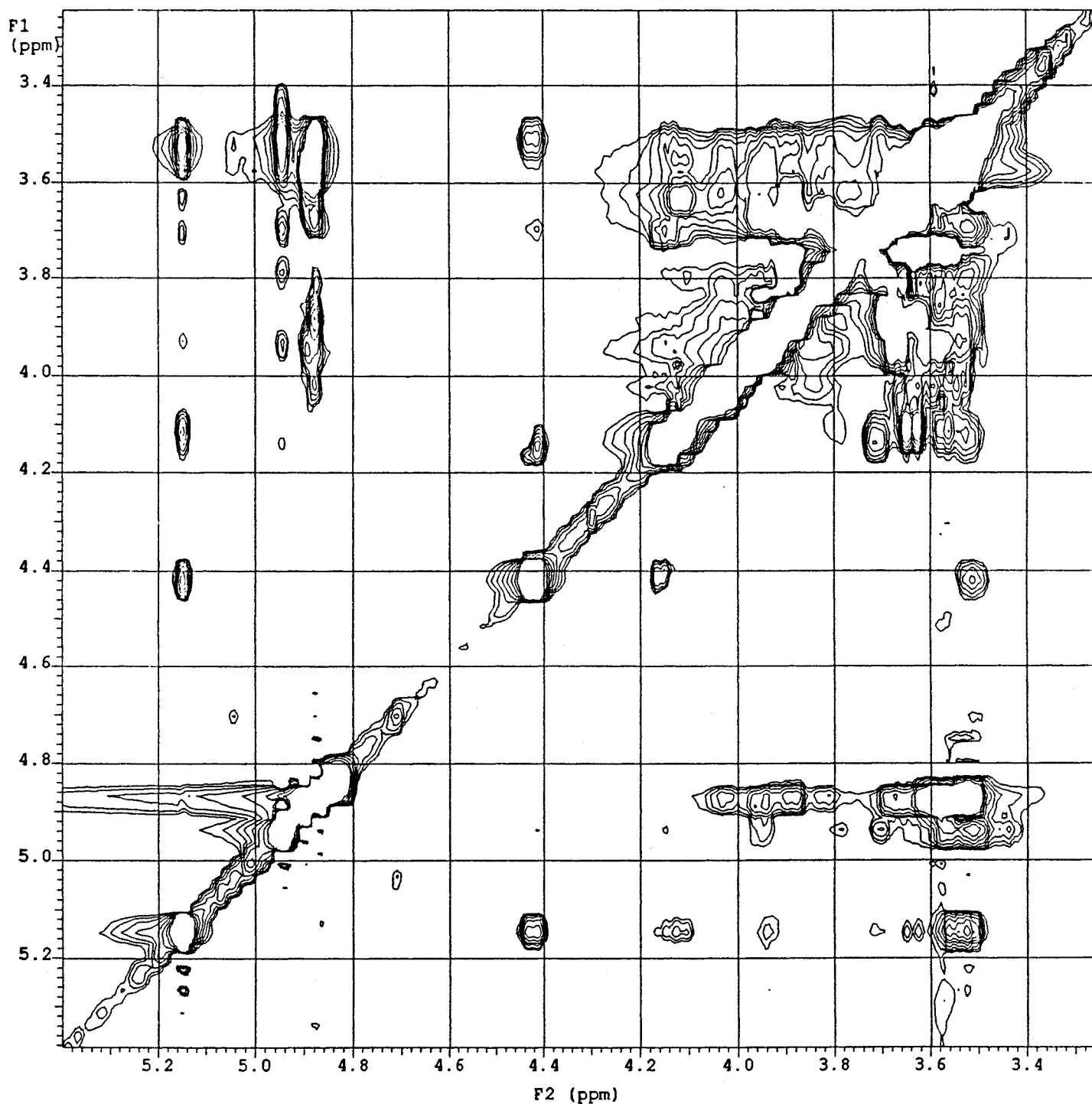


Figure 182: Corrélation NOESY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm).

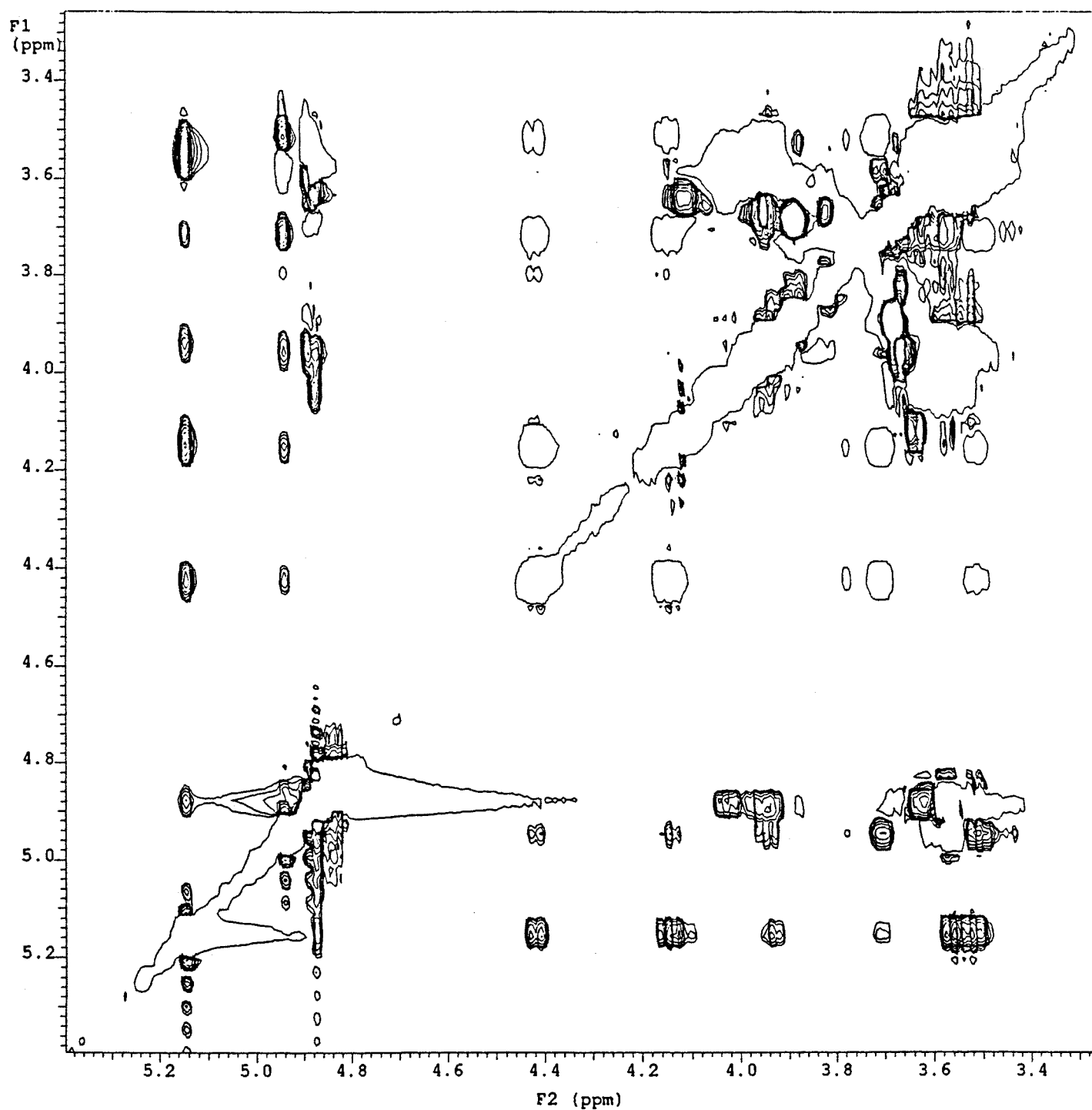
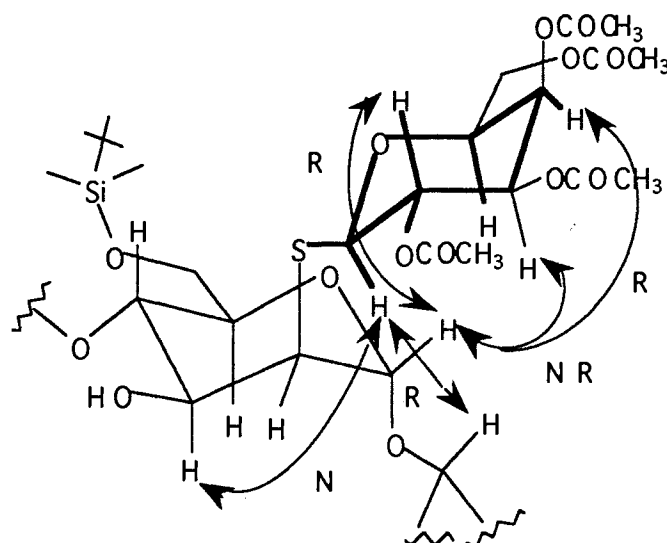


Figure 183: Corrélation ROESY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthyl-silyl)- β -CD **42** (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm).

Les effets NOE et ROE des protons vicinaux attendus sont naturellement très intenses, néanmoins, il existe des interactions dipolaires significatives entre les protons de l'unité thiogalactosyl et ceux de l'unité substituée de la cyclodextrine. Nous avons reporté les principales interactions dans le schéma ci-dessous, qui représente la conformation la plus probable entre la cyclodextrine et l'unité thiogalactose en position 2.



N=NOE
R=ROE

NOE	H1 (US)	→	H3 (Gal)
NOE	H3 (US)	→	H1 (Gal)
ROE	H3 (Gal)	→	H1 (US)
	H1 (US)	→	H2 (Gal)
	H1 (US)	→	H4 (Gal)

US : Unité Substituée

Figure 184 : Représentation schématique, numérotation atomique et interactions dipolaires significatives entre les protons de l'unité thiogalactose et la cyclodextrine.

Comme le montre la carte ROESY (temps de mixage = 300 ms), les interactions entre les protons de l'unité thiogalactosyle sont relativement intenses et multiples. Ce résultat semble plutôt en faveur d'une position légèrement externe de l'unité thiogalactose par rapport à la cavité de la cyclodextrine donc proche d'une situation de type **1** (voir Figure 175). Une confirmation de notre analyse conformationnelle serait efficacement

relayée par une étude faisant appel aux techniques de modélisation moléculaire (en cours d'étude).

2- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Pentakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- α -CD 41

Les spectres TOCSY et NOESY montrent les mêmes interactions que celles définies pour le dérivé β -CD 42 ce qui permet d'avancer l'hypothèse d'une conformation proche de celle rencontrée avec ce dérivé. Les déplacements chimiques pour le dérivé 41 sont rassemblés dans le tableau suivant :

Protons	déplacement (δ , ppm)
H ₁ Gal	5,10
H ₂ Gal	4,40
H ₃ Gal	4,20
H ₄ Gal	3,70
H ₁ (CD, US)	4,95
H ₁ (CD, UNS)	4,90
H ₂ (CD, UNS)	3,60
(CH ₃) ₂ -Si	0,2
(CH ₃) ₃ -C	0,9
CH ₃ -COO	1,30

US : unité substituée UNS : unité non substituée

3- Analyse RMN ^1H de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- γ -CD 43

Les cartes 2D de cette molécule étant beaucoup moins bien résolues, il ne nous a pas été possible d'assigner tous les protons de la molécule. Néanmoins, les déplacements chimiques de ceux que nous avons pu assigner sont les suivants :

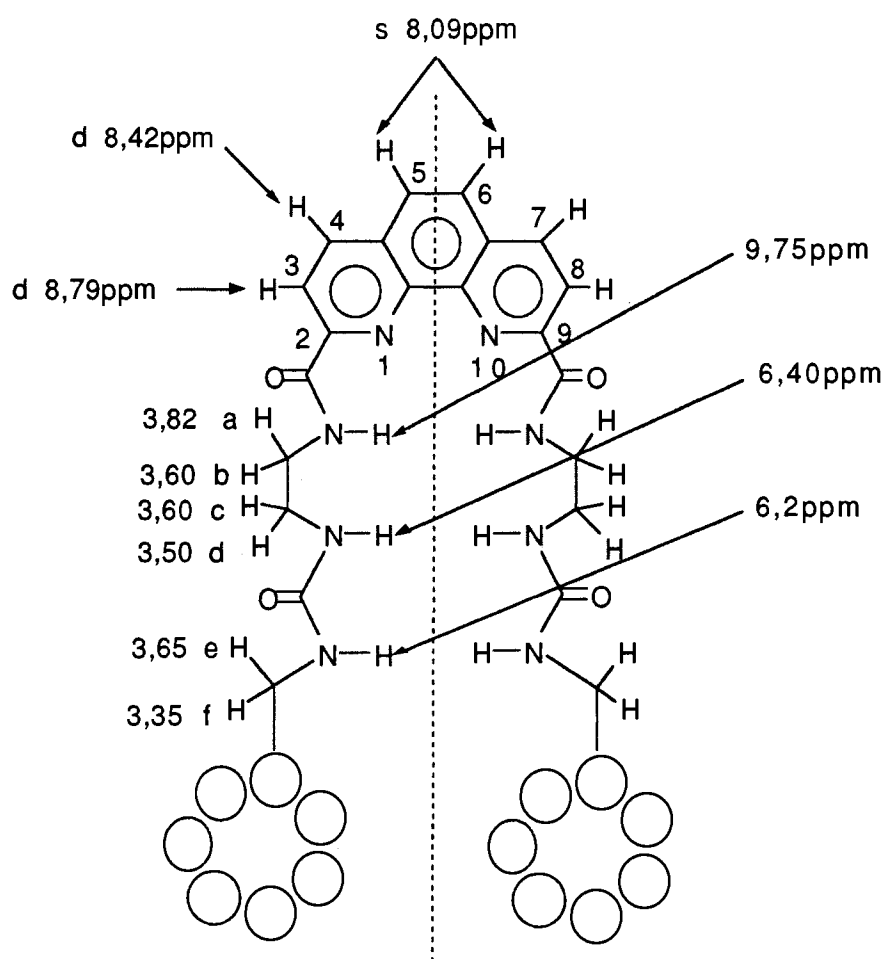
CH ₃ CO :	δ = 1,25ppm
(CH ₃) ₃ -C :	δ = 0,85ppm
(CH ₃) ₂ -Si :	δ = 0,15ppm
H ₁ (CD US) :	δ = 4,95ppm
H ₁ (CD UNS) :	δ = 4,90ppm

4- Analyse RMN ^1H des dimères de phénantrolyl- β -CDs :

*a- Cas de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36***

Nous avons analysé en détail les spectres 1D et 2D de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36**

L'examen du spectre 1D de cette molécule nous a permis, en première analyse, d'assigner directement les protons de la partie aromatique (phen), les NH des groupements urée et les protons anomériques H1 qui résonnent à champ faible dans la partie peu couplée du spectre. Les déplacements chimiques des protons non cités sont donnés dans la représentation schématique de la molécule (Figure 185):



Autres déplacements chimiques :

H1 (unités non substituées)=5,10ppm

H1 (unité substituée)=5,00ppm

H2 (CD) =3,65ppm

H4 (unité substituée)=4,20ppm

H6 (unité substituée)=3,10ppm

Figure 185 : Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère **36**

Les déplacements chimiques de la section à champ fort, fortement couplée ont nécessité, comme précédemment, l'emploi d'une série de techniques 2D (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY).

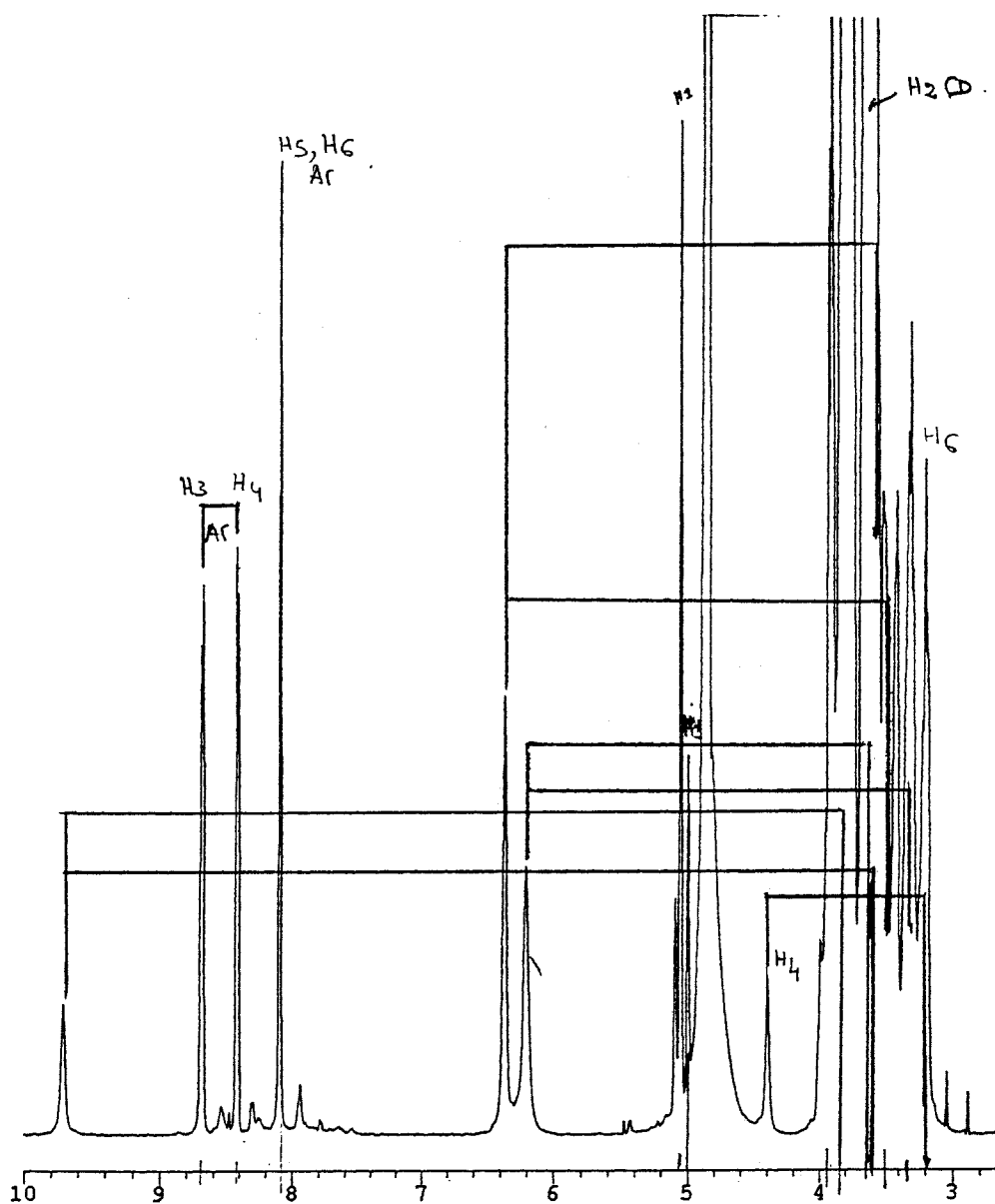


Figure 186.: Spectre 1D (500MHz, D₂O) de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36**

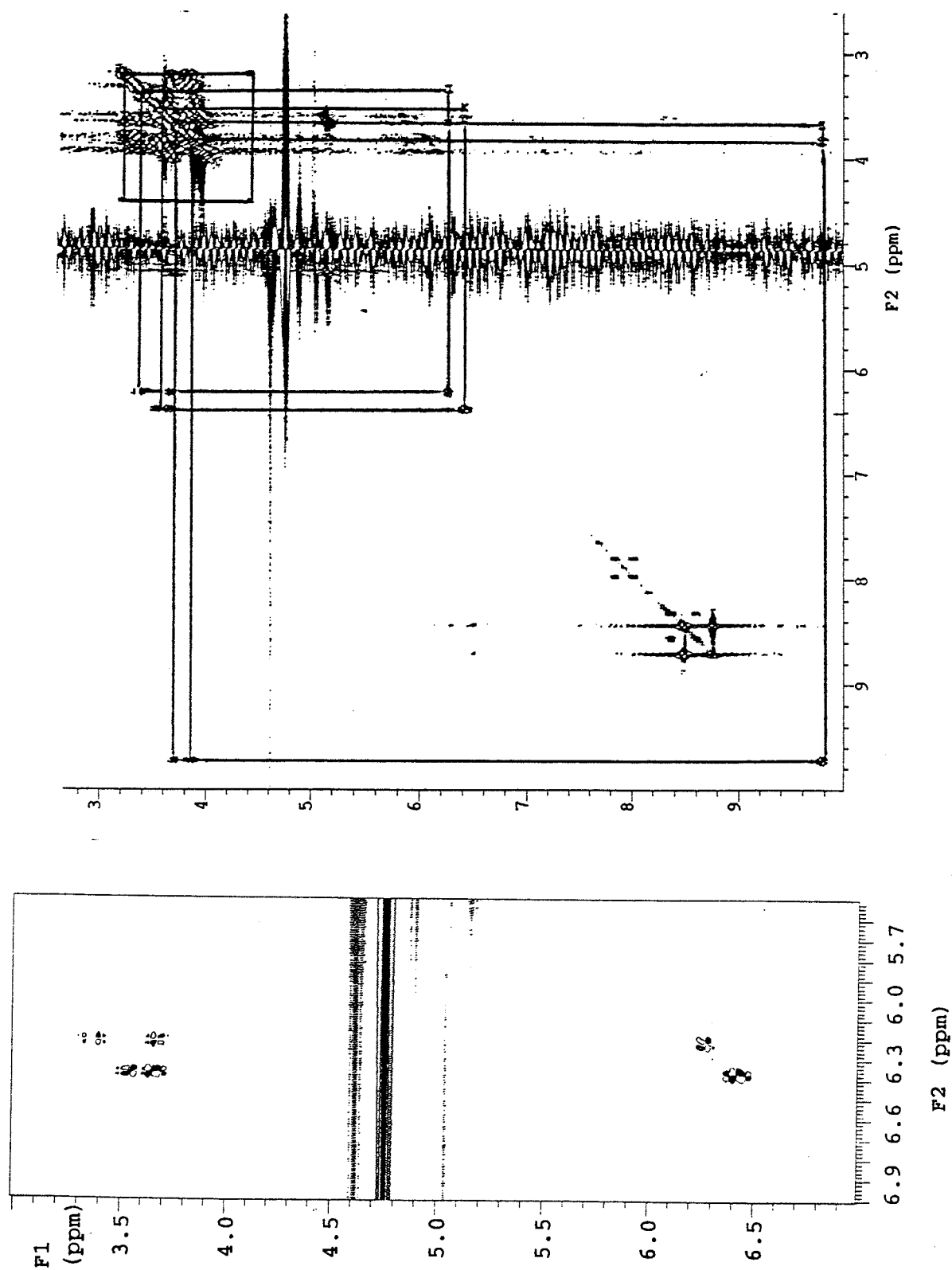


Figure 187 : Corrélations COSY (H-H) de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36** (+agrandissement).

L'analyse des cartes TOCSY et NOESY montrent des corrélations importantes entre les NH des fonctions urées et les protons méthylènes des chaînes éthylène diamine et les protons H6 de l'unité substituée de la β -CD. Ces corrélations sont reportées sur les cartes correspondantes ci-dessous :

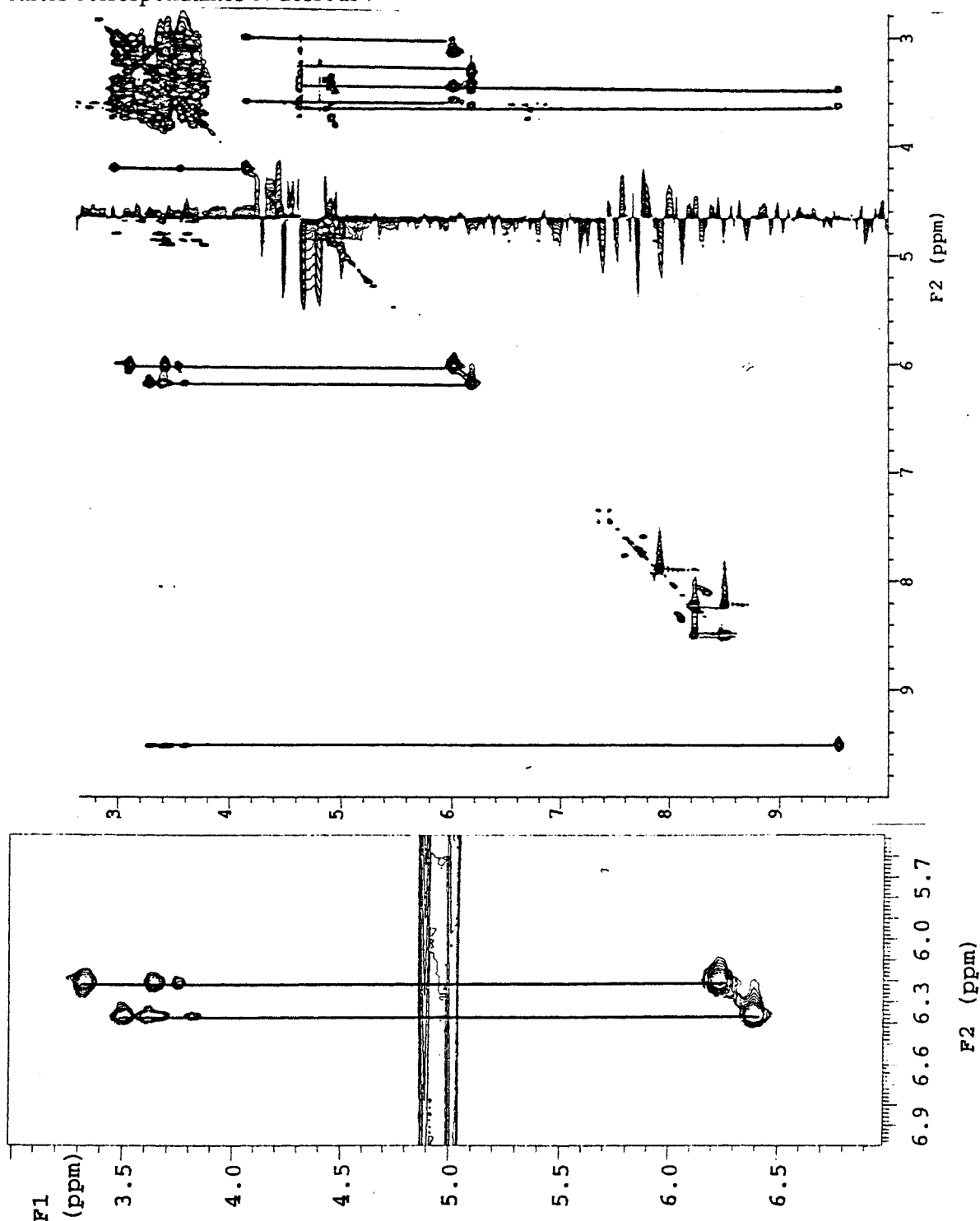


Figure 188: Corrélation TOCSY pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36** (+agrandissement).

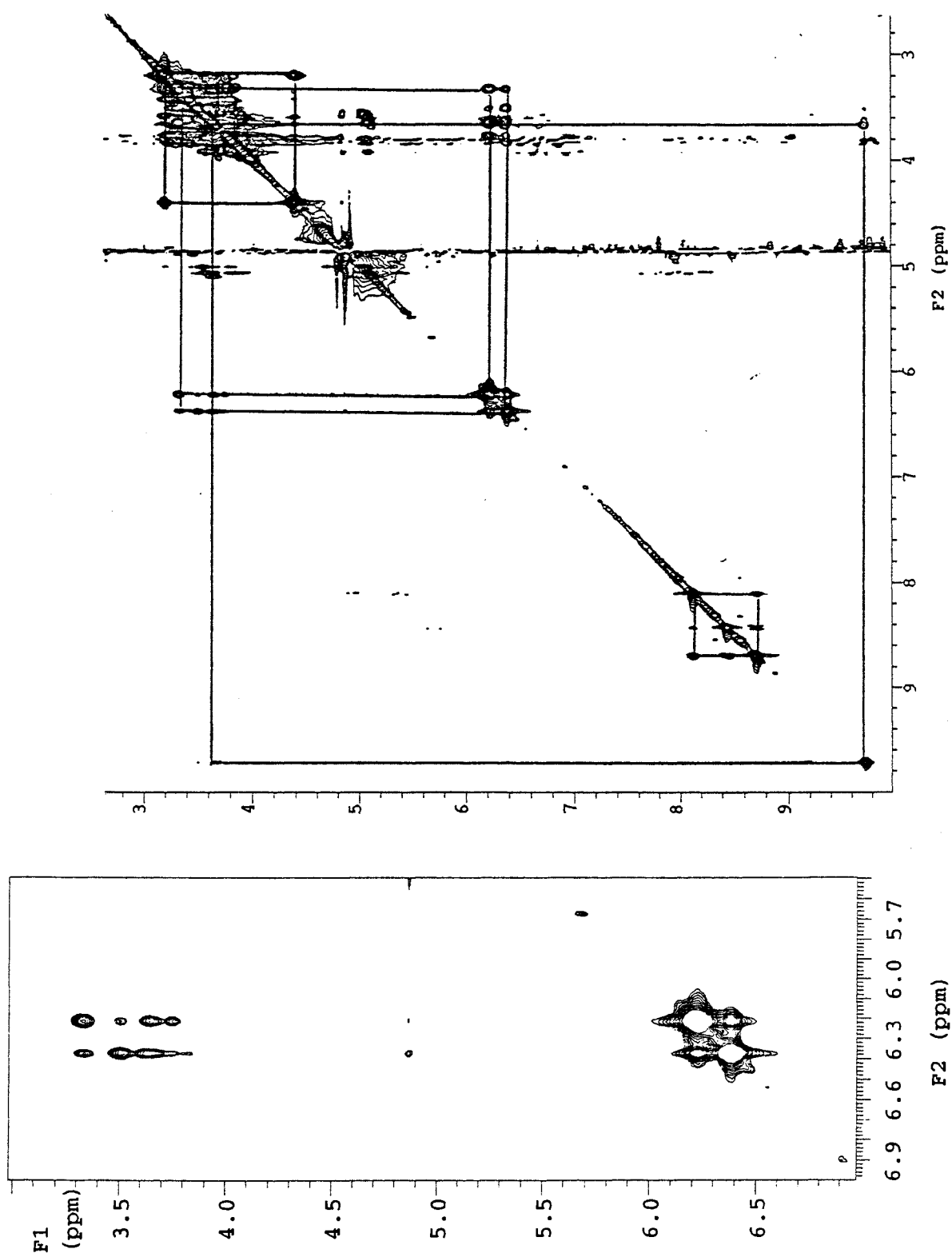


Figure 189: Corrélation NOESY pour pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36** (+ agrandissement).

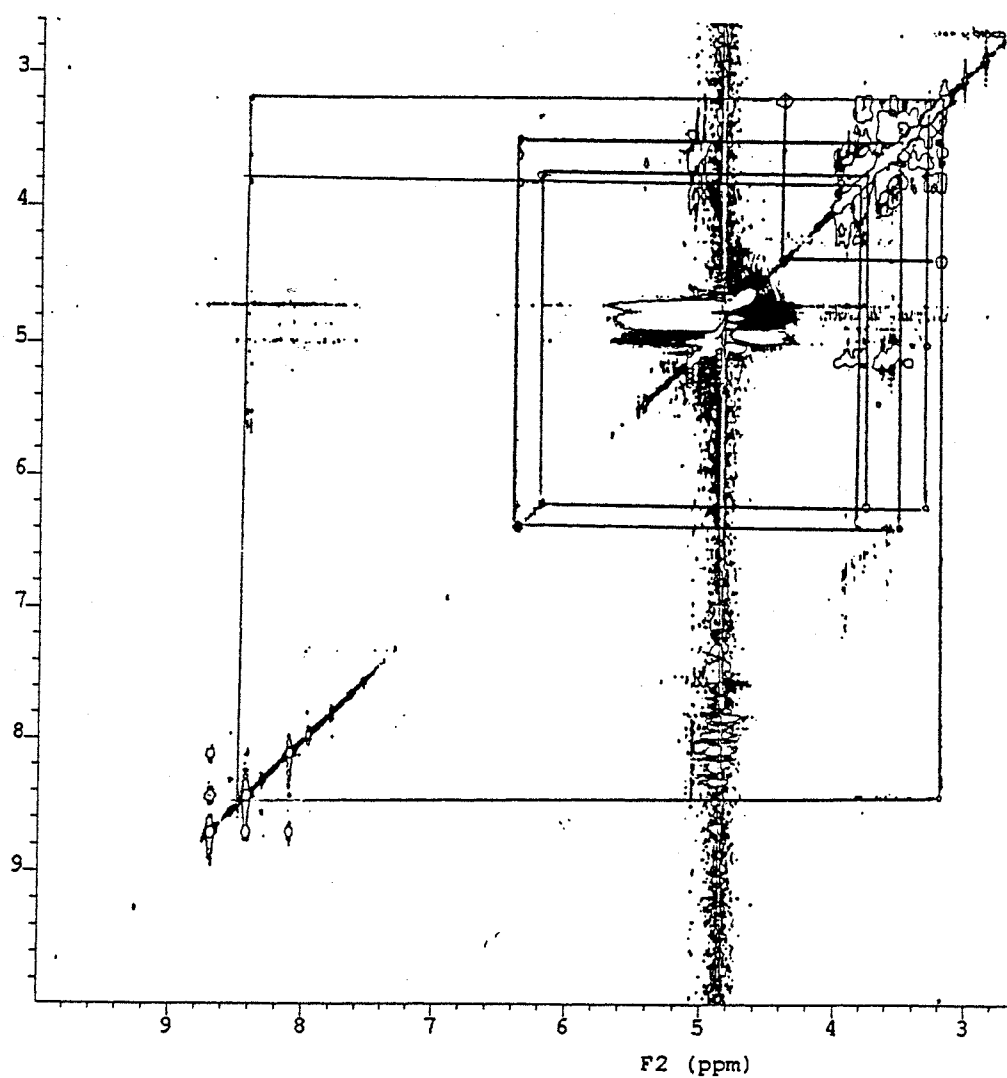


Figure 190: Corrélation ROESY pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline **36**

L'examen séparé des cartes de NOESY et ROESY montre des corrélations différentes. Dans ce cas, la carte ROESY nous fournit des informations complémentaires concernant la position probable des bras espaceurs et donc des cyclodextrines par rapport au noyau aromatique. De la même façon, nous avons reporté, dans deux représentations planes et schématiques de la molécule, les principales interactions dipolaires qui nous paraissent les plus significatives pour décrire la conformation interne aux bras espaceurs et celles qui décrivent la conformation probable de l'ensemble de la molécule (Figure 191).

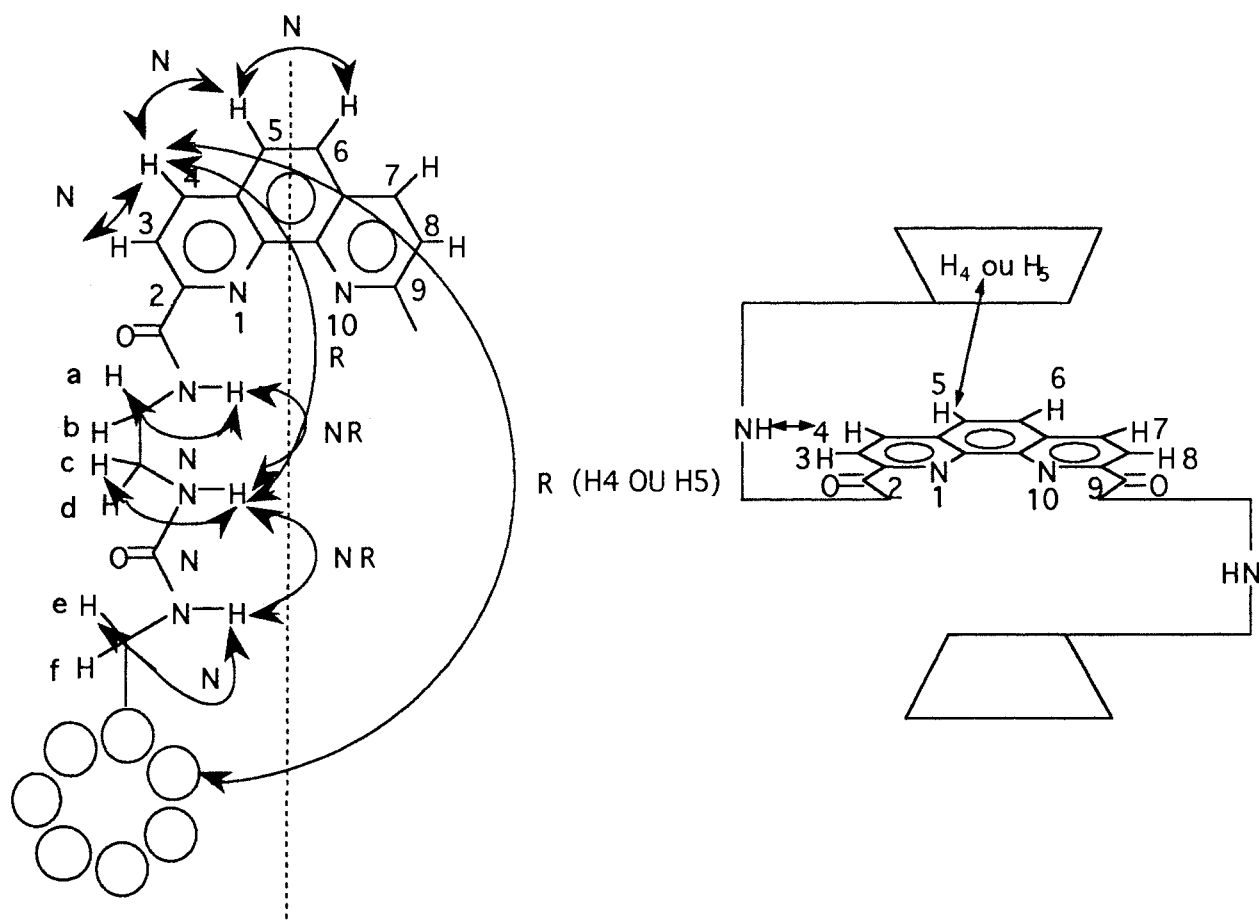


Figure 191 : Représentation schématique et interactions dipolaires significatives entre les protons de la phénanthroline diamine et la cyclodextrine.

Notamment, les interactions ROE entre l'un des NH du bras espaceur et des H4 ou H5 de la β -cyclodextrine, avec les protons aromatiques de la phénanthroline, montrent un repliement probable des chaînes au-dessus et au-dessous du plan du cycle aromatique, tel que nous le représentons dans le schéma ci-avant (Figure 191).

La confirmation d'une telle structure sera apportée par l'utilisation des techniques de modélisation moléculaire (MM2, MM3) (Voir en Annexe).

*b- Cas de la Bis- $\{[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-(2,3-di-O-méthyl)-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]\}-1,10-phénanthroline$ **37***

Les déplacements chimiques des protons du dimère **37** qui ont pu être déterminés sont donnés dans la représentation schématique suivante :

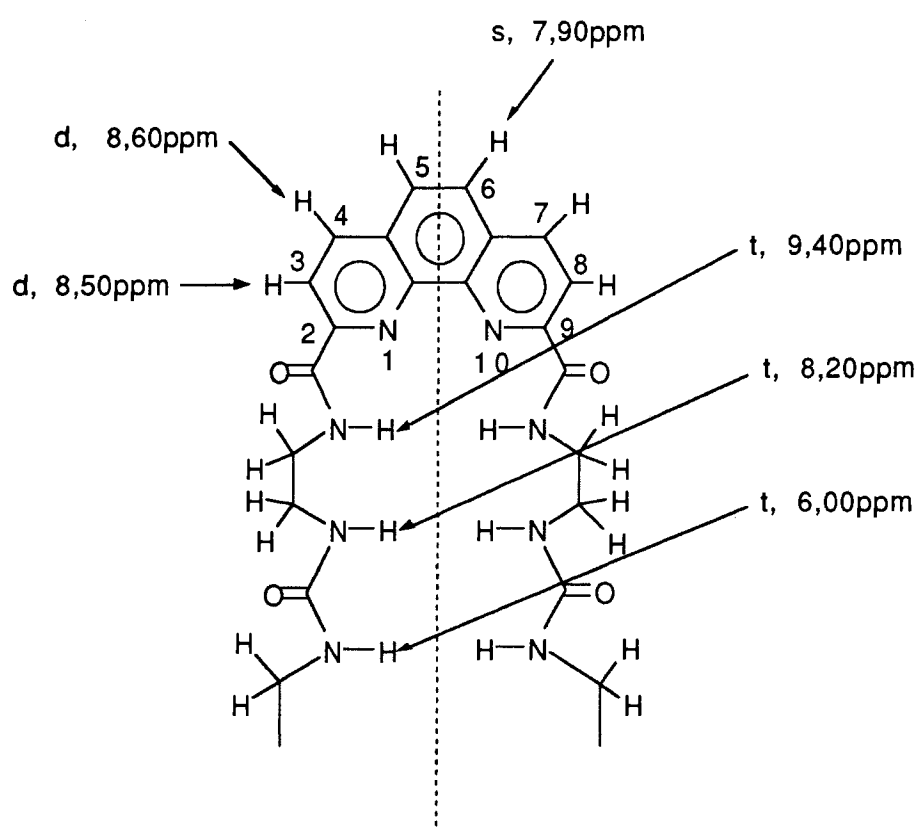


Figure 191.1 : Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère **37**

Les déplacements des protons des unités substituées des cyclodextrines et ceux des méthylènes des chaînes aliphatiques n'ont pu être attribués, le système n'étant pas directement interprétable. Néanmoins, il est possible d'assigner les déplacements suivants :

H_1 (CD US) :	$\delta = 5,10\text{ppm}$
H_1 (CD UNS) :	$\delta = 5,05\text{ppm}$

CH₃-O (CD) : $\delta = 2,10\text{ppm}$
 Autres protons des unités
 non substituées de la β -CD : $\delta = 3,90\text{ppm}$

*c- Cas de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38***

L'examen du spectre 1D de **38** nous a permis, en première analyse, d'assigner directement les protons de la partie aromatique (phen).

Les déplacements chimiques des protons du dimère **38** qui ont pu être déterminés sont donnés dans la représentation schématique suivante :

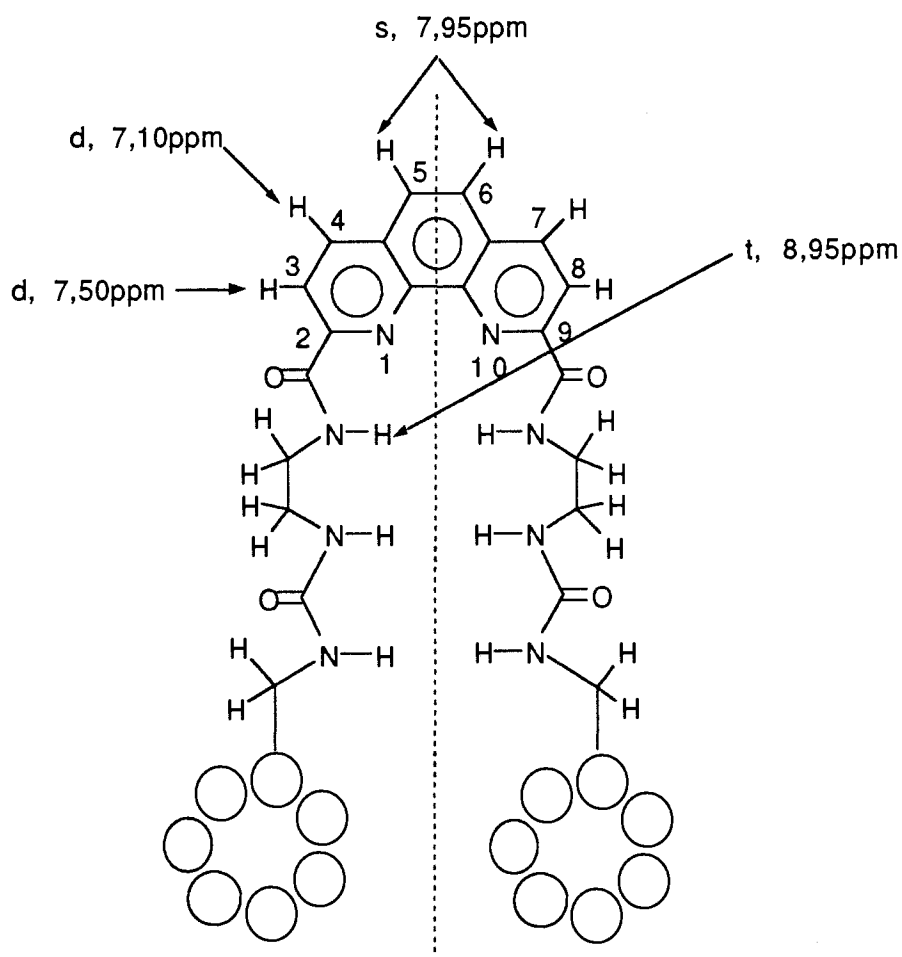


Figure 191.2 : Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère **38**

Ne disposant que de la carte COSY concernant ce dimère, seuls les déplacements des protons suivants ont pu être déterminés :

H₁ (CD US) : $\delta = 5,15\text{ppm}$ (d)

H₂ (CD US) : $\delta = 4,45\text{ppm}$ (dd)

H₃ (CD US) : $\delta = 3,85\text{ppm}$ (dd)

H₄ (CD US) : $\delta = 3,62\text{ppm}$ (m)

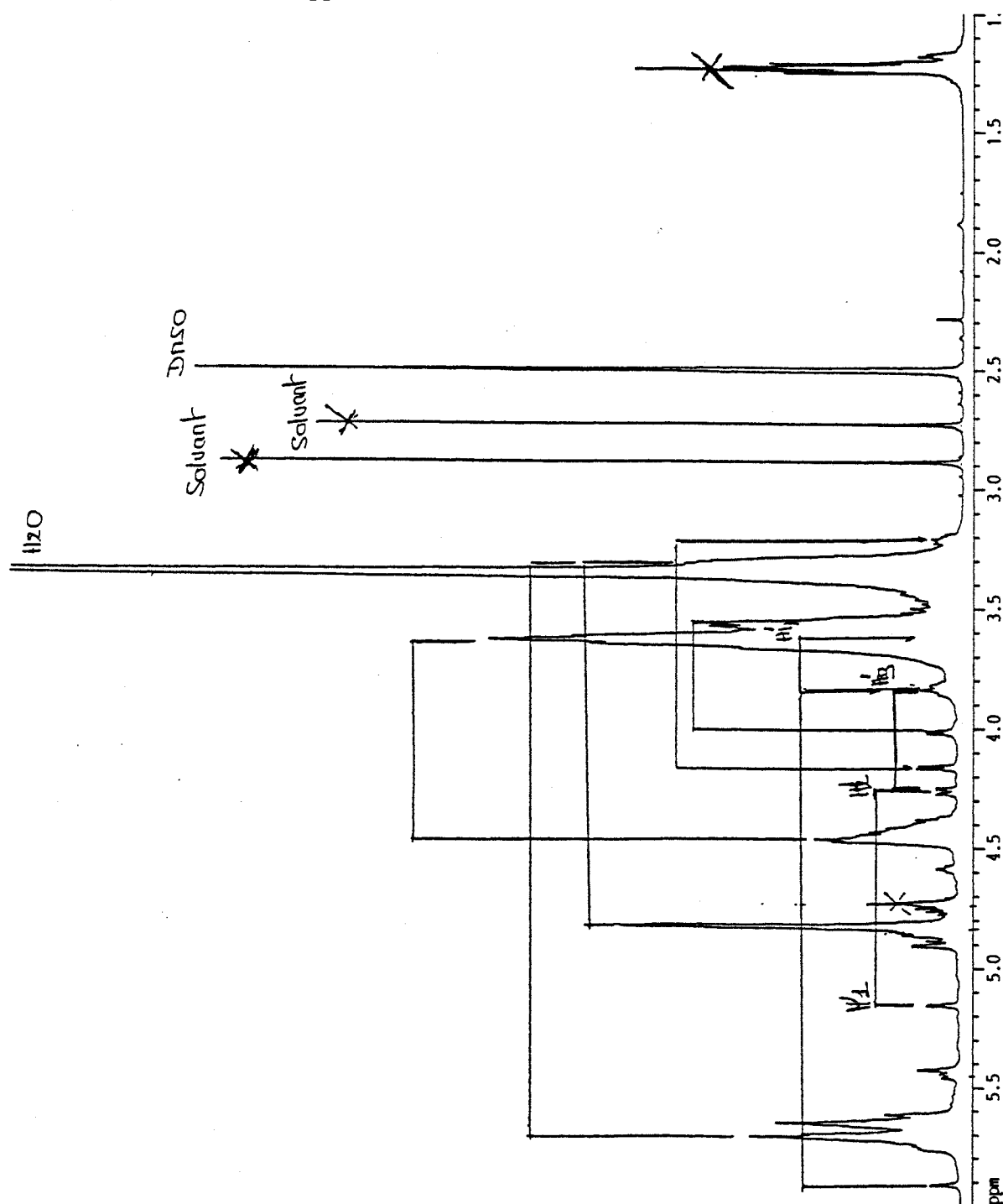


Figure 191.3 : Spectre 1D (500MHz, DMSO-d⁶) de la bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis (1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38**

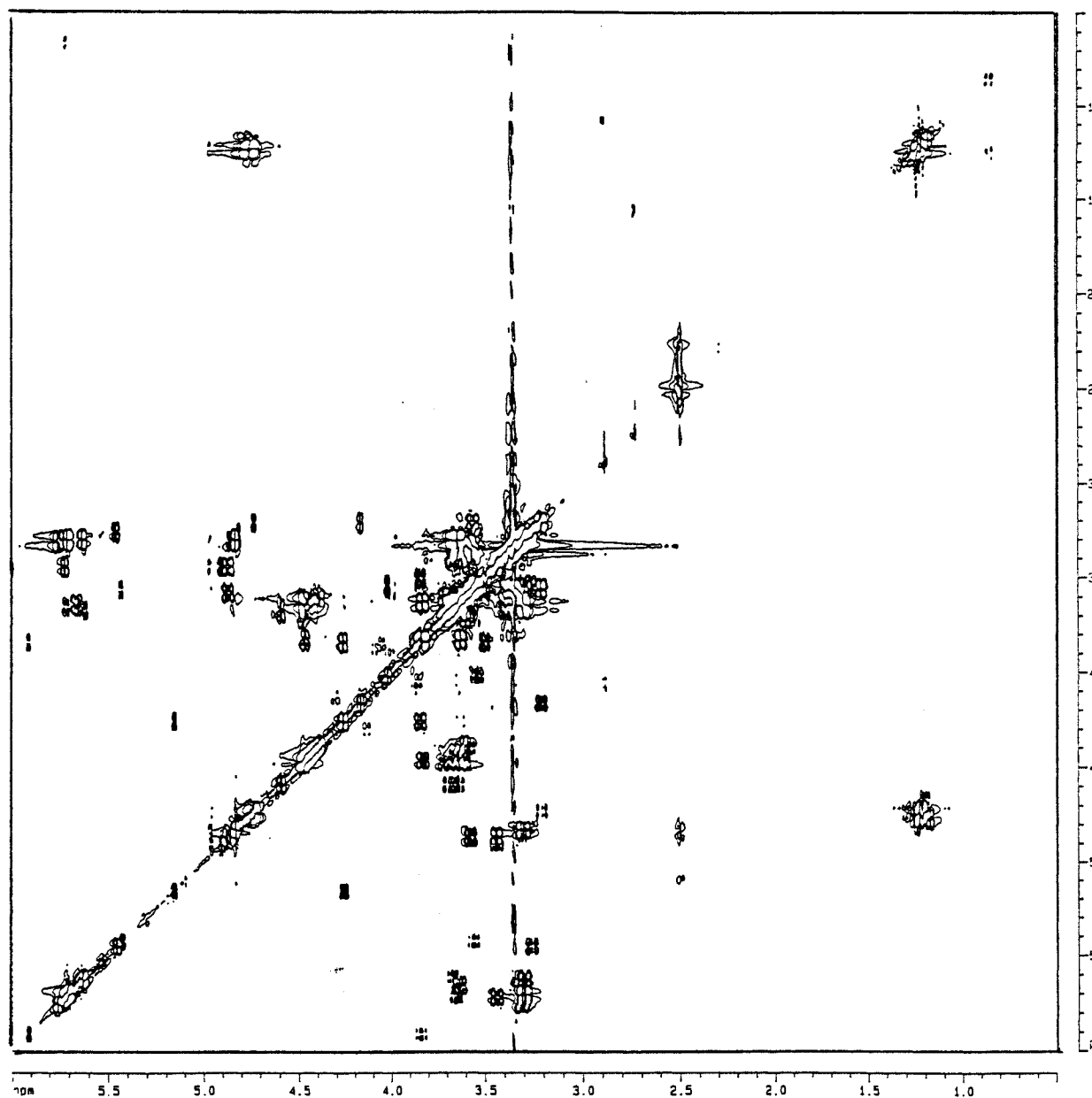


Figure 191.4 : Corrélations COSY (H-H) de la bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis (1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline **38**

5- Les complexes métalliques de la phénanthroline diamine **2** et du dimère **36**.

Les spectres RMN ^1H de la phénanthroline diamine **2** et de ses complexes de cuivre (II) et de ruthénium (III) ont été réalisés à 400MHz, dans D_2O , à température ambiante (Figures 192, 193 et 194).

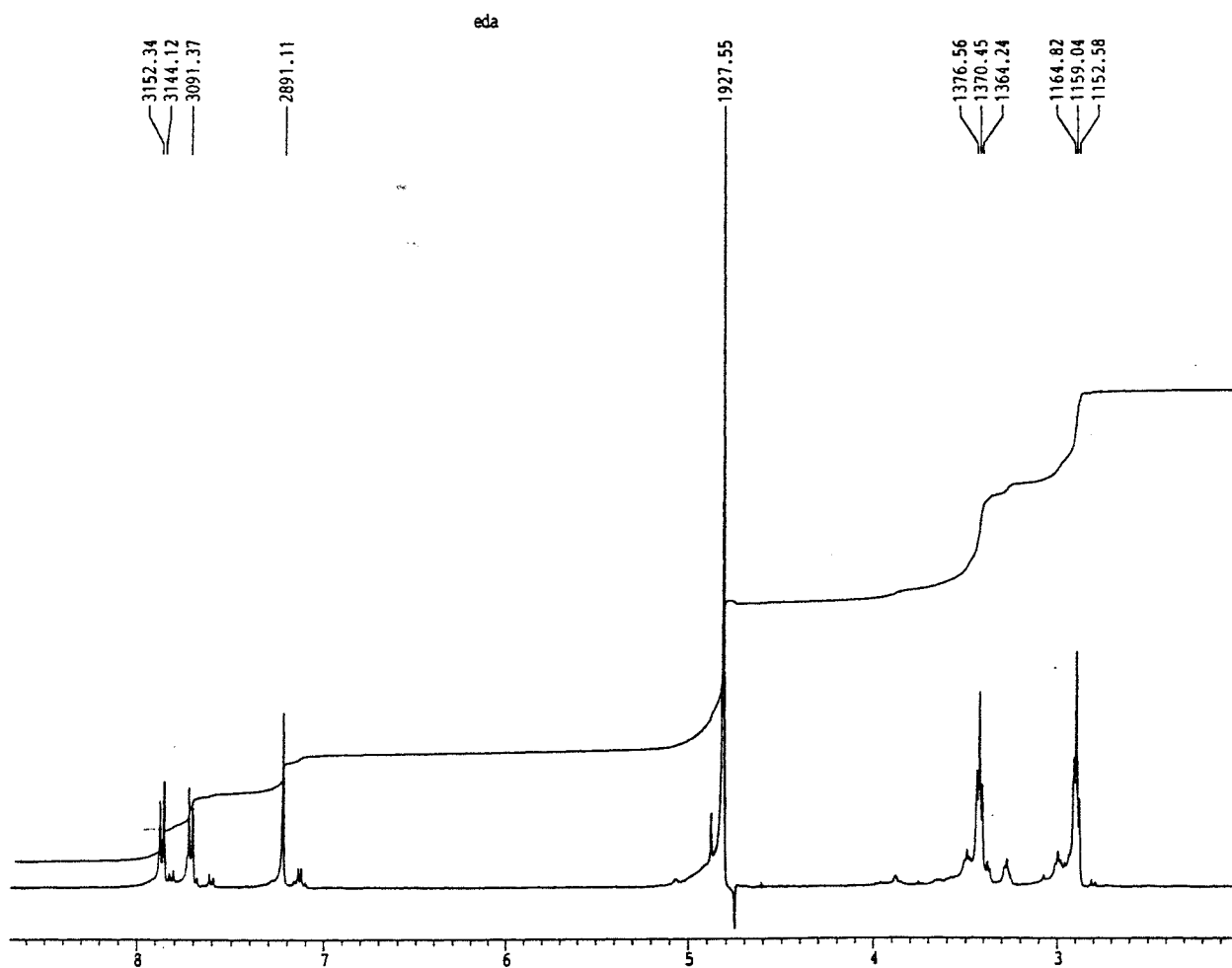


Figure 192 : Spectre de la phénanthroline diamine **2** (400MHz, D_2O)

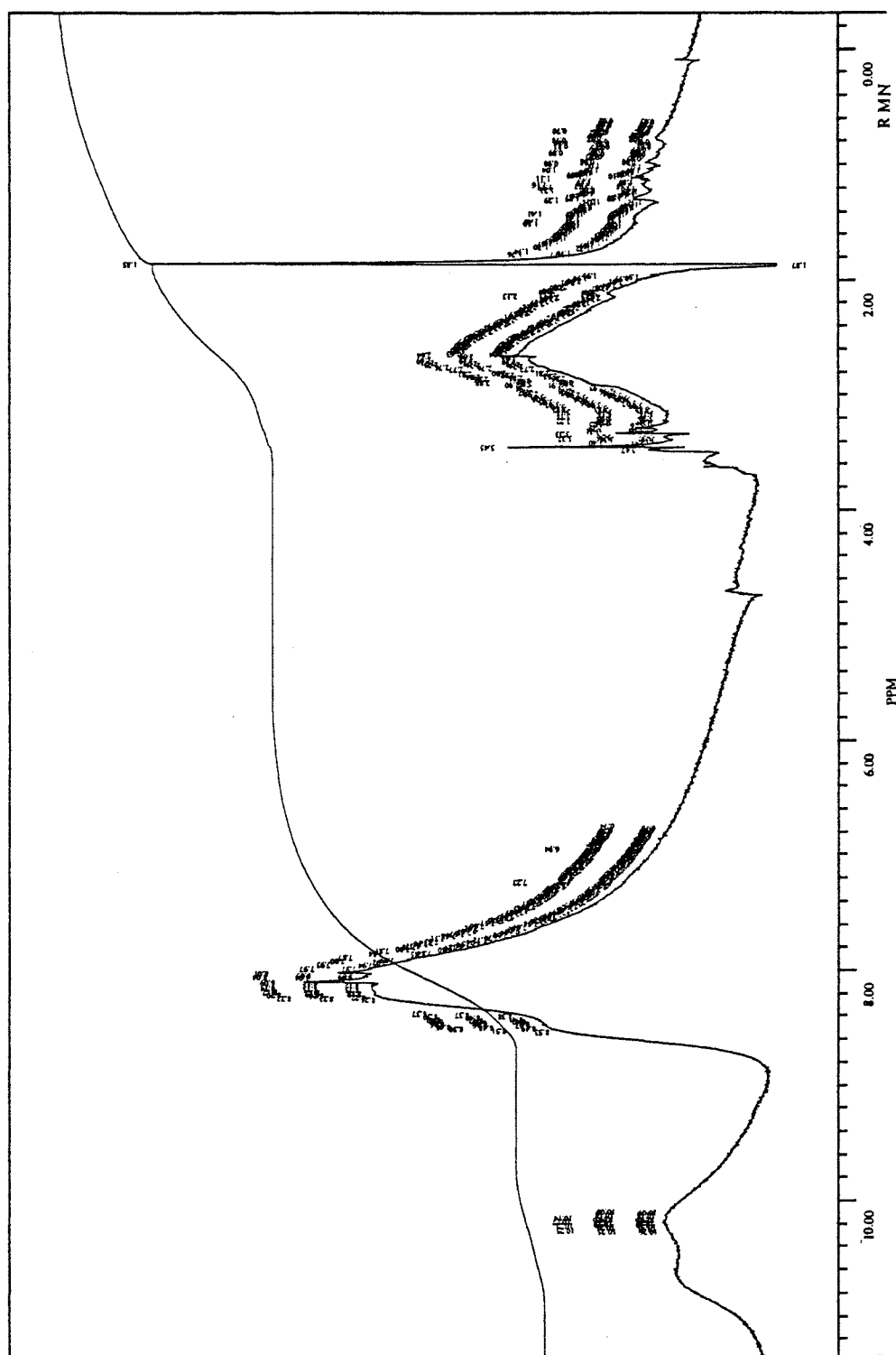


Figure 193 : Spectre de du complexe de cuivre(II) de la phénanthroline diamine 2
(400MHz,D₂O)

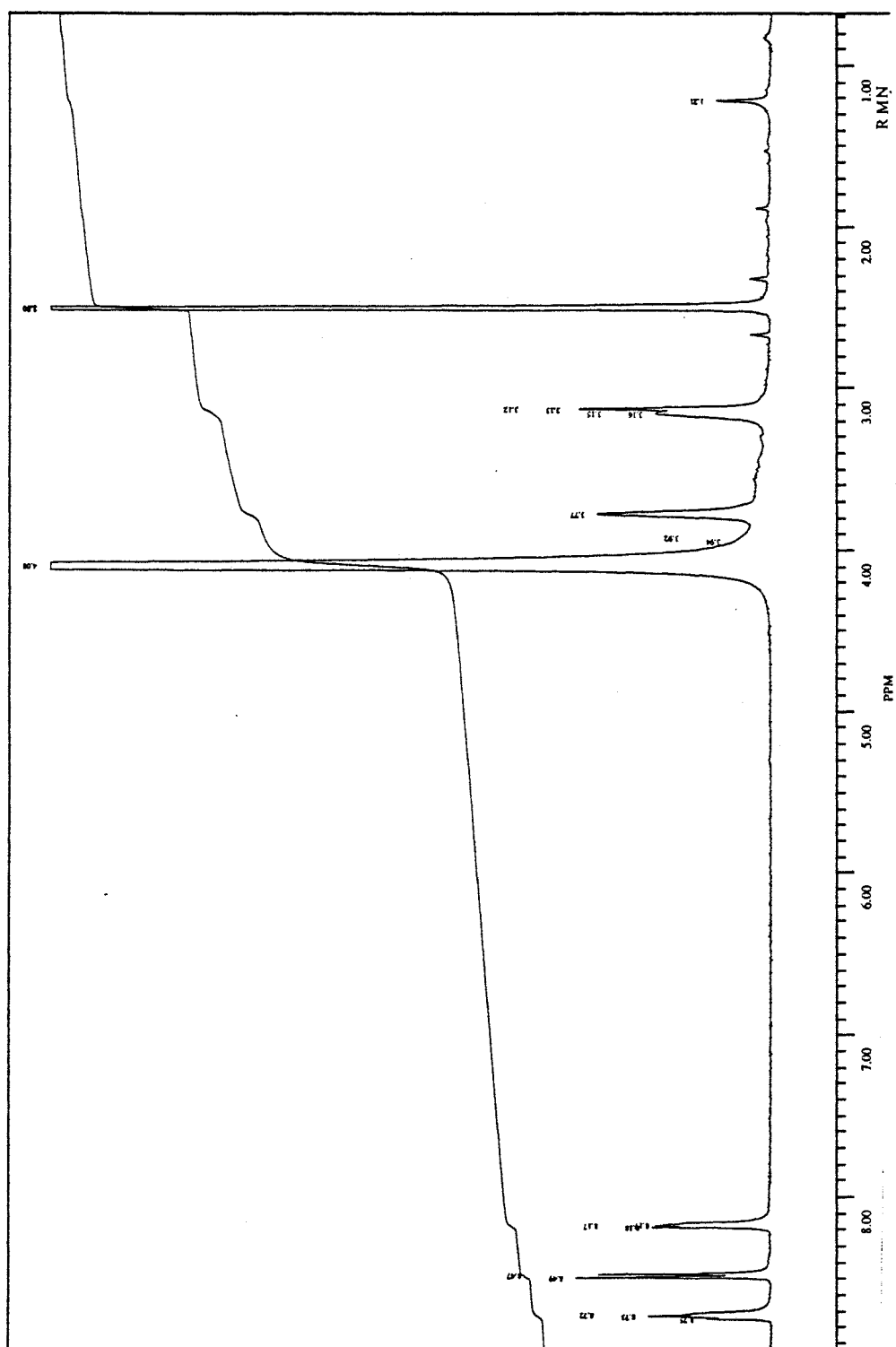


Figure 194 : Spectre de du complexe de Ruthénium (III) de la phénanthroline diamine **2** (400MHz, D_2O)

La complexation avec le cuivre (II) amène à une très mauvaise résolution du spectre (effet paramagnétique) qui ne permet pas son interprétation. La complexation avec le ruthénium amène à une diminution de la résolution surtout au niveau des signaux correspondant aux protons des chaînes éthylène diamine où la multiplicité n'est plus visible. Par ailleurs, l'ensemble des signaux aromatique est déblindé de 0,8 ppm en moyenne. Les protons des chaînes éthyléniques sont déblindés de 0,3 ppm.

En ce qui concerne le dimère **36**, le même phénomène est observé (Figures 195 et 196). Le spectre du complexe de cuivre (II), très mal résolu, n'est pas interprétable. Cependant, il est à noter que les protons aromatiques ne donnent plus aucun signal ce qui peut signifier que la complexation entraîne un allongement de leur temps de relaxation. En ce qui concerne le complexe de ruthénium, l'ensemble des protons du dimère est déblindé. Les protons aromatiques montrent un déblindage de 2 ppm . Le phénomène de déblindage des protons aromatiques est donc plus important au niveau du dimère **36** que dans la diamine **9** seule.

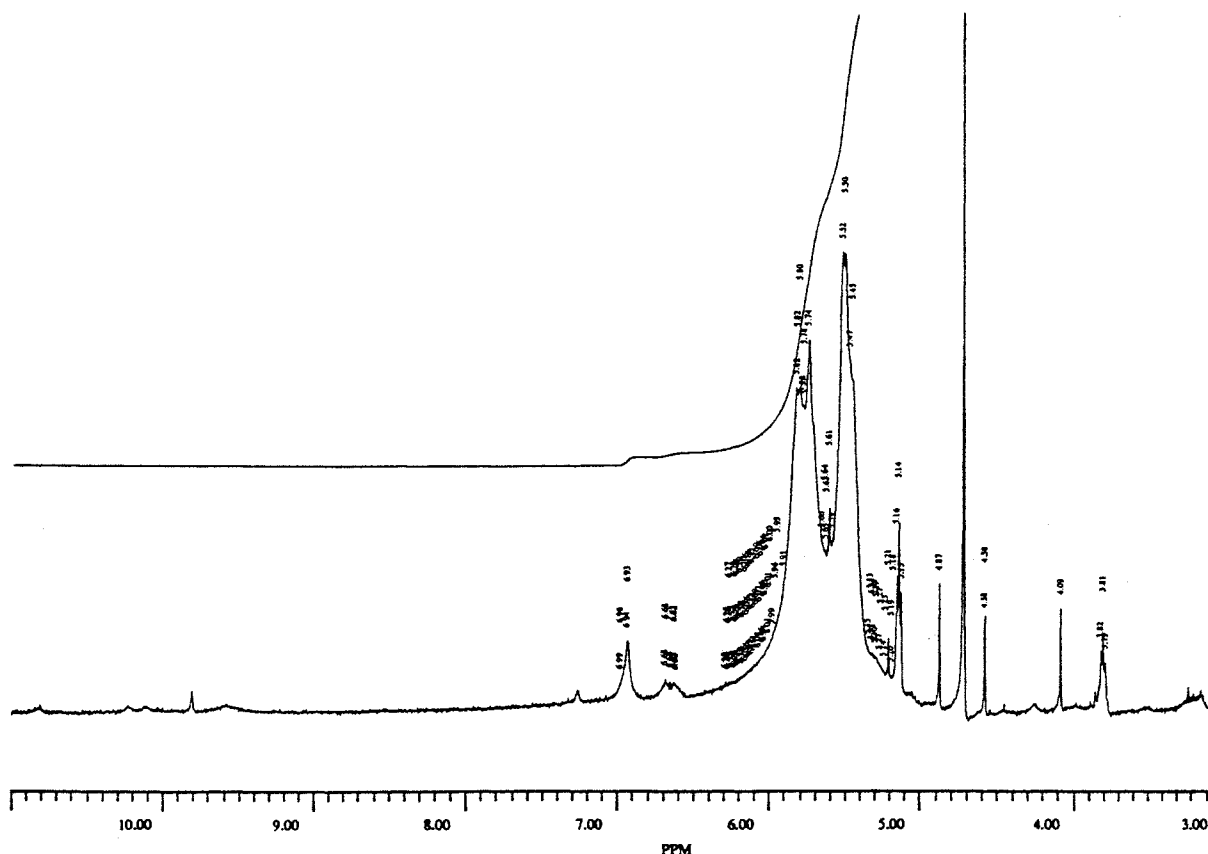


Figure 195 : Spectre de du complexe de Cu (II) du dimère **36 (400MHz, D₂O)**

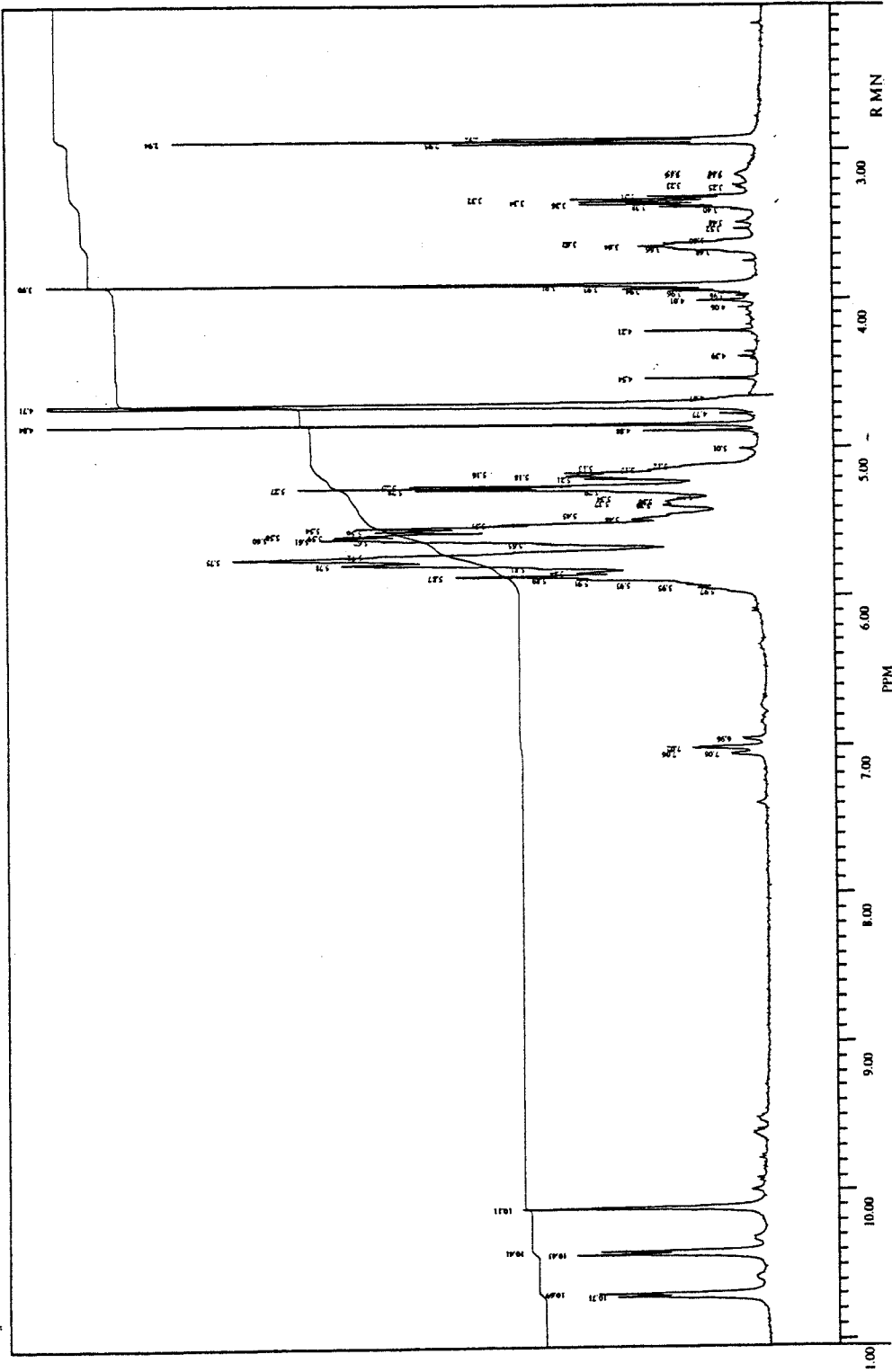


Figure 196 : Spectre de du complexe de Ruthénium(III) du dimère **36** (400MHz, D₂O)

L'utilisation de la RMN du Carbone 13, compte-tenu de la complexité des spectres protons due aux structures polysaccharidiques analysées, aurait pu, par l'enregistrement de spectres de corrélation hétéronucléaires, être d'une grande utilité pour l'attribution des signaux.

Malheureusement, certains éléments nous ont privé de cette possibilité, à savoir :

- un premier problème lié aux masses moléculaires relativement importantes (2000 à 3000 uma) des produits et à leur solubilité limitée dans les solvants deutérés. Ceci rend difficile la préparation d'échantillons de concentrations suffisamment élevées pour permettre un enregistrement des spectres dans un temps raisonnable ;

- un second problème lié à la structure chimique mixte de certains produits (*e.g.* dimères de β -CDs) où, même en présence des concentrations requises, les spectres enregistrés restent incomplets : les signaux des protons aromatiques, par exemple, n'apparaissent quasiment jamais.

*Conclusion générale et
perspectives*

Conclusion Générale et Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons préparé des CDs monothiosubstituées sur la face des hydroxyles primaires ou secondaires au travers d'une étude méthodologique de la réaction de Mitsunobu. Cette étude nous a permis de mettre en évidence les avantages et les limites de cette nouvelle voie de monofonctionnalisation directe des CDs. Selon les thiols utilisés, les résultats sont inégaux, néanmoins, l'obtention de plusieurs CDs substituées sur la face des hydroxyles secondaires est un encouragement quant aux potentialités de cette réaction. Les problèmes rencontrés sont essentiellement situés au niveau de la purification des produits, l'optimisation de cette purification devrait permettre, à terme, l'obtention de thio-dérivés avec des rendements tout à fait compétitifs à ceux décrits dans la littérature dans les méthodes de monosubstitution. Par ailleurs, cette méthode peut ouvrir une nouvelle voie d'accès à des intermédiaires importants de la chimie des CDs ou à des composés tels que les CDs glycosylées dont l'intérêt potentiel dans le transport d'actifs thérapeutiques n'est plus à démontrer.

Des CDs glycosylées et une CD substituée par un fluorophore sur la face des hydroxyles secondaires ont ainsi été obtenues. Les propriétés de reconnaissance moléculaire présentées par ces molécules ont été étudiées. Les premiers tests effectués attestent de leur aptitude en ce sens. Le dérivé substitué par le fluorophore est de plus le point de départ à la préparation d'une sonde fluorescente, traceur d'événements en milieu biologique. En effet, toujours dans l'optique du transport du médicament, il est nécessaire de connaître le comportement du transporteur au voisinage de la cellule ciblée et les conditions de relargage de l'actif.

Avec le développement de la thérapie génique et des systèmes de transport pour oligonucléotides (liposomes, nanoparticules) et compte-tenu des travaux effectués par ELISEEV sur la complexation des nucléotides par les amino-CDs, il nous a paru intéressant de préparer différentes amino-CDs mono et persubstituées. Leur aptitude à complexer de telles structures est actuellement en cours d'évaluation.

Enfin, concernant le ciblage de l'ADN, une autre voie est possible, celle des nucléases artificielles susceptibles de présenter une sélectivité de clivage. A cette fin, nous avons préparé plusieurs dimères de β -CDs substitués par une unité phénanthroline diamine. La synthèse de ces dérivés s'est faite grâce à l'adaptation d'une méthode décrite pour les monosaccharides et ouvre la voie à la conception d'autres dimères. Les complexes métalliques de ces dimères ont été préparés et leurs propriétés catalytiques ont été évaluées par des cinétiques d'hydrolyse du BNPP. Les résultats obtenus, à ce jour,

montrent des résultats variables selon les métaux utilisés mais nous pouvons considérer que le but recherché est atteint puisque le complexe de cuivre s'est révélé apte à catalyser l'hydrolyse des liaisons phosphodiester avec une bonne efficacité y compris au sein d'un ADN circulaire ce qui démontre son caractère endonucléasique. La détermination des caractéristiques nécessaires à ce type de molécules pour obtenir une sélectivité de clivage de l'ADN appartient aux perspectives proches.

De nombreux points restent encore à approfondir et à élucider. En particulier la synthèse de la sonde fluorescente devra être poursuivie et son étude physico-chimique réalisée avant de pouvoir la tester en milieu biologique. De nombreux travaux sont encore nécessaires pour élucider le mécanisme d'action des nucléases artificielles préparées au niveau de l'ADN et pour obtenir la sélectivité de coupure recherchée.

Partie expérimentale

GENERALITES.

1- Solvants et réactifs

- ◆ Tous les solvants utilisés ont été préalablement redistillés:
 - la pyridine sur P_2O_5 (conservation sur CaH_2).
 - le DMF sur CaH_2 (conservation sur tamis moléculaire 4 Å, sous argon).
 - le diméthylacétamide (DMA) sur BaO (conservation sur tamis moléculaire, 4 Å sous argon).
 - le THF sur sodium en présence de benzophénone.
 - le dichlorométhane, l'éther de pétrole et l'hexane sur $CaCl_2$.
 - l'acétone sur $KMnO_4$.
- ◆ L'éthylène diamine est bidistillée et conservée sur tamis moléculaire 4 Å sous argon.
- ◆ La β -CD est préalablement séchée 12h à 120°C sous vide avant utilisation.
- ◆ Toutes les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (c.c.m) de gel de silice (Merk F254®).
- ◆ La révélation des sucres s'effectue par un mélange eau/méthanol/acide sulfurique (4,5:4,5:3) suivie d'un chauffage à 270°C. Les produits apparaissent alors sous forme de taches brunes ou noires.
La révélation des amines s'effectue dans une solution méthanolique de ninhydrine suivie d'un chauffage à 270°C. Les produits apparaissent alors sous forme de taches rouges-violettes.

2- Méthodes chromatographiques et spectroscopiques

- ◆ Les proportions des solvants d'élution sont données en V/V.
- ◆ Les produits sont purifiés soit par chromatographie sur colonne de gel de silice (Merk 60; 0,063-0,200 mm) soit par chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.) moyenne pression et préparative à polarité de phase inversée (Lichroprep RP-18, 5-20 μ m) sur une colonne BÜCHI 685 (230x36mm) munie d'une précolonne (6x115mm) et couplée à une pompe BÜCHI 688.
- ◆ Les spectres de fluorescence sont obtenus sur un spectrofluorimètre SPEX, FLUOROLOG II équipé d'une lampe à Xénon de 500 watts.

♦ Les spectres de masse sont obtenus sur un appareil NERMAG R.10.10.(service commun de spectrométrie de masse, Université Henri Poincaré, NANCY 1).

Pour les mesures supérieures à 1000 u.m.a. (Unité de Masse Atomique), les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil NERMAG R.10.10. du CERMAV/CNRS Grenoble par la technique FAB (Fast Atom Bombardment).

Pour les mesures supérieures à 2000 u.m.a. et les mesures haute résolution, les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil FISIONS-ZABIISEQ du CNRS (Vernaison).

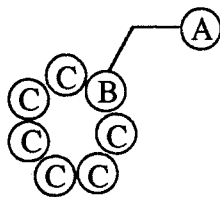
♦ Les analyses élémentaires ont été effectuées au service central d'analyses du CNRS (Vernaison).

♦ Les spectres UV ont été enregistrés, selon les cas, sur un appareil BECKMAN DU 64 ou un appareil SHIMADZU UV-160.

♦ Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil PERKIN-ELMER-1600 en dispersion dans le KBr (LESOC, Université Henri Poincaré, NANCY 1).

♦ Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés, selon les cas, sur un spectromètre Bruker-DRX 400 fonctionnant à 400 MHz et 100 MHz et un spectromètre Bruker AC 250 fonctionnant à 250MHz et 62,5 MHz, du service commun de RMN de l'Université Henri Poincaré, NANCY 1. Pour les cartes 2D, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN fonctionnant à 500MHz au laboratoire du Dr A.W.Coleman (IBCP, UPR-CNRS 412, Lyon).

♦ Pour l'attribution des signaux de RMN des carbones, il a été adopté la notation présentée dans la figure ci-après :

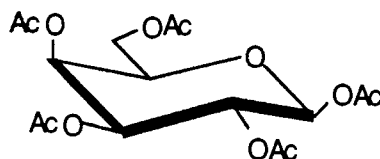


Les carbones notés en :

- C_nA sont ceux des résidus glycosyles liés à la cyclodextrine.
- C_nC sont ceux des résidus glucosyles de la cyclodextrine qui ne sont pas substitués en C-6.
- C_nB sont ceux du résidu glucosyle de la cyclodextrine substitué en C-6.

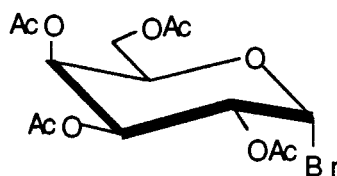
3-modes opératoires

1,2,3,4,6-Penta-O-acétyl-β-D-Galactopyranose (**1**) [18]



Rdt : 72% (7,24g)

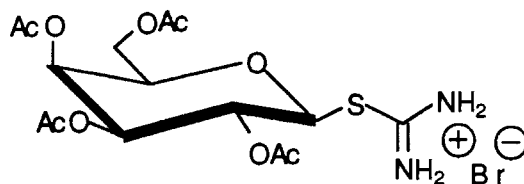
Bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-galactopyranosyle (**2**) [18]



Une solution de galactose peracétylé **1** (5g, $1,28 \cdot 10^{-2}$ mole) dans le dichlorométhane (25mL), est placée dans un bain de glace fondante. De l'acide bromhydrique dans l'acide acétique (35%) (25mL) est ajouté goutte à goutte à la solution puis le mélange est agité 30 min. à 0°C. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 3h à température ambiante, lavé avec 50mL d'eau et une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium refroidie à 0°C. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le composé **2** est obtenu sous forme d'une huile jaune utilisée sans autre purification.

Rdt : 93% (4,87 g).

Bromure de 2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-2-isothiuronium (**3**) [18]



Une solution du composé **2** (4,79 g, $1,165 \cdot 10^{-2}$ mole) et de thiourée (1,35 g, $1,776 \cdot 10^{-2}$ mole,), dans d'acétone (25 mL) est chauffée à reflux pendant 25 min., sous

agitation magnétique. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et repris au dichlorométhane pour précipiter la thiourée en excès. La suspension obtenue est filtrée sur verre fritté et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. Le composé **3** cristallise dans un mélange méthanol / éther.

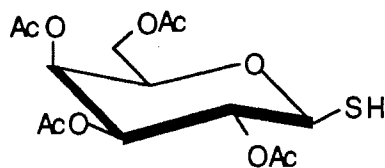
Rdt : 55% (2,61g).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) 170 (C=O); 169 (C=NH); 82 (C₁A); 76 (C₄A); 71, 66,9, 66,3 (C₂A, C₃A, C₅A); 61,5 (C₆A); 18,5 à 21 (CH₃CO).

RMN ^1H (D₂O) : 5,52, 5,51 (d, 1H, H₁, J=3,08Hz); 5,43 (t, 1H, H₄, J=3,08Hz); 5,35, 5,33 (d, 1H, H₃, J=9,98Hz); 5,29, 5,28, 5,27, 5,26 (dd, 1H, H₂, J=3,15Hz); 4,36 (t, 1H, H₅, J=5,86Hz); 4,23-4,20 (m, 2H, H₆); 2,16 (s, 3H, CH₃); 2,09 (s, 3H, CH₃); 2,03 (s, 3H, CH₃); 1,96 (s, 3H, CH₃).

SM (DCI, NH₃) : 490 [M]⁺.

2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose (**4**) [18]

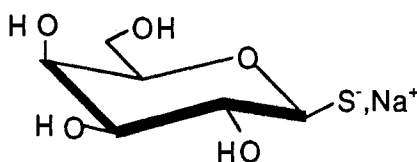


Une solution de 0,5 g ($2,03 \cdot 10^{-2}$ mole, 10éqs.) de métabisulfite de potassium dans l'eau (2 mL) est portée à reflux sous agitation magnétique. Du chloroforme (3 mL) et le composé **3** (1g, $2 \cdot 10^{-3}$ mole) sont alors ajoutés et le mélange est laissé à reflux pendant 25 min.. Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec 20mL d'eau glacée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite pour donner le composé **4** sous forme d'une huile translucide et visqueuse.

Rdt : 93% (0,7g).

SM (DCI) : 382 [M+NH₄]⁺.

Sel de sodium du 1-thio- β -D-galactopyranosyle (**5**) [163]

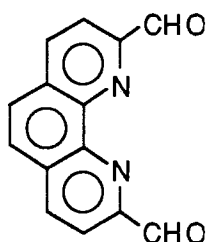


A une solution méthanolique (15 mL) du thiogalactose **4** (1,05g, $2,88 \cdot 10^{-3}$ mole) sont ajoutés 5 mL de méthanolate de sodium (1M). Le mélange est laissé sous agitation pendant 3h., sous argon, à température ambiante. Le sel de sodium **5** est obtenu par évaporation du solvant.

Rdt : 76% (0,85g)

RMN ^{13}C (D_2O) : δ (ppm) 85,9 (C_1A); 79,9 (C_4A); 77,4 , 74,9, 70,8 (C_2A , C_3A , C_5A); 62,5 (C_6A).

1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxaldéhyde (6**) [236]**

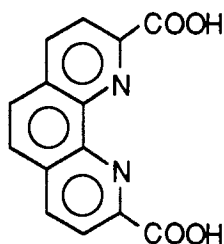


Un mélange de néocuproïne (6g, $2,885 \cdot 10^{-2}$ mole) et de dioxyde de sélénium (15g, $1,351 \cdot 10^{-1}$ mole, 4,7éqs.) en solution dans 400 mL de dioxane contenant 4% d'eau est chauffé à reflux pendant 4h puis filtré à chaud sur célite. Le dialdéhyde **6** précipite au refroidissement dans le filtrat. La suspension est filtrée et le dicarboxaldéhyde **6** est recristallisé dans l'acétone.

Rdt: 58% (3,95g)

SM (IE, 70eV); m/z : 236 $[\text{M}]^+$, 179 $[\text{M}-2\text{CHO}]^+$.

acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique (7**) [236]**



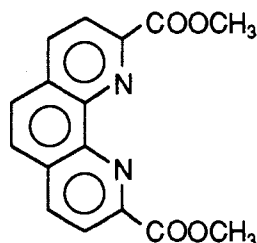
Le dialdéhyde **6** (3,04g, $2,88 \cdot 10^{-2}$ mole), en solution dans 100 mL d'acide nitrique à 10% aqueux (9,7M), est chauffé à reflux pendant 6h. Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé sur 100 mL de glace pilée pour précipiter le diacide. Après filtration de la suspension sur verre fritté, le diacide **7** est recristallisé dans le méthanol.

Rdt : 86 % (2,97g)

RMN ^1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) 8,75 (d, 2H, H_4 , H_7); 8,45 (d, 2H, H_3 , H_8); 8,20 (s, 2H, H_5 , H_6); 3,30 (s, OH).

SM (IE, 70eV); m/z : 268 $[\text{M}]^+$, 224 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$ 178 $[\text{M}-2\text{COOH}]^+$.

2,9-bis-(carbométhoxy)-1,10-phénanthroline (8**) [236]**



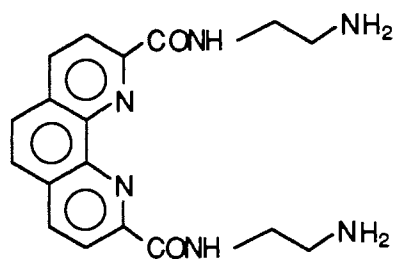
Une solution de diacide **7** (2,40g, $8,95 \cdot 10^{-3}$ mole) dans le méthanol (300 mL) est chauffé à reflux, en présence de 1mL d'acide sulfurique concentré, pendant 24h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est alcalinisé (pH 8) avec une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium, refroidie à 0°C , puis extrait par 3x50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, puis séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. Le diester **8** obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

Rdt : 65% (1,72g)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 8,37 (d, 2H, H_4 , H_7); 8,33 (d, 2H, H_3 , H_8); 7,85 (s, 2H, H_5 , H_6); 4,10 (s, 6H, CH_3).

SM (IE, 70eV); m/z : 296 $[\text{M}]^+$; 180 $[\text{M}-2\text{COOMe}]^+$.

2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline (9**)**



Le diester **8** (1g $3,38 \cdot 10^{-3}$ mole) en solution dans 20 mL d'éthylène diamine fraîchement distillée est laissé sous agitation magnétique, à température ambiante pendant 35 min.. L'éthylène diamine est alors évaporée sous pression réduite et le résidu est

repris par de l'éther pour précipiter le composé **2**. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé plusieurs fois avec de l'éther. Le composé **2** est utilisé sans autre purification.

Rdt : 95% (1,13g)

RMN ^1H (D_2O) : δ (ppm) 7,83 (d, 2H, H_4 , H_7 , $J = 8,25\text{Hz}$); 7,73 (d, 2H, H_3 , H_8 , $J = 8,25\text{Hz}$); 7,23 (s, 2H, H_5 , H_6); 3,41 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$, $J = 6,20\text{Hz}$); 2,81 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$, $J = 6,20\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (D_2O) : δ (ppm) 165,3 (C=O); 147,7 (C_2 , C_9); 141,7 (C-C-N_1 , C-C-N_{10}); 137,8 (C_4 , C_7); 129,2 ($\text{C}_4\text{-C-C}_5$, $\text{C}_6\text{-C-C}_7$); 127,2 (C_5), 120,8 (C_3); 41,7 (CO-NH-CH_2); 40,0 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

SM (IE, 70eV); m/z : 353 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 323 $[\text{M-CH}_2\text{NH}_2]^+$, 179 $[\text{M-2(CO-NH-(CH}_2)_2\text{-NH}_2)]^+$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) :

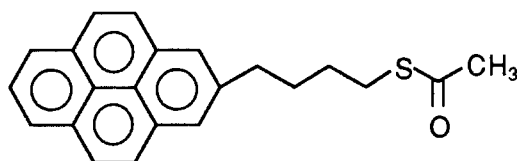
Calculée % : C : 55,67, H : 5,67, N : 21,65

Trouvée % : C : 55,60, H : 5,60, N : 21,61

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3361,9 (N-H); 2900-2800 (C-H, alkyl); 1661,0 (C=O); 1553,9 (C=N , Ar); 1495,5 (C=C , Ar).

UV (H_2O) ($\epsilon \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) : 234 (32570), 284 (19806).

Ethane thioate de 1-(4-pyrène)-butyle (**10**)



A une solution de PPh_3 (7,64g, $2,91 \cdot 10^{-2}$ mole, 4éqs.) dans de THF (20 mL) anhydre, sous atmosphère d'argon et à 0°C est ajouté, goutte à goutte, de l'iPrAD (5,74 mL, $2,91 \cdot 10^{-2}$ mole, 4éqs.). La réaction est laissée 30 min. à 0°C puis un mélange de 1-(4-pyrène)-butanol (2g, $7,29 \cdot 10^{-3}$ mole) et d'acide thiolacétique (2,08 mL, $2,91 \cdot 10^{-2}$ mole, 4éqs.), en solution dans 10 mL de THF, est additionné goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé 1h à 0°C puis 2h à température ambiante. Le solvant est alors évaporé à sec sous pression réduite et le résidu repris par de l'éther. L'ensemble est placé une nuit à 4°C puis le précipité d'oxyde de triphénylphosphine et de diisopropyl hydrazine dicarboxylate formé est séparé par filtration de la suspension sur verre fritté. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite et le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice avec un gradient d'éluants de polarité croissante :

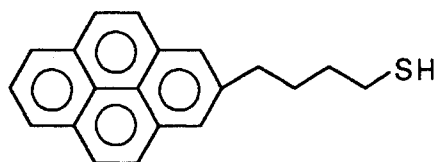
hexane/CH₂Cl₂. L'évaporation du mélange hexane 92% /CH₂Cl₂ 8% fournit le composé **10**.

Rdt : 75% (1,86g)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) : 8,20-7,78 (m, 9H, H_{Ar}); 3,29, (t, 2H, CH₂-S-CO, J=8Hz); 2,89 (t, 2H, CH₂-Ar, J=8Hz); 2,26 (s, 3H, CH₃); 1,87 (q, 2H, CH₂-CH₂-S-CO, J= 8Hz); 1,70 (q, 2H, CH₂-CH₂-Ar, J= 8Hz).

SM (IE, 70eV); m/z : 332 [M]⁺; 289 [M-COCH₃]⁺; 227 [M-(CH₂)₂SCOCH₃]⁺; 215 [M-(CH₂)₃SCOCH₃]⁺.

1-(4-pyrène)-butanethiol (**11**).

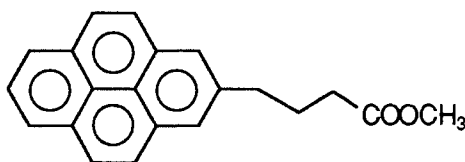


Une solution de **10** (1,6g, 4,82.10⁻³ mole) dans 20 mL de THF anhydre est ajoutée goutte à goutte à une suspension de AlLiH₄ (0,79g, 2.10⁻² mole, 4éqs.) dans 20 mL de THF anhydre. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 15 min. puis refroidi à 0°C. 10 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte pour neutraliser AlLiH₄ en excès et la réaction est poursuivie pendant 15 min. à 0°C. Le milieu réactionnel est alors neutralisé avec HCl 5%. Le précipité blanc formé est séparé par filtration de la suspension sur verre fritté et lavé avec du CH₂Cl₂. Le filtrat est extrait par 3x50ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées à sec sous pression réduite. Le composé **11** est utilisé sans autre purification.

Rdt : 85% (1,19g)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) : 8,21-7,79 (m, 9H, H_{Ar}); 3,30 (t, 2H, CH₂-S-CO, J= 8Hz); 2,53 (t, 2H, CH₂-Ar, J= 8Hz); 1,91 (q, 2H, CH₂-CH₂-S-CO, J= 8Hz); 1,74 (q, 2H, CH₂-CH₂-Ar, J= 8Hz).

SM (IE, 70eV); m/z : 290 [M]⁺; 227 [M-(CH₂)₂SH]⁺; 215 [M-(CH₂)₃SH]⁺.

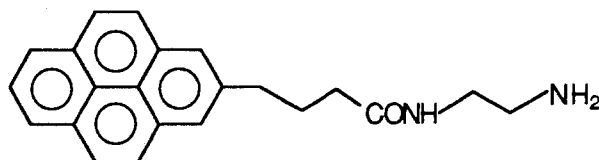
1-(4-pyrène)-butanoate de méthyle (11a)

Une solution d'acide pyrène butyrique ($0,5\text{g}$, $1,74 \cdot 10^{-3}$ mole) dans le méthanol (25 mL) est chauffé à reflux, en présence de 1 mL d'acide sulfurique concentré, pendant 24h . Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est neutralisé ($\text{pH } 7$) avec une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium, refroidie à 0°C , puis extrait par $3 \times 50\text{ mL}$ de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau distillée, puis séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. L'ester **11a** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice : éluant : CH_2Cl_2 100% .

Rdt : 73% ($0,38\text{g}$)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) : $173,9$ (C=O); $135,6$ - $123,2$ (CAr); $51,5$ (CH_3); $33,6$ ($\text{CH}_2\text{-CO}$); $32,7$ ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); $26,7$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$)

SM (IE, 70eV); m/z : 302 $[\text{M}]^+$; 215 $[\text{M}-(\text{CH}_2)_3\text{COOMe}]^+$.

N-(2-aminoéthyl)-4-pyrène butanamide (11b)

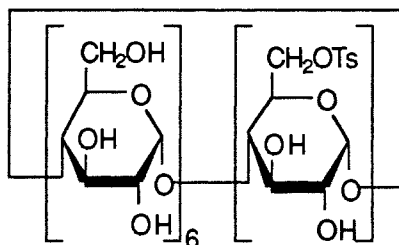
Une solution de 1-(4-pyrène)-butanoate de méthyle **11a** ($0,3\text{g}$, $0,99 \cdot 10^{-3}$ mole), dans 10 mL d'éthylène diamine fraîchement distillée, est chauffée à 50°C , sous argon, pendant 24h . Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec à 40°C . Le résidu est repris par de l'éther pour précipiter le composé **11b** et la suspension obtenue est filtrée. Le précipité est lavé avec de l'éther. Le composé **11b** est utilisé sans autre purification.

Rdt: 69% ($0,23\text{g}$).

RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ (ppm) : $171,9$ (C=O); $136,4$ - $123,3$ (CAr); $41,7$ (NHCH_2); $41,0$ (CH_2NH_2); $34,9$ ($\text{CH}_2\text{-CO}$), $32,1$ ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); $27,4$ ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$).

SM (IE, 70eV); m/z : 330 $[\text{M}]^+$; 215 $[\text{M-X}]^+$. ($\text{X} = -(\text{CH}_2)_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$)

Synthèse de CDs substituées sur la face des hydroxyles primaires

6-O-Tosyl-cyclomaltoheptaose (**12**) [18]

Protocole 1

A une solution de β -cyclodextrine (4g, $3,53 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 250 mL de pyridine anhydre est ajouté du chlorure de tosylo (1g , $5,29 \cdot 10^{-3}$ mole, 1,5 éqs.). Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 min. à température ambiante puis, une seconde addition de de chlorure de tosylo ($0,6\text{ g}$, $2,114 \cdot 10^{-3}$ mole, 1éq) est effectuée et le mélange est agité pendant 30 min. supplémentaires. De l'eau distillée (5 mL) est alors additionnée au mélange puis l'ensemble est évaporé à sec sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est mis en suspension dans 200ml d'éther et agité plusieurs heures à température ambiante puis séparé par filtration. Le produit brut est dissous dans 12 mL de DMF et chromatographié sous moyenne pression sur gel de silice à polarité de phase inversée (C18, 5-20 μm) par un gradient discontinu d'éluate de polarité décroissante : H_2O , $\text{H}_2\text{O-MeOH}$: 90:10, $\text{H}_2\text{O-MeOH}$: 80:20, $\text{H}_2\text{O-MeOH}$: 70:30. L'évaporation du mélange $\text{H}_2\text{O-MeOH}$: 70:30 fournit la monotosyl- β -cyclodextrine **12** pure, sous forme d'un solide blanc. Le produit ainsi obtenu est repris dans 10 mL d'eau distillée et lyophilisé.

Rdt : 25% (1,15g).

Protocole 2

A 50g ($4,4 \cdot 10^{-2}$ mole) de β -cyclodextrine en solution dans 500 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1% (P/V), est ajouté, goutte à goutte, du chlorure de tosylo (7g , $3,67 \cdot 10^{-2}$ mole, 0,835éq.), en solution dans 28 mL d'acétonitrile, sur une période de 30 min. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation, à température ambiante, pendant 1h puis filtré. Le filtrat est acidifié à pH 4 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 5%. Le précipité de monotosyl- β -cyclodextrine **12** ainsi obtenu

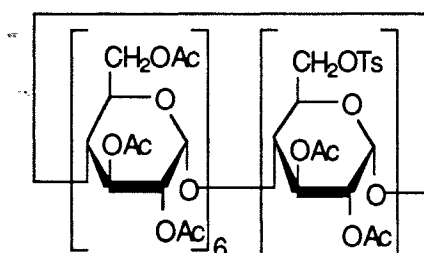
est séparé par filtration de la suspension et recristallisé dans l'eau. La monotosyl- β -cyclodextrine **12** obtenue est ensuite lyophilisée.

Rdt : 15% (8,8g).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) 128,8 à 133,7 (CAr); 103,2 (C_1C); 81,9 (C_4C); 73,3 (C_3C); 72,9 (C_2C); 72,7 (C_5C); 71,8 (C_6B); 70,7 (C_5B); 61,3 (C_6C); 22,5 (CH_3, Ts).

SM (FAB $^+$, NBA), m/z : 1289 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 1311 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

(2,3-Di-O-acétyl-6-O-tosyl)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose (13**) [18]**

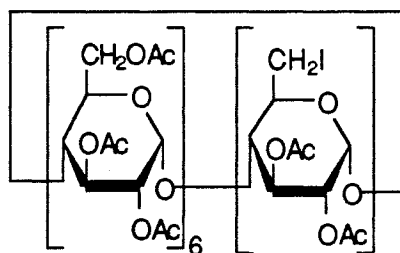


La monotosyl- β -cyclodextrine **12** (1g, $0,77 \cdot 10^{-3}$ mole) en solution dans 20 mL du mélange pyridine anhydre / anhydride acétique (2:1), est acétylée en présence de 4-diméthylaminopyridine (10 mg), par chauffage pendant 12 h à 60 °C. Le milieu réactionnel est versé dans 100ml d'un mélange eau distillée-glace où il précipite. Le précipité est séparé par filtration de la suspension sur verre fritté et repris avec 30 mL de dichlorométhane. La solution est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée à sec sous pression réduite pour fournir le composé **13**.

Rdt : 94% (1,54 g).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 170,7-169,3 ($\text{C}=\text{O}$); 144,9, 132,6 (C Ar); 129,8-127,9 (CH Ar); 96,6 ($\text{C}_{1\text{B}}$, $\text{C}_{1\text{C}}$); 76,5, 76,2 ($\text{C}_{4\text{B}}$, $\text{C}_{4\text{C}}$); 71,0-69,5 ($\text{C}_{2\text{B}}$, $\text{C}_{2\text{C}}$, $\text{C}_{3\text{B}}$, $\text{C}_{3\text{C}}$, $\text{C}_{5\text{B}}$, $\text{C}_{5\text{C}}$); 69,2 (C_6B); 62,4 (C_6C); 20,7 (CH_3, Ts).

(2,3-Di-O-acétyl-6-désoxy-6-iodo)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose (**14**) [18]

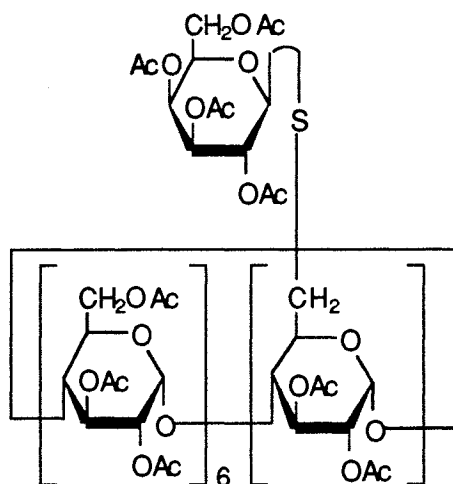


A une solution du composé **13** (1g, $0,47 \cdot 10^{-3}$ mole) dans l'anhydride acétique (25 mL), est additionné de l'iodure de sodium (0,7g, $4,7 \cdot 10^{-3}$ mole, 10 éqs.). La solution est laissée sous agitation magnétique, à reflux, pendant 4h.. Le mélange réactionnel est alors neutralisé (pH 7) avec une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium, refroidie à 0°C, puis extrait par 3x50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 100 mL d'eau distillée glacée, séchées sur MgSO_4 et évaporées à sec sous pression réduite pour donner le composé **14**.

Rdt : 94% (0,92g).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 170,7-169,4 (C=O); 96,9-96,5 (C_1B , C_1C); 81,3 (C_4B); 76,8 (C_4C); 71,4-70,1 (C_3B , C_3C , C_2B , C_2C); 69,7-69,2 (C_5B , C_5C); 62,6 (C_6C), 20,7 (CH_3CO); 6,9 (C_6B).

[2,3-Di-O-acétyl-6-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactopyranosyl)]-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose (**15**) [18]

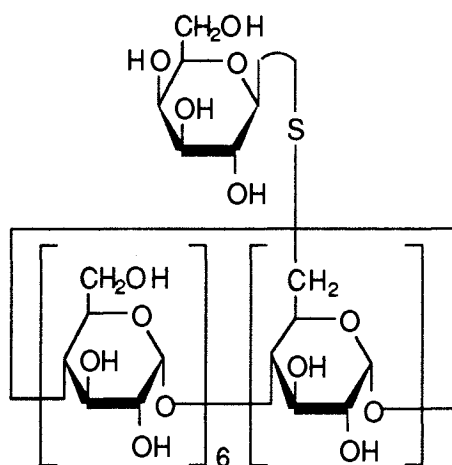


A une solution du composé **14** (400 mg, $0,19 \cdot 10^{-3}$ mole) et du composé **4** (200 mg, $0,57 \cdot 10^{-3}$ mole, 3éqs.) dans 5 mL d'HMPA sont ajoutés du 1,4-dithioérythritol (37mg, $0,228 \cdot 10^{-3}$ mole, 1,2 éqs.) puis de la cystéamine (18,5mg, $0,228 \cdot 10^{-3}$ mole, 1,2 éqs.). Le mélange est laissé sous agitation magnétique, à température ambiante, pendant 45 min. puis précipité dans 100 mL d'un mélange eau distillée-glace. Le précipité est séparé par filtration de la suspension sur verre fritté en présence de célite, lavé à l'eau distillée et repris au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. Le composé **15** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec des éluants de polarité croissante (éther de pétrole-acétone : 2:1; 2:1,5; 2:2).

Rdt : 60% (0,25g).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 170,7-169,4 (C=O); 96,9, 96,5 (C_1B , C_1C); 81,2 (C_1A); 77,0 (C_4A); 76,5-76,0 (C_4B , C_4C); 70,9-69,2 (C_3A , C_3B , C_3C , C_2A , C_2B , C_2C , C_5A , C_5B , C_5C); 62,5 (C_6C); 31,2 (C_6B); 20,7 (CH_3CO).

6-S- β -D-galactopyranosyl-6-thio-cyclomaltopheptaose (**16**) [18]

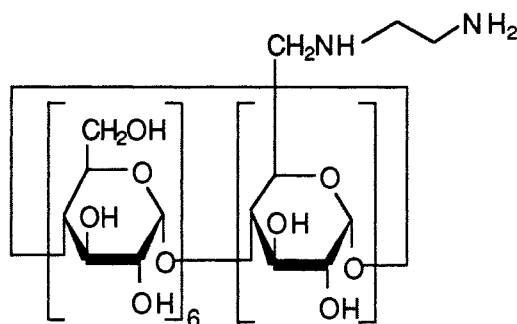


Le composé **15** (200mg, $0,086 \cdot 10^{-3}$ mole), en solution dans 3 mL de méthanol est partiellement déacétylé par une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1M, 230 μl), sous agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Le dépôt blanc d'acétate de sodium qui apparaît est alors dissous par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium (1M, 1,2 mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit, à température ambiante. Après neutralisation (pH 7) du mélange à l'aide de résine Amberlite IRN77 (3g), la solution est filtrée, concentrée puis chromatographiée sous moyenne pression sur gel de silice à polarité de phase inversée avec des éluants de polarité croissante (CH_3CN , $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$). Le composé **16**, obtenu sous forme d'une poudre blanche, est lyophilisé.

Rdt : 50% (0,06g)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) 103,4, 103,1 (C_1B , C_1C); 86,8 (C_4A); 82,9, 82,7 (C_4B , C_4C); 74,7-72,5 (C_3B , C_3C , C_2A , C_2B , C_2C , C_5B , C_5C); 69,1 (C_3A , C_5A); 66,4 (C_4A); 62,1 -61,8 (C_6A , C_6C); 31,8 (C_6B).

6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]-cyclomaltoheptaose (17**)**



La monotosyl- β -cyclodextrine **12** (0,6g, $0,465 \cdot 10^{-3}$ mole) en solution dans 15 mL d'éthylène diamine fraîchement distillée est chauffée à 60°C, sous argon, pendant 1h. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec à 40°C. Le résidu est repris par de l'acétone pour précipiter le composé **17** et la suspension obtenue est filtrée. Le précipité est lavé avec de l'acétone. Le composé **17** est alors purifié par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de gel de Séphadex CM-25; éluant : NH_4OH (1M) puis lyophilisé.

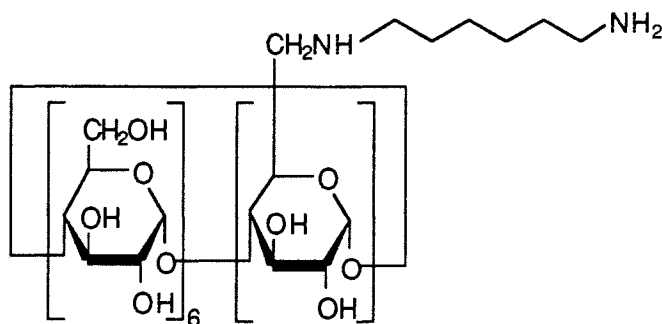
Rdt: 47% (0,26 mg).

RMN ^{13}C (D_2O) δ (ppm) : 101,8 (C_1B , C_1C); 81,8 (C_4B , C_4C); 72,9-71,7 (C_3B , C_3C , C_2B , C_2C , C_5B , C_5C); 60,1 (C_6C); 49,1 (C_6B); 48,6 (NHCH_2); 40,5, 40,3 (CH_2NH_2).

SM (FAB^+ , DEA) : 1177 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 1199 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

SM (FAB^- , DEA) : 1175 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.

6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose (**18**)



La monotosyl- β -cyclodextrine **12** (0,6g, $4,65 \cdot 10^{-4}$ mole) est dissoute dans 15 mL de DMF anhydre. De l'hexaméthylènediamine (0,81g, $6,98 \cdot 10^{-3}$ mole, 15éqs.) est additionnée et le mélange est chauffé à 60°C pendant 48h, sous atmosphère d'argon. Le DMF est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'éthanol pour précipiter le composé **18**. Le précipité est séparé par filtration de la suspension sur verre fritté. Le composé **18** est purifié par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de gel de Séphadex CM-25; éluant : NH_4OH (1M) puis lyophilisé.

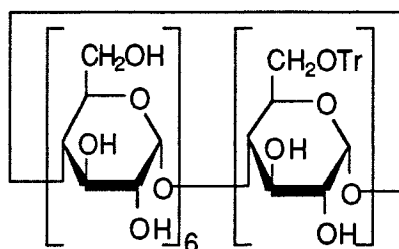
Rdt : 34% (0,19g)

RMN ^{13}C (D_2O) δ (ppm) : 101,9 (C_1B , C_1C); 83,5 (C_4B) 81,0 (C_4C); 73,2-72,0 (C_3B , C_3C , C_2B , C_2C , C_5B , C_5C); 60,0 (C_6C); 48,3 (C_6B); 47,6 (NHCH_2); 40,4, 40,2 (CH_2NH_2); 37,9-25,3 (CH_2).

SM (FAB^+ , glycérol) : 1233 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1255 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

SM (FAB^- , glycérol) : 1231 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6-O-trityl-cyclomaltoheptaose (**19**) [24]

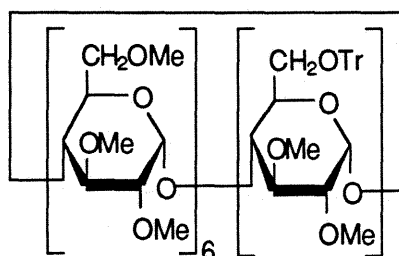


A de la β -CD (5g, $4,40 \cdot 10^{-3}$ mole) en solution dans 200 mL de pyridine anhydre, est ajouté du chlorure de trityle (1,85g, $6,64 \cdot 10^{-3}$ mole, 1,5éqs.). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 30 min. à température ambiante puis du chlorure de trityle (1,105g, $3,9 \cdot 10^{-3}$ mol; 0,9éq.) est de nouveau ajouté. Après 60 min., une troisième addition de chlorure de trityle (1,105g, 0,9éq.) est effectuée. Le mélange

réactionnel est agité 12h à température ambiante puis 12 mL d'eau distillée sont additionnés et l'ensemble est évaporé à sec sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est mis en suspension dans 200 mL d'éther puis agité plusieurs heures à température ambiante. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité, dissous dans 15 mL de DMF, est chromatographié sous moyenne pression sur colonne de silice à polarité de phase inversée par un gradient discontinu d'éluants de polarité décroissante : H₂O, H₂O-MeOH : 80:20, H₂O-MeOH : 70:30, H₂O-MeOH : 60:40. L'évaporation du mélange H₂O-MeOH : 60:40 fournit la monotrityl-β-CD **19** sous forme d'un solide blanc. Le produit ainsi obtenu est repris par 10 mL d'eau distillée et lyophilisé.

Rdt : 39% (2,37g).

(2,3-di-O-méthyl-6-O-trityl)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)
cyclomaltoheptaose (**20**) [24]



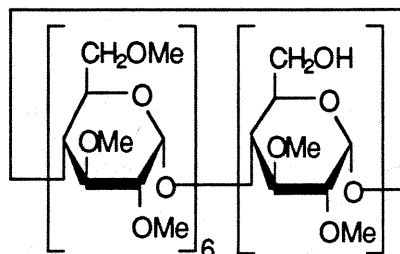
De l'hydruure de sodium (1,74g, $7,25 \cdot 10^{-2}$ mole, 72éqs.), préalablement lavé à l'hexane, est ajouté à une solution du composé **19** (1,4g, $1,01 \cdot 10^{-3}$ mole) dans le DMF anhydre (30 mL), à température ambiante et sous atmosphère d'argon. Le gel formé est laissé sous agitation pendant 20 min. puis refroidi à 0°C. De l'iodure de méthyle (9,4 mL, $1,5 \cdot 10^{-1}$ mole, 150éqs.) est alors ajouté, goutte à goutte, sur une période de 30 min.. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 24h à température ambiante sous agitation magnétique. Après refroidissement à 0°C, 20 mL de méthanol sont ajoutés pour hydrolyser l'hydruure de sodium en excès puis la solution est versée sur de la glace sous vive agitation. Le mélange est ensuite extrait par 2x100 mL de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées et lavées par 5x50 mL d'eau distillée puis séchées sur MgSO₄ et évaporées à sec sous pression réduite. Le composé **20** est obtenu sous forme d'un solide jaune utilisé sans autre purification.

Rdt : 77% (1,30g)

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ(ppm) : 144,2 (O-C-C, Ar.); 128,7, 127,73, 127,00 (CH, Ar.); 99,1 (C₁C); 97,1 (C₁B); 86,7 (C(Ph)₃); 81,9 (C₄C); 81,7-79,3

(C₄B, C₅B, C₅C); 71,3-70,9 (C₃B, C₃C, C₂B, C₂C); 63,3 (C₆B); 61,6-61,4 (C₆C); 58,9-58,3 (OCH₃)

(2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)
cyclomaltoheptaose (**21**) [24]



A une solution chloroformique (20 mL) du composé **20** (1,3g, $0,78 \cdot 10^{-3}$ mole) est ajouté de l'acide chlorhydrique concentré (1mL, 36M). Le mélange réactionnel est agité 30 min. à température ambiante puis neutralisé avec une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium, refroidie à 0°C. Il est extrait par 3x30 mL de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées et lavées à l'eau distillée puis séchées sur MgSO₄ et évaporées à sec sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice; éluant : éther 100% puis acétone 100% pour fournir le composé **21**.

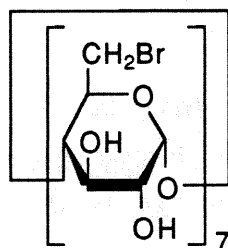
Rdt : 85% (0,94g)

SM (FAB⁺, NBA) : 1437 [M+Na]⁺.

SM (FAB⁻, NBA) : 1460 [M+2Na]⁻.

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3854,1-3503,6 (O-H); 2930,5-2833,8 (C-H, méthyl).

Heptakis(6-déoxy-6-bromo)-cyclomaltoheptaose (**22**) [66]



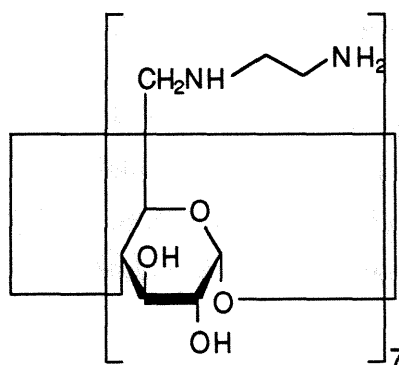
A une solution de PPh₃ (9,75g, $3,7 \cdot 10^{-2}$ mole, 21éqs.) dans le DMF anhydre (40 mL), est ajouté du brome (2 mL, $3,9 \cdot 10^{-2}$ mole, 22éqs.). Le mélange est chauffé à 60°C pendant 30 min. puis refroidi à température ambiante. La β -cyclodextrine

(2g, $1,76 \cdot 10^{-3}$ mole) est alors ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à 80°C pendant 17h. Après refroidissement à température ambiante, le pH du mélange est ajusté à 9-10 à l'aide d'une solution de méthanolate de sodium (3M) et la réaction est poussée pendant 30 min. Le mélange réactionnel est alors versé goutte à goutte dans 375 mL d'eau distillée glacée. La suspension obtenue est filtrée et le précipité est lavé avec du méthanol pour fournir le composé **22**.

Rt: 85% (2,36g).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) : 102,2 (C_1B); 84,7 (C_4B); 72,4, 72,1, 71,1 (C_2B , C_3B , C_5B); 34,5 (C_6B).

Heptakis[6-déoxy-6-(1-(2-amino)éthylamino)]-cyclomaltoheptaose (23)



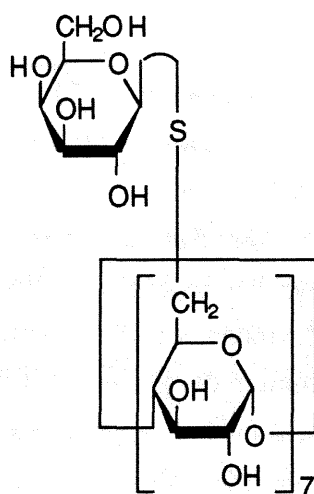
Une solution de perbromo- β -CD **22** (0,5g, $0,317 \cdot 10^{-3}$ mole) dans l'éthylène diamine fraîchement distillée (20 mL) est agitée 4,5h à température ambiante. L'éthylène diamine est alors évaporée à sec et le résidu est repris dans l'éthanol pour précipiter le composé **23**. La suspension est filtrée et le précipité est lavé à l'éthanol. Le composé **23** est purifié par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de gel Séphadex CM-25, éluant : NH_4OH (1M) puis lyophilisé.

Rdt : 80% (0,36g).

RMN ^{13}C (D_2O) δ (ppm) : 103,2 (C_1B), 83,9 (C_4B), 74,3, 73,5, 71,9 (C_2B , C_3B , C_5B), 48,7 (C_6B), 48,7 (CH_2NH), 41,9-40,7 (CH_2NH_2).

SM (FAB $^+$, DEA) : 1430 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1452 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Heptakis(6-déoxy-6-S-β-D-galactopyranosyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose (24**) [163]**



A une solution de perbromo-β-CD **22** (0,7g, $0,44 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 20 mL de DMPU est additionné du sel de sodium du 1-thio-β-D-galactopyranosyle **5** (2,1g, $5,77 \cdot 10^{-3}$ mole, 13éqs.). Le mélange réactionnel est placé sous argon et chauffé à 70°C pendant 12h. Après refroidissement à température ambiante, les produits sont précipités par addition d'acétone. La suspension est filtrée et le précipité est lavé avec de l'acétone puis redissous dans l'eau distillée. Le produit **24** précipite par addition de méthanol à la solution aqueuse. Il est séparé par filtration sur verre fritté puis lyophilisé.

Rdt: 51% (0,62g)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 104,7 (C₁B); 90,0 (C₁A); 86,2 (C₄A); 81,7 (C₄B); 76,8, 75,6, 74,8, 73,7, 73,0, 71,7 (C₂A, C₂B, C₃A, C₃B, C₅A, C₅B); 63,8 (C₆A); 35,3 (C₆B).

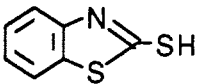
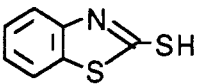
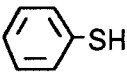
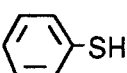
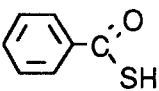
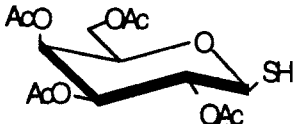
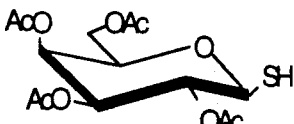
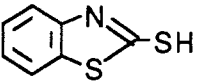
Synthèse de CDs substituées par la réaction de thio-Mitsunobu.

Protocole A :

A une solution de triphénylphosphine (2,77g, $1,056 \cdot 10^{-2}$ mole, 12éqs.) dans 10mL de pyridine anhydre est ajouté goutte à goutte et à 0°C du diisopropylazodicarboxylate (2,1mL, $1,066 \cdot 10^{-2}$ mole, 12éqs.). Le mélange est laissé sous agitation, à 0°C et sous atmosphère d'argon pendant 30 min. Une solution du thiol désiré (12éqs.), dans 10 mL de pyridine anhydre, est alors ajoutée goutte à goutte et le mélange est laissé à réagir à 0°C pendant encore 40 min.. Ce mélange est alors ajouté goutte à goutte, en 1,5h à une solution de β -CD (1g, $0,88 \cdot 10^{-3}$ mole) dans la pyridine anhydre (50mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante, sous argon, entre 2,5h. et 22h selon le thiol utilisé. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 50 mL d'acétone pour précipiter les dérivés de CDs. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé trois fois avec de l'acétone. Les produits sont ensuite purifiés par chromatographie moyenne pression sur gel de silice à polarité de phase inversée (C18, 5-20 μ m) par un gradient discontinu d'éluants de polarité décroissante : H₂O-MeOH :70:30. à 30:70.

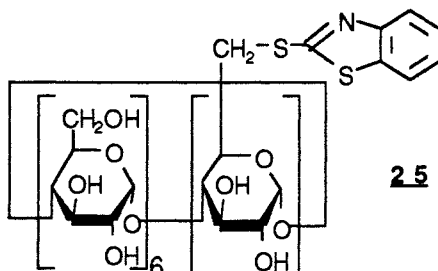
Protocole B :

A une solution de β -CD (1g, $0,88 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10 mL de solvant anhydre, à température ambiante et sous atmosphère d'argon sont ajoutés successivement de la triphénylphosphine (2,77g, $1,056 \cdot 10^{-2}$ mole, 12éqs) et le thiol ($0,52 \cdot 10^{-2}$ mole, 6éqs). La solution est protégée de la lumière et de l'iPrAD ($0,52 \cdot 10^{-2}$ mole, 6éqs) est additionné goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 4h à température ambiante puis une deuxième addition d'iPrAD (6éqs) est effectuée. La solution est encore agitée 4h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. L'addition d'acétone au résidu permet la précipitation des dérivés de CDs. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé trois fois avec de l'acétone. Les produits sont ensuite purifiés par CLHP préparative moyenne pression sur gel de silice à polarité de phase inversée (C18, 5-20 μ m) par un gradient discontinu : H₂O-MeOH de polarité décroissante.

CD	Thiol	Produit	Solvant	Protocole	Rdt
β -CD		25	pyridine	A	28%
β -CD		26	pyridine	A	14%
β -CD		27	pyridine	A	15%
β -CD		28	DMF	B	5%
β -CD		29	pyridine	A	29%
β -CD		30	pyridine	A	8%
β -CD		30	DMF	B	15%
21		31*	toluène	B	50%

* : Le protocole B a été modifié comme suit pour la synthèse de ce composé :

- une seule addition de 12 éqs d'iPrAD a été effectuée,
- temps de réaction : 2h,
- purification sur colonne de gel de silice : éluant : éther de pétrole 70 / acétone 30.



25 : RMN ^{13}C (DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 166,3 ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$); 152,8 ($\text{C}-\text{N}$, Ar); 134,9 ($\text{C}-\text{S}$, Ar); 126,5, 124,6, 122,0, 121,1 (CH , Ar); 102,8-101,5 (C_1B , C_1C); 85,7 (C_4B); 82,1-81,5 (C_4C); 73-72,3 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C); 69,3-68 (C_5B , C_5C); 60,2-59,8 (C_6C); 35,6 (C_6B).

SM (FAB^+ , glycérol) m/z : 1285 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1306 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

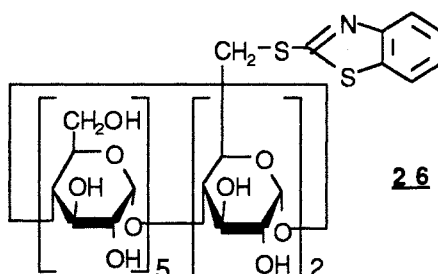
SM (FAB^- , glycérol) m/z : 1283 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV (H_2O) ($\epsilon \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) : 226 (17097); 279 (10968); 283 (10645); 299 (9355)

Analyse élémentaire ($\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{O}_{34}\text{NS}_2, 5 \text{ H}_2\text{O}$) :

Calculée % : C : 42,82, H : 6,05, N : 1,02, S : 4,66:

Trouvée % : C : 42,83, H : 6,90, N : 1,15, S : 3,97



26 : RMN ^{13}C (DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 166,2-166,1 ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$); 152,8-152,6 ($\text{C}-\text{N}$, Ar); 134,9-134,7 ($\text{C}-\text{S}$, Ar); 126,5, 126,3, 124,6, 124,5, 121,7, 121,1, 120,9, (CH , Ar); 102,8-101,5 (C_1B , C_1C); 85,8-85,4 (C_4B); 81,9-80,9 (C_4C); 73,1-72,1 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C); 69,5-69,3 (C_5B , C_5C); 59,4 (C_6C); 35,3 (C_6B).

SM (FAB^+ , glycérol) m/z : 1433 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1456 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

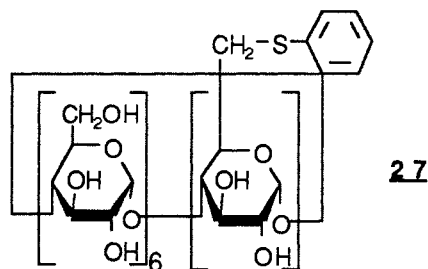
SM (FAB^- , glycérol) m/z : 1431 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV (H_2O) ($\epsilon \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) : 254 (2510)

Analyse élémentaire ($\text{C}_{56}\text{H}_{76}\text{O}_{33}\text{N}_2\text{S}_4, 4 \text{ H}_2\text{O}$) :

Calculée % : C : 44,65, H : 5,58, N : 1,86, S : 8,50:

Trouvée % : C : 44,68, H : 5,79, N : 1,82, S : 8,07



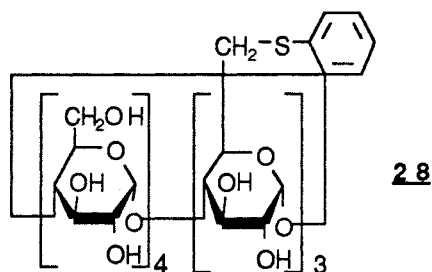
27 : RMN ^{13}C (DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 136,6, 130,3, 129,0, 126,3 ($\underline{\text{CH}}$, Ar); 102,1 (C_1B , C_1C); 85,2 (C_4B); 81,6 (C_4C); 73,2-72,2 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C , C_5B , C_5C); 60,1 (C_6C); 35,9 (C_6B).

SM (FAB $^+$, glycérol) m/z : 1227 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1250 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{34}\text{S}$, 7 H_2O) :

Calculée % : C : 42,60, H : 6,50, S : 2,36:

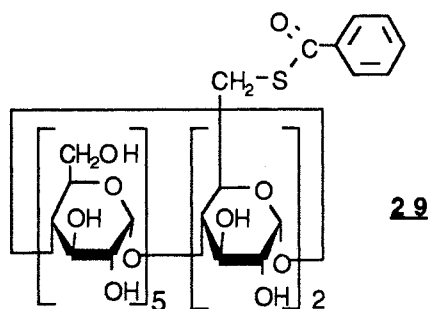
Trouvée % : C : 42,58, H : 6,55, S : 2,30



28 : SM (FAB $^-$, glycérol) m/z : 1409,4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ pour $\text{C}_{60}\text{H}_{81}\text{O}_{32}\text{S}_3$

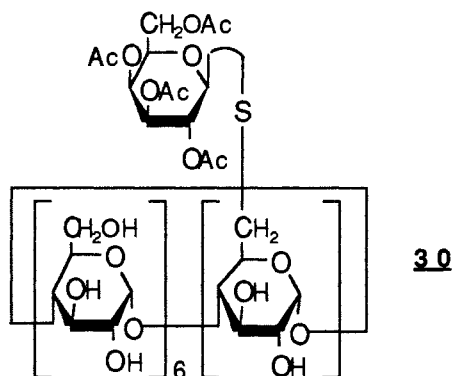
SMHR (FAB $^-$, glycérol) m/z : 1409,3873 $[\text{M}-\text{H}]^-$ pour $\text{C}_{60}\text{H}_{81}\text{O}_{32}\text{S}_3$

(m/z calculée : 1409,3867)



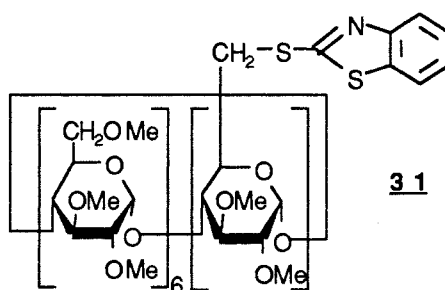
29 : RMN ^{13}C (DMSO- d_6) $\delta(\text{ppm})$: 190,7-190,4 ($\text{C}=\text{O}$); 136,3 ($\underline{\text{C}}$, Ar), 133,5, 128,7, 126,7 ($\underline{\text{CH}}$, Ar); 102,8-101,4 (C_1B , C_1C); 86,1-85,7 (C_4B); 80,9-80,7 (C_4C); 73,0-72,3 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C ,); 69,8-69,4 (C_5B , C_5C); 59,4 (C_6C); 35,9 (C_6B).

SM (FAB⁺, glycérol) m/z : 1375 [M+H]⁺; 1397 [M+Na]⁺



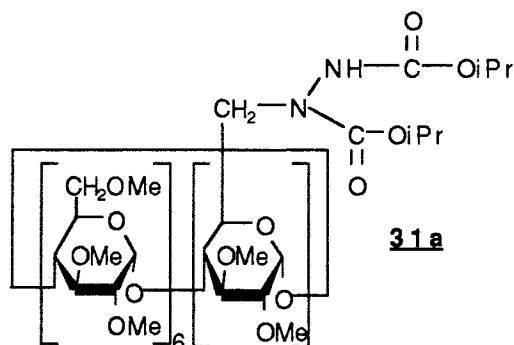
30 : RMN ¹³C (DMSO-d₆) δ(ppm) : 136,6, 130,3, 129,0, 126,3 (CH, Ar); 102,1 (C₁B, C₁C); 85,2 (C₄B); 81,6 (C₄C); 73,2-72,2 (C₂B, C₂C, C₃B, C₃C, C₅B, C₅C); 60,1 (C₆C); 35,9 (C₆B).

SM (FAB⁺, glycérol) m/z : 1481 [M+H]⁺; 1503 [M+Na]⁺



31 : RMN ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) : 165,7 (N=C=S); 153,5 (C-N, Ar); 135,3 (C-S, Ar); 126,1, 124,7, 122,0, 121,5 (C, Ar); 99,4-97,9 (C₁B, C₁C); 82,4 -81,1 (C₄B, C₄C); 80,8-79,9 (C₂B, C₂C, C₃B, C₃C); 71,8-70,4 (C₅B, C₅C); 61,80-61,14 (C₆C); 59,4-58,2 (O-CH₃); 36,8 (C₆B).

SM (FAB⁺, NBA) m/z : 1565 [M+H]⁺; 1587 [M+Na]⁺



31a : RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 155,9 (N-C=O); 99,1 (C_1B , C_1C); 87,7-79,9 (C_4B , C_4C , C_2B , C_2C , C_3B , C_3C); 72,0-70,6 (C_5B , C_5C); 61,8-61,1 (C_6C); 59,2-58,6 (O-CH₃); 43,0 (C_6B); 27,5-27,4 (CH_3).

SM (FAB⁺, NBA) m/z : 1625 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

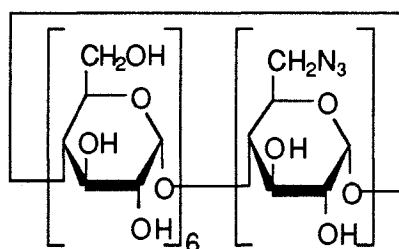
Analyse élémentaire ($\text{C}_{70}\text{H}_{124}\text{O}_{38}\text{N}_2$) :

Calculée % : C : 52,46, H : 7,75, N : 1,75

Trouvée % : C : 52,48, H : 7,90, N : 1,92

Synthèse de dimères de β -CDs

6-déoxy-6-azido-cyclomaltoheptaose (**32**) [18]



A une solution de monotosyl- β -CD **12** (1g, $0,78 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10 mL de DMF, est ajouté 1g ($1,54 \cdot 10^{-2}$ mole, 20éqs) d'azoture de sodium. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12h. Le DMF est alors évaporé sous pression réduite et le résidu est repris avec de l'acétone. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité obtenu est lavé avec de l'acétone. De l'acide acétique est alors additionné au précipité pour détruire l'azoture de sodium en excès puis la suspension est évaporée à sec sous pression réduite et reprise trois fois avec 20 mL d'eau distillée pour éliminer les traces d'acide acétique. Le composé **32** est ensuite lyophilisé.

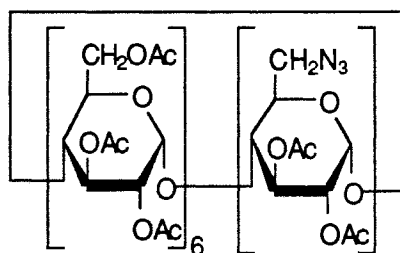
Rdt : 80% (0,72g).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) : 102,1 (C_1B , C_1C); 83,1 (C_4B); 81,7 (C_4C); 73,2-72,1 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C); 70,3 (C_5B , C_5C); 60,0 (C_6C); 51,2 (C_6B).

SM (FAB $^+$, glycérol) m/z : 1160 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

IR (KBr) ν (cm^{-1}) : 3444,7-3372,7 (O-H); 2926,4 (C-H); 2105,7 (N_3).

(2,3-di-O-acétyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose (33**)**



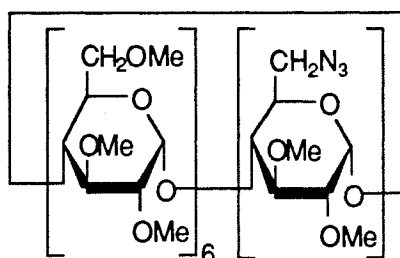
Ce composé a été synthétisé par modification d'un protocole décrit dans la littérature [27]. L'azido-cyclodextrine **32** (1g, $0,86 \cdot 10^{-3}$ mole) est acétylée par un mélange pyridine anhydre / anhydride acétique (2:1) (30mL), à température ambiante, pendant 6,5h en présence de 100mg de 4-diméthylaminopyridine. Le mélange réactionnel est alors versé dans 150mL d'eau distillée glacée où il précipite. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé avec de l'eau distillée et repris avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée à sec pour fournir le composé **33**.

Rdt : 69% (1,2g)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 170,7-169,4 (C=O); 96,7-96,5 (C_1B , C_1C); 71,0-69,5 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C , C_5B , C_5C); 62,4 (C_6C); 50,7 (C_6B).

SM (FAB $^+$) m/z : 2002 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 2024 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

(2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose (34**) [27]**

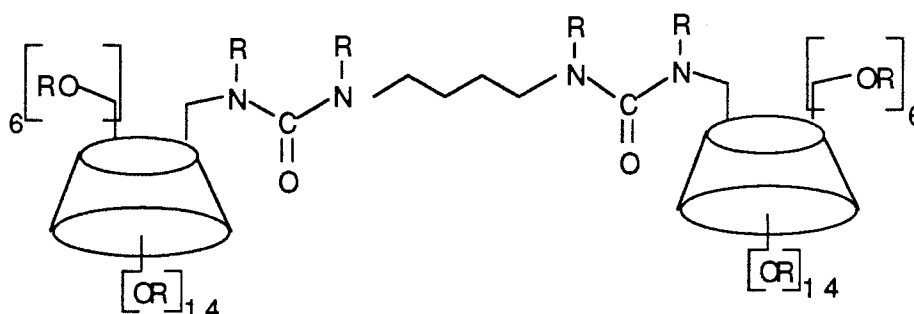


Ce composé est obtenu selon un protocole identique à celui de la (2,3-di-O-méthyl-6-O-trityl)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)- β -CD **20** à partir de l'azido-cyclodextrine **32**.

Rdt : 75% (0,62g)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 98,9-98,4 (C_1B , C_1C); 81,7 (C_4B); 80,2 (C_4C); 71,3-70,9 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C , C_5B , C_5C); 61,4 (C_6C); 58,9-58,5 ($\text{O}-\underline{\text{CH}}_3$); 52,0 (C_6B).

Bis-[hexakis(poly-O-acétyl)-(poly-O-acétyl-cyclomaltoheptaosyl)-6-(3-uréido)]-1,4-butanediamine (35a**)**

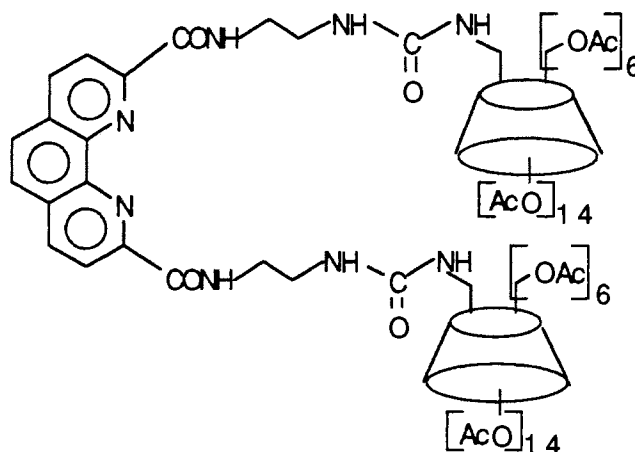


R = H, Ac

Une solution de butane diamine (0,104 mL, $1,03 \cdot 10^{-3}$ mole, 1,2éqs) dans le DMF est saturée en CO_2 pendant 1h puis l'azido-CD **32** (1g, $0,86 \cdot 10^{-3}$ mole), en solution dans 25 mL de DMF est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est, à nouveau saturé en CO_2 pendant 1h puis, de la triphénylphosphine (2,2g, $0,86 \cdot 10^{-3}$ mole, 10éqs.), en solution dans 5 mL de DMF est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 24h à température ambiante, sous courant de CO_2 . Le DMF est alors évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par de l'acétone pour précipiter les dérivés de CDs. La suspension est filtrée et le précipité est lavé avec de l'acétone. Il est d'abord purifié par chromatographie d'échange d'ions (éluant : NH_4OH , 1M) pour éliminer les composés aminés, produits secondaires de la réaction. Le mélange résiduel est ensuite acétylé par l'anhydride acétique dans la pyridine en présence d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine, à température ambiante, pendant 6h. Le mélange réactionnel est alors versé dans un mélange eau distillée-glace où il précipite. La suspension est filtrée et le précipité est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'éluants de polarité croissante : hexane / acétone. L'évaporation du mélange hexane 60 / acétone 40 fournit le composé partiellement acétylé **35a** (112mg).

RMN ^{13}C (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 171,3-169,3 ($\text{C}=\text{O}$); 158,1 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}=\text{O}$); 96,8-96,2 (C_1B , C_1C); 71,3-69,0 (C_2B , C_2C , C_3B , C_3C , C_5B , C_5C); 62,6, 62,3 (C_6C); 41,4 (C_6B); 39,5, 39,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$); 29,1-26,1 (CH_2); 22,9, 20,6 (CH_3).

Bis-[[hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)]-2,3-di-O-acétyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline (35)



Une solution d'azido cyclodextrine acétylée **33** (0,5g, $0,25 \cdot 10^{-3}$ mole) et de triphénylphosphine (0,656g, $2,50 \cdot 10^{-3}$ mole, 10éqs.) dans 40 mL de DMF anhydre est agitée sous atmosphère d'argon, à température ambiante pendant 10min.. La phénanthroline diamine **2** (53mg, $0,15 \cdot 10^{-3}$ mole, 0,6éq.) est progressivement additionnée au mélange et simultanément un courant de CO₂ sec est déclenché. Le mélange réactionnel est agité 24h à température ambiante, sous courant de CO₂. Le DMF est alors évaporé sous pression réduite et le résidu est extrait par 3x50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées à sec sous pression réduite. Le mélange obtenu est purifié sur colonne de gel de silice avec un gradient d'éluate de polarité croissante CH₂Cl₂ / MeOH. L'évaporation du mélange CH₂Cl₂ 93 /MeOH 7 fournit le composé **35**.

Rdt : 31% (0,2g)

SM (FAB⁺) m/z : 4354 [M+2H]⁺; 2197 [M+3Na-X]⁺
$$X = -\text{CD}-\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}-$$
SMHR : (FAB⁺) m/z : 4352,2979 [M]⁺ pour C₁₈₄H₂₃₉O₁₁₂N₈

(m/z calculée) : 4352,3234

UV (MeOH) (ϵ l.mol⁻¹.cm⁻¹) : 237 (47391), 284 (26273).

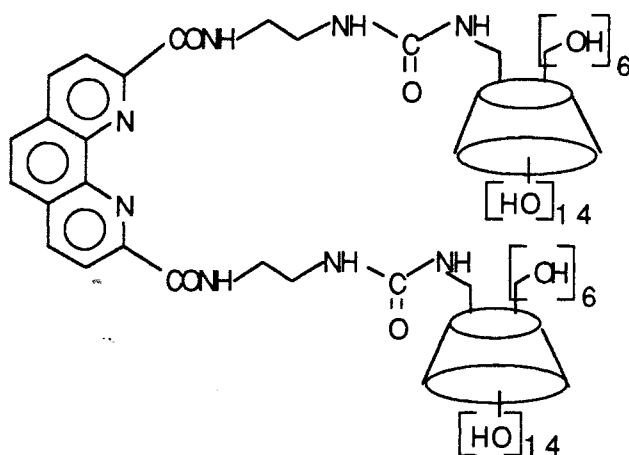
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3750-3420,4 (N-H); 2958 (C-H, Ar); 1748-1654 (C=O); 1559,3 (C=N, Ar); 1498 (C=C, Ar).

Analyse élémentaire ($C_{184}H_{239}O_{112}N_8, 11 H_2O$) :

Calculée % : C : 48,53, H : 5,74, N : 2,46:

Trouvée % : C : 48,52, H : 5,53, N : 3,12

Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]-1,10-phénanthroline (36**)**



Le composé **35** (0,1g, $0,02 \cdot 10^{-3}$ mole) en solution dans 3mL de méthanol est déacétylé, à température ambiante par le méthanolate de sodium (120 μ L, 1M). Le mélange est laissé 2h sous agitation à température ambiante puis de l'hydroxyde de sodium (400 μ L, 1M) est ajoutée et le mélange réactionnel est laissé 12h sous agitation, à température ambiante puis il est neutralisé à l'aide de résine Ambrelite IRN-77. La résine et le précipité sont séparés par filtration de la suspension et le précipité est dissous dans l'eau distillée puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris dans un minimum d'eau distillée et le composé **36** est précipité par addition d'acétone.

Rdt : 49% (0,03g)

SM (FAB⁺) m/z : 2672 [M+H]⁺

SMHR : (FAB⁺) m/z : 2671,9026 [M+H]⁺ pour $C_{104}H_{159}O_{72}N_8$

(m/z calculée) : 2671,9014 [M+H]⁺.

UV (H_2O) (ϵ l.mol⁻¹.cm⁻¹) : 237 (17023), 284 (11085).

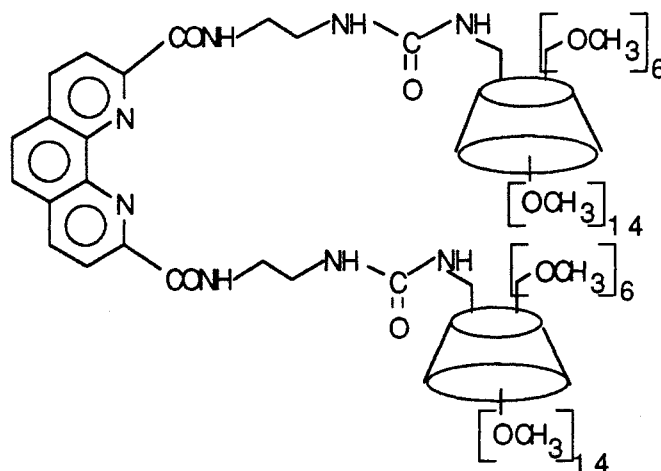
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3748,1-3382 (N-H, O-H); 2928 (C-H, Ar); 1652 (C=O,); 1558,2 (C=N); 1498,6 (C=C, Ar).

Analyse élémentaire ($C_{104}H_{159}O_{72}N_8, 24 H_2O$) :

Calculée % : C : 40,21, H : 6,67, N : 3,61

Trouvée % : C : 40,24, H : 5,87, N : 3,34

Bis-[[hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)]-2,3-di-O-méthyl-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-uréido]]-1,10-phénanthroline (37**)**



Ce composé est obtenu selon un protocole identique à celui du composé **35** à partir de la (2,3-di-O-méthyl-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose **34** et de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2**. Le composé **37** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'éluants de polarité croissante CH_2Cl_2 /MeOH. L'évaporation du mélange CH_2Cl_2 92/MeOH 8 fournit le composé **37**.

Rdt : 19% (0,12g)

SM (FAB⁺) m/z : 3240 [M+H + Li]⁺; 3271 [M+K]⁺

SMHR : (FAB⁺) m/z : 3270,4788 [M+K]⁺ pour $\text{C}_{144}\text{H}_{238}\text{O}_{72}\text{N}_8$

(m/z calculée) : 3270,6192 [M+K]⁺

UV (MeOH) (ϵ l.mol⁻¹.cm⁻¹) : 232 (22891), 284 (12838).

IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3384,8 -3348(N-H); 2927-2834 (C-H, Ar); 1733-1651,9 (C=O);

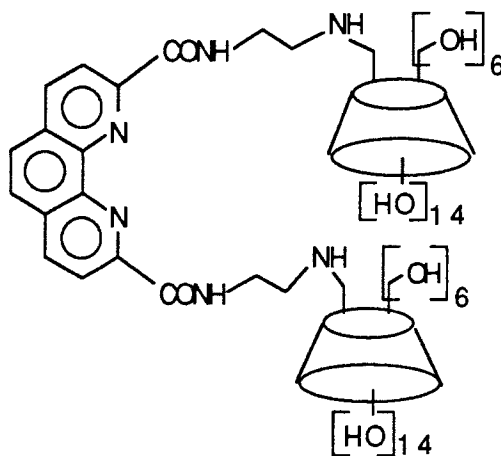
1567,5 (C=N); 1498,0 (C=C, Ar).

Analyse élémentaire ($\text{C}_{144}\text{H}_{238}\text{O}_{72}\text{N}_8$) :

Calculée % : C : 53,46, H : 7,36, N : 3,46

Trouvée % : C : 53,55, H : 7,66, N : 5,93

Bis-cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline (38**)**



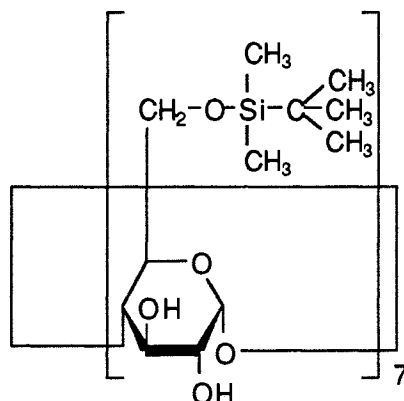
A une suspension de 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** (0,465g, $1,32 \cdot 10^{-3}$ mole, 3éqs.) dans 10 mL de DMF anhydre, à température ambiante et sous atmosphère d'argon sont ajoutés successivement de la β -CD (0,5g, $0,44 \cdot 10^{-3}$ mole) et de la triphénylphosphine (2,08g, $7,93 \cdot 10^{-3}$ mole, 18éqs). La solution est protégée de la lumière et de l'iPrAD (0,52 mL, $2,64 \cdot 10^{-3}$ mole, 6éqs) est additionné goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 2,5h à température ambiante puis il est filtré et le filtrat est évaporé sous pression réduite. L'addition d'acétone au résidu d'évaporation permet la précipitation des dérivés de CDs. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé trois fois avec de l'acétone. Les produits sont ensuite purifiés par CLHP préparative moyenne pression sur gel de silice à polarité de phase inversée par un gradient discontinu d'éluate de polarité décroissante : H₂O-MeOH. Le dimère **38** est élué par le mélange H₂O 90 / MeOH 10. Après évaporation, le dimère **38** est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Rdt : 1,75% (0,01g)

SM (FAB⁺) m/z : 2464 [M-7OH]⁺ 2657 [M+H+3Na]⁺

UV (H₂O) (ϵ l.mol⁻¹.cm⁻¹) : 284 (1523,8)

Synthèse de CDs substituées sur la face des hydroxyles secondaires

Heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)cyclomaltoheptaose (**39**) [92]

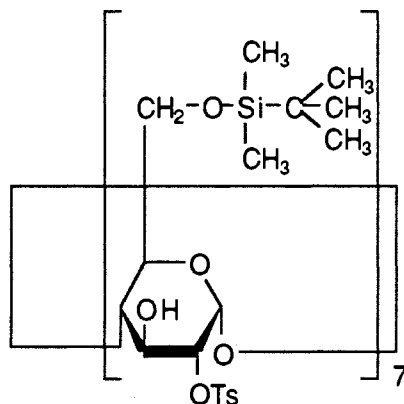
A une solution de β -CD (1g, $0,88 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 15 mL de pyridine anhydre placée sous argon et refroidie à 0°C, est ajouté, goutte à goutte, du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1,40g, $8,8 \cdot 10^{-3}$ mole, 10éqs.) en solution dans 12 mL de pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 3h puis à température ambiante pendant 12h. La réaction est alors stoppée par addition de 10mL d'eau distillée. La suspension obtenue est filtrée sur verre fritté et le précipité blanc est lavé à l'eau distillée. Le produit **39** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice : éluant: CH_2Cl_2 / MeOH / H_2O = 90:9:1.

Rdt : 74% (1,26g).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) : 133,1-128,3 (CH, Ar); 102,1 (C1B); 81,8 (C4B); 73,7; 73,4; 72,6 (C2B, C3B; C5B); 61,7 (C6B); 25,9 (CMe₃); 18,3 (CMe₃); -5,2 (SiMe₂).

SM (FAB⁻, NBA) : 1972 [M+K⁺]⁻; 1932 [M-H]⁻.

Heptakis(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-Tosyl)-cyclomaltoheptaose (39a**) [98]**

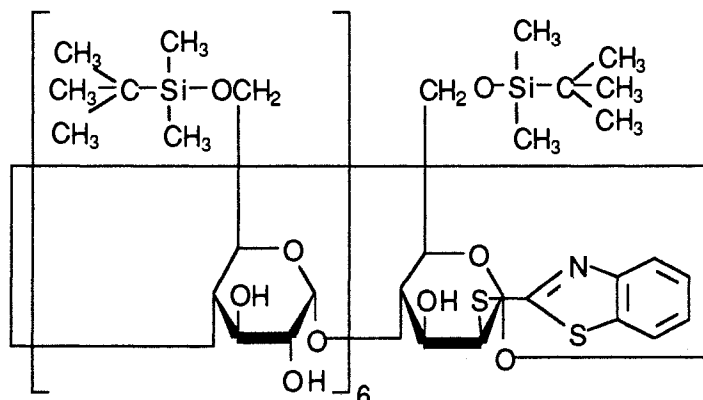


A une solution d'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD **39** (0,5g, $0,26 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10mL de pyridine anhydre et sous atmosphère d'argon, sont additionnés successivement 1,05g ($5,5 \cdot 10^{-3}$ mole, 21 éqs) de chlorure de tosyle et 0,1g de 4-diméthylaminopyridine. Le mélange réactionnel est chauffé à 50°C pendant 24h puis le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est extrait par 3x20 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées à sec sous pression réduite. Le produit **39a** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice : éluant: éther de pétrole 80 / acétone 20.

Rdt : 50% (0,39g).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) : 145,1, 133,1, 129,6, 128,3 (C Ar); 98,8 (C_1B); 79,8 (C_2B , C_4B); 71,6 (C_3B); 69,9 (C_5B); 61,6 (C_6B); 25,9 (CMe_3); 22,6 (CH_3 , Ts); 18,3 (CMe_3); -5,2, -5,3 (SiMe_2).

(2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O-tert-butyldiméthylsilyl)-Hexakis-(6-O-tert-butyldiméthylsilyl)- β -CD (40**).**



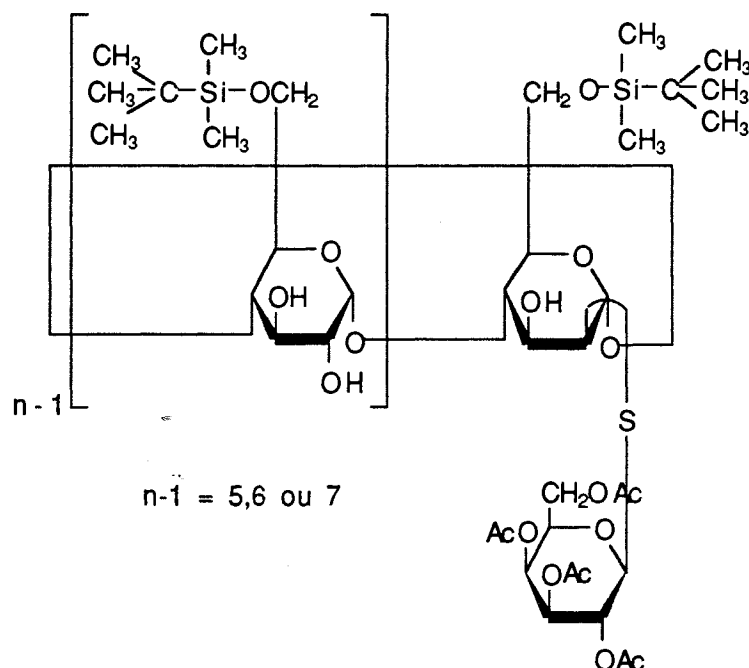
A une solution d'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD **39** (0,5g, $0,26 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10mL de THF anhydre et sous atmosphère d'argon, sont additionnés successivement de la triphénylphosphine (0,815g, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mole, 12éqs.) et du 2-mercaptobenzothiazole (0,52g, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mole, 12éqs.). A ce mélange, placé à température ambiante et à l'abri de la lumière est ajouté, goutte à goutte, du diisopropylazodicarboxylate (0,612mL, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mole, 12éqs.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3h puis le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éther et placé à 4°C pour précipiter l'oxyde de triphénylphosphine et le diisopropylhydrazine dicarboxylate. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé à l'éther. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est déposé sur une colonne de gel de silice. Le mélange est purifié avec un gradient d'éluants de polarité croissante : CH_2Cl_2 / MeOH. L'évaporation du mélange CH_2Cl_2 95 / MeOH 5 fournit le composé **40**.

Rdt : 15% (0,08g)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 153,9 ($\underline{\text{C-N}}$, Ar); 132,6 ($\underline{\text{C-S}}$, Ar); 129,0, 128,9, 123,5, 118,6 ($\underline{\text{CH}}$, Ar); 102,2 (C_1C); 99,3 (C_1B); 82,3-82,2 (C_4C); 82,0-81,8 (C_4B); 81,4 (C_2B); 74,0-72,7 (C_2C , C_3C , C_5B , C_5C); 70,6 (C_3B); 62,5-61,9 (C_6B , C_6C); 26,3 ($\underline{\text{CMe}_3}$); 18,7 ($\underline{\text{CMe}_3}$); -4,7 ($\underline{\text{SiMe}_2}$).

SM (FAB^+) : 2155 [$\text{M} + 0,85 \text{CH}_2\text{Cl}_2$] $^+$.

(2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio-β-D-galactopyranosyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Per-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-CDs (**41** (α-CD), **42** (β-CD), **43** (γ-CD))



A une solution de Per-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)-CD (0,5g) dans 10mL de THF anhydre et sous atmosphère d'argon, sont additionnés successivement de la triphénylphosphine (12éqs) et le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio-β-D-galactopyranose **4** (6éqs). A ce mélange, placé à température ambiante et à l'abri de la lumière est ajouté, goutte à goutte, du diisopropylazodicarboxylate (12éqs). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3h puis le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éther et placé à 4°C pour précipiter l'oxyde de triphénylphosphine et le diisopropylhydrazine dicarboxylate. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé à l'éther. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est déposé sur une colonne de gel de silice. Le mélange est purifié avec un gradient d'éluants de polarité croissante : CH₂Cl₂ / MeOH.

41 : Rdt : 10% (0,06g).

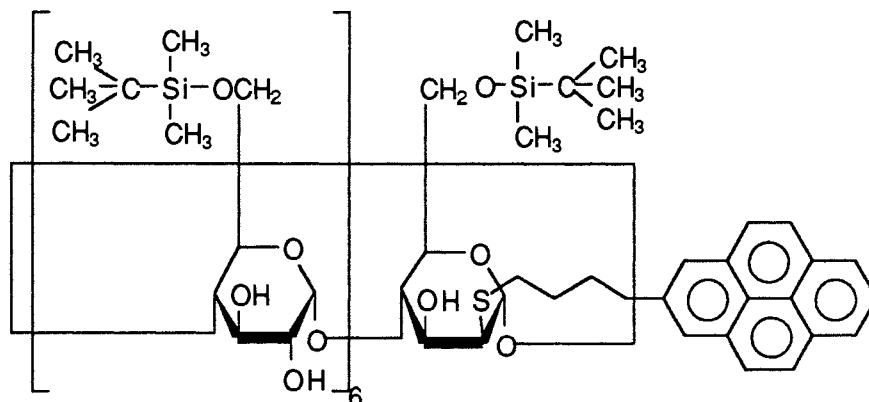
42 : Rdt : 17% (0,1g)

SM (FAB⁺NBA) : 2278 [M+H]⁺; 2043 [M-X]⁺.

X= 4CH₃COO

43 : Rdt : 9,5% (0,055g).

= (2-déoxy-2-S-(1-(4-pyrène)-mercaptobutyl)-6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD (**44**).



A une solution d'heptakis-(6-O-*tert*-butyldiméthylsilyl)- β -CD **39** (0,5g, $0,26 \cdot 10^{-3}$ mole) dans 10mL de THF anhydre et sous atmosphère d'argon, sont additionnés successivement de la triphénylphosphine (0,815g, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mole, 12éqs.) et le 1-(4-pyrène)-butanethiol **11** (0,9g, 0,90 mole, 12éqs.). A ce mélange, à température ambiante et placé à l'abri de la lumière est ajouté, goutte à goutte, du diisopropylazodicarboxylate (0,612 mL, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mole, 12éqs.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. puis le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éther et placé à 4°C pour précipiter l'oxyde de triphénylphosphine et le diisopropylhydrazine dicarboxylate. La suspension est filtrée sur verre fritté et le précipité est lavé avec de l'éther. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est déposé sur une colonne de gel de silice. Le mélange est purifié avec un gradient d'éluants de polarité croissante : CH_2Cl_2 / MeOH. L'évaporation du mélange CH_2Cl_2 98 / MeOH 2 fournit le composé **44**.

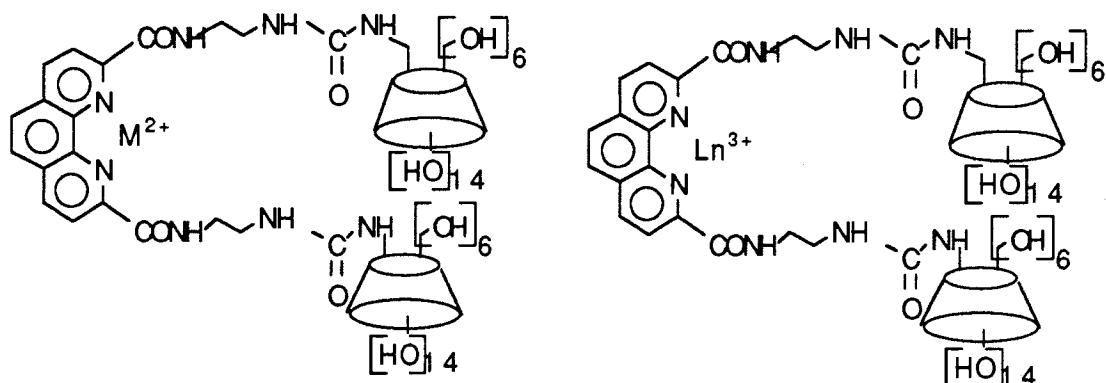
44 : Rdt : 3% (0,017g)

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 7,63-7,38 (m, H_{Ar}); 5,23-4,76 (m, H CD, unité substituée); 4,04-3,41 (H CD, autres unités); 0,83 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$); -0,03 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-Si}$)

SM (FAB^+NBA) : 2206 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse de complexes des dimères de β -CDs

Complexes à partir du dimère **36** :



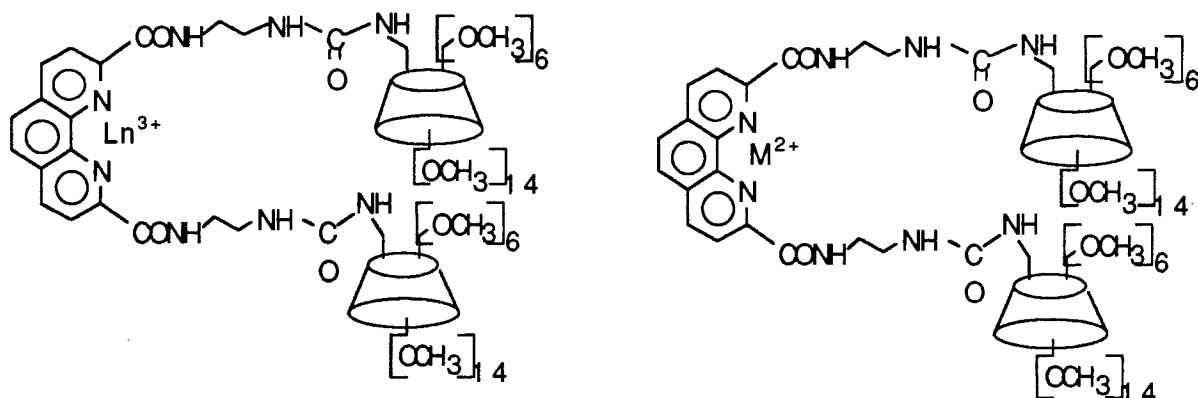
A une solution aqueuse (1mL) de dimère **36** (5 mg, $1,87 \cdot 10^{-6}$ mole) est ajouté du sel cuivre ($CuCl_2$, $CuBF_4$) ou de ruthénium ($RuCl_3$) (1éq). La solution est agitée 5h à température ambiante puis évaporée à sec sous pression réduite. Le produit d'évaporation est ensuite lyophilisé.

36- $CuCl_2$: UV (H_2O) (ϵ mol $^{-1}$.l.cm $^{-1}$) : 235 (21230); 284 (13075)

36- $CuBF_4$: UV (H_2O) (ϵ mol $^{-1}$.l.cm $^{-1}$) : 235 (42005); 284 (25948)

36- $RuCl_3$: UV (H_2O) (ϵ mol $^{-1}$.l.cm $^{-1}$) : 235 (24287); 284 (13915)

Complexes à partir du dimère **37** :



A une solution méthanolique (1mL) de dimère **37** (5 mg, $1,56 \cdot 10^{-6}$ mole) est ajouté du sel cuivre ($CuCl_2$, $CuBF_4$) ou de ruthénium ($RuCl_3$) (1éq). La solution est

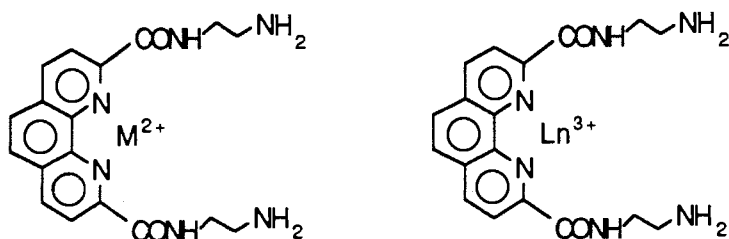
agitée 5h à température ambiante puis évaporée à sec sous pression réduite. Le produit d'évaporation est ensuite lyophilisé.

37-CuCl₂ : UV (MeCN) (ϵ mol⁻¹.l.cm⁻¹) : 287 (37975); 460 (4355)

37-CuBF₄ : UV (MeOH) (ϵ mol⁻¹.l.cm⁻¹) : 222 (32400); 280 (21404)

37-RuCl₃ : UV (MeOH) (ϵ mol⁻¹.l.cm⁻¹) : 280 (231686)

Complexes à partir de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline **2** :



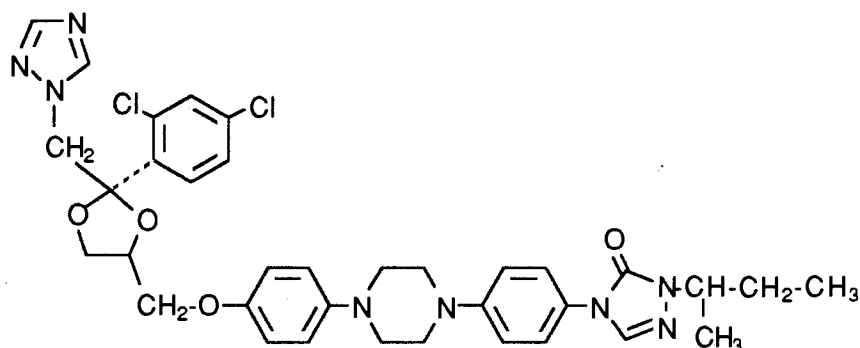
A une solution aqueuse (1mL) de diamine **2** (5 mg, 1,42.10⁻⁵ mole, 2éqs) est ajouté du sel cuivre ou de ruthénium (CuCl₂, RuCl₃) (1éq). La solution est agitée 1h à température ambiante puis évaporée à sec sous pression réduite. Le produit d'évaporation est ensuite lyophilisé.

2-RuCl₃ : RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm) : 8,74 (d, 2H, H₄, H₇, J= 8Hz); 8,50 (d, 2H, H₃, H₈, J= 8Hz); 8,18 (d, 2H, H₅, H₆, J= 8Hz); 3,79 (2H, CH₂-NH-CO); 3,14 (t, 2H, CH₂-NH₂).

Etude physico-chimique

A- Construction des courbes de complexation des composés avec le dimère **36**.

1- Courbe de complexation de l'Itraconazole



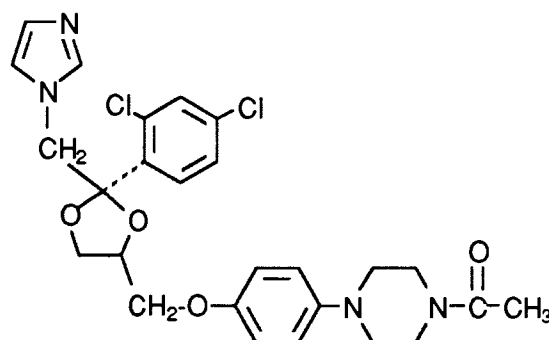
Itraconazole : solution stock dans le méthanol : $C = 5,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

concentration finale : $C_0 = 8,50 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

Dimère : solution stock dans l'eau distillée : $C_1 = 1,87 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

Méthode : La courbe de complexation est obtenue à partir de la mesure de l'intensité d'émission de fluorescence de l'itraconazole à 382nm pour $\lambda_{\text{exc}} = 305\text{nm}$.

2- Courbe de complexation du Kétoconazole :



Kétoconazole : solution stock dans le méthanol : $C = 3,01 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

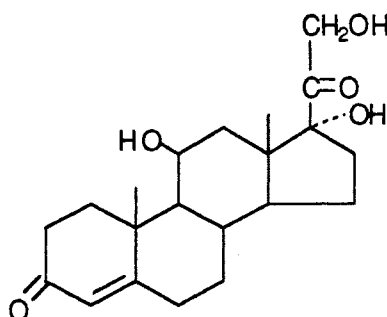
concentration finale : $C_0 = 7,53 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Dimère : solution stock dans l'eau distillée : $C_1 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Méthode : La courbe de complexation est obtenue à partir de la mesure de

l'intensité d'émission de fluorescence du kétoconazole à 373nm pour $\lambda_{exc} = 305nm$

3- Courbe de complexation de l'Hydrocortisone :



Hydrocortisone : solution stock dans le méthanol : $C = 2,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
concentration finale : $C_0 = 0,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Dimère : solution stock dans l'eau distillée : $C_1 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Méthode : L'hydrocortisone ne possédant pas de spectre d'émission de fluorescence, sa courbe de complexation est obtenue à partir de la mesure de l'absorbance à $\lambda = 246nm$.

4- Dilutions utilisées pour le dimère **36** : $C_1/125$; $C_1/150$; $C_1/200$; $C_1/300$; $C_1/400$ pour les trois composés et $C_1/50$; $C_1/75$; $C_1/100$ pour l'hydrocortisone.

Les constantes de stabilité des complexes sont obtenues par le calcul de la pente de la droite $[\text{soluté}] = f [\text{dimère}]$.

Complexes	K (L.mol ⁻¹)
Itraconazole- 36	99,06
Kétoconazole - 36	131,06

B- Etude de l'hydrolyse du BNPP par les complexes métalliques du dimère 36

Conditions expérimentales :

Dimère 36 : $0,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$

$\text{CuCl}_2/\text{EuCl}_3/\text{ZnCl}_2$: $0,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$

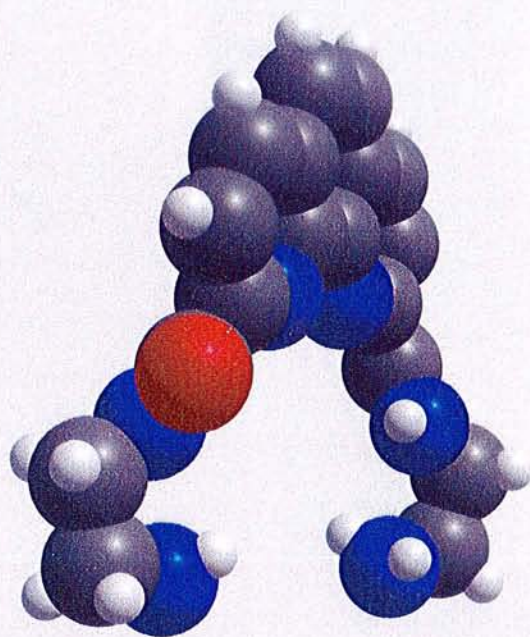
H_2O_2 : $48 \cdot 10^{-3} \text{M}$

BNPP : $0,06 \cdot 10^{-3} \text{M}$

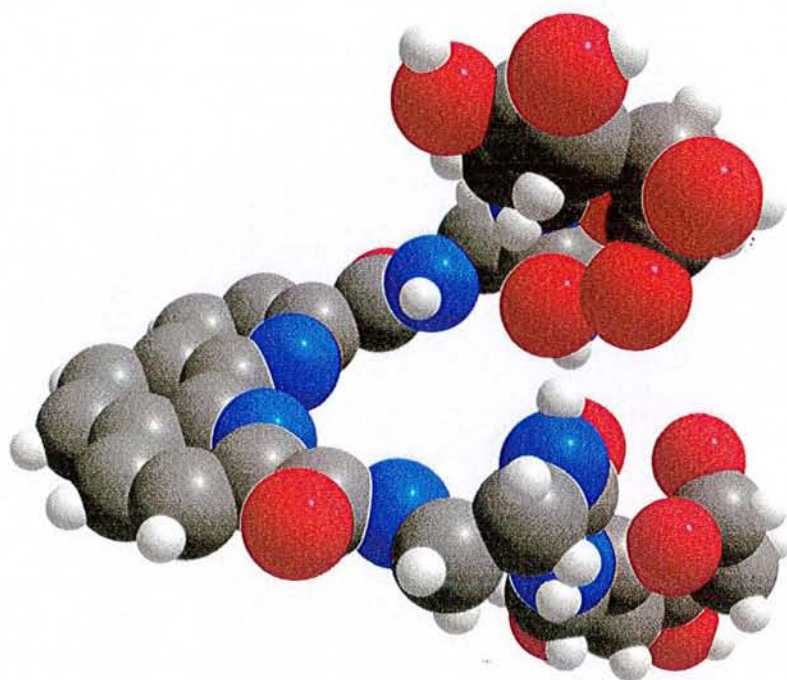
Tampon HEPES : $50 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (pH = 7,06)

La cinétique d'hydrolyse du BNPP est suivie par la mesure de l'absorbance à $\lambda=400\text{nm}$ du *p*-nitrophénol qui apparaît en fonction du temps. Nous nous sommes placés dans les conditions d'une cinétique de pseudo-1^{er} ordre c'est-à-dire en large excès de dimère 36 par rapport au substrat.

Les mesures d'absorbance ont été effectuées dans une cuve en quartz de 1 mL, le volume final de l'échantillon est de 0,925 mL. Les cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées à température ambiante. Des cinétiques témoin, en absence de 36, ont été réalisées dans les mêmes conditions. A titre de comparaison la cinétique d'hydrolyse du BNPP en présence du complexe de cuivre (II) de la phénanthroline diamine 2 a aussi été réalisée.



Modélisation Moléculaire MM3 (MAD-CHIMISTE[®]) de la phénanthroline
diamine **2**



Annexe

Liste des Figures

Figure	Intitulé	Page
1	Structure des α -, β - et γ -CDs	3
2	Structure de la β -CD à partir de calculs AM1 et par radiocristallographie	5
3	Différents complexes de CDs	6
4	Représentation générale de CDs polysulfonylés	13
5	Structure générale des CDs "chapeautées"	14
6	Différentes possibilités d'accrochage des substituants disulfonylés sur la β -CD	15
7	β -CD "chapeauté" par un anion	16
8	Schéma de synthèse d'une CD "pontée" par deux bras éthylène diamine	22
9	Schéma de synthèse d'une CD "pontée" par un bras éthylène diamine	22
10	Schéma de synthèse de la peramino- α -CD par la méthode indirecte	24
11	Schéma de synthèse de la peramino- α -CD par la méthode directe	26
12	Structure de la β -CD hydroxylamine 1 et isomères Z et E de la β -CD mono-oxime 2	30
13	Représentation schématique de la structure supposée du complexe	30
14	Schéma d'une CD substituée par un éther-couronne et de son complexe d'Europium (III)	31
15	Structure générale des CDs mono-halogénées	31
16	Mécanisme d'activation des alcools par formation d'un complexe type Vilsmeier-Haack	33
17	Mécanisme de la réaction de chloration	35
18	Synthèse d'une CD diiodée	36
19	Mécanisme de la réaction de Nace	36
20	Mécanisme de la réaction d'oxydation par le PDM	38
21	Structure générale d'une CD carboxylée	39
22	Représentation d'une molécule "sandwich"	39

23	Formation supposée d'un hétérodimère par interactions entre deux CDs portant des charges opposées	40
24	Représentation schématique de CDs anioniques	40
25	Schéma de la réaction de phosphorylation de SIEGEL	41
26	Structure générale des mercapto-CDs	42
27	Structure générale des CDs polytritylées	47
28	Structure générale des CDs portant une fonction carbamate ou carbonate	48
29	Schéma de synthèse général des carbonates de β -CD	50
30	Configurations possibles de l'époxyde	51
31	Réaction de tosylation en position 3	54
32	Schéma de synthèse des 2-O- mono tosyl-CDs	54
33	Schéma réactionnel de fonctionnalisation par les NTAs	57
34	Structure de la 3-déoxy-3-oxo- β -CD oxime (1) et de la 2-déoxy-2-hydroperoxy- β -CD (2)	57
35	Schéma de synthèse d'un dimère	58
36	Schéma de synthèse du tétramère de β -CD	59
37	Structure du complexe entre une porphyrine et le tétramère de CDs	60
38	Schéma de synthèse du mono <i>manno</i> -époxyde de la β -CD	61
39	Schéma de synthèse des CDs per époxyde	62
40	Synthèse de dimère de β -CDs lié par la face des hydroxyles secondaires	64
41	Structure d'une α -CD couplée à un éther-couronne bicyclique en position 2	65
42	Structures des principaux oligonucléotides modifiés	73
43	Exemple de lipide cationique	75
44	Exemple de conjugué oligonucléotide-acridine	76
45	Exemple de porphyrine fonctionnalisée et de son complexe de zinc (II)	76
46	Exemple de polyamine cationique	76
47	Inclusions possibles de la DDA dans l'hydroxypropyl- β -CD. A : forme neutre, B : forme protonée	77

48	Schéma de la sulfobutyléther β -CD et de la O ⁶ -benzylguanine	78
49	Représentation schématique du complexe hepta-amino- β -CD-5'-AMP	79
50	Influence des interactions électrostatiques entre le phosphate et la β -CD di- ou hepta-ammonium	81
51	Structure du complexe entre la diamino- β -CD et le ribose phosphate obtenu par modélisation moléculaire	82
52	Structure et mécanisme possible de l'hydrolyse	83
53	Structure des conjugués oligonucléotide-CD	85
54	Hérérodimère β -CD-adamantane-G23	86
55	Synthèse de la mono 6-O- α -D-glucopyranosyl- α -CD	88
56	Synthèse de Di-O- α -D-glucosyl- γ -CDs	90
57	Synthèse de 6-thioglucosyl- β -CDs	92
58	Synthèse de mono glycosyl-CDs	93
59	Synthèse de S-glucosyl-CDs	94
60	Synthèse de S-glucosyl-CDs	95
61	Synthèse de per-S-galactosyl- β -CDs	96
62	Synthèse de per-S-glucosyles- β -CDs	97
63	Synthèse de poly-S- β -glucosyles- β -CDs	98
64	Synthèse de galactopsyl- β -CD avec un bras hydrophobe aromatique	99
65	Synthèse de N-glycosyl- β -CD	101
66	Structure des monosaccharides utilisés dans la synthèse des N-glycosyl- β -CDs	102
67	Synthèse chimio-enzymatique de la mono-6-[Gal- β -1,4-glcNAc- β -(1,6')-hexyl]-amido-6-déoxy- β -CD	103
68	Synthèse de CDs bi-antennées	104
69	Principe d'une sonde fluorescente à base de CD	110
70	Structure de la molécule de pyrène	111
71	Différentes stoechiométries du complexe γ -CD-pyrène	112
72	Structure possible d'un complexe ternaire	113

73	Structures des pyrènes butyryl- γ -CDs	114
74	Dissociation du complexe 2:2 par addition d'une molécule "invitée"	114
75	Structure des CDs étudiées	115
76	Structure des énantiomères complexés par 1 et 2	116
77	Positions de substitution par le pyrène	117
78	Formes de complexes possibles par les CDs disubstituées	118
79	Structure du dimère	119
80	Structure de la β -CD modifiée par un résidu monensine	121
81	Modèle d'enzyme artificielle (chymotrypsine)	122
82	Structure du dérivé aromatique	123
83	Représentation schématique d'un système allosérique artificiel	123
84	Hydrolyse de l'ATP par les macrocycles polyaminés	125
85	Cycle catalytique de la synthèse de l'ATP	126
86	Structure de la TPEN	127
87	Structure d'un acide bishydroxamique	127
88	Structures de bis-résorcinol	128
89	Complexe dinucléaire de cuivre (II)	128
90	Structures des complexes	128
91	Structure du N,N,N',N'-tétrakis((2-pyridyl)méthyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane et de son complexe	129
92	Structures de la phénanthroline et de la néocuproïne	129
93	Réactions conduisant au clivage d'un dimère d'ADN	130
94	Représentation schématique du clivage des ribonucléotides par les CDs	130
95	Représentation schématique du clivage des ribonucléotides par les CDs	132
96	Structure possible du complexe α -CD-CMPc	133
97	Structure possible du complexe β -CD-UMPc	134
98	Clivage des liaisons phosphodiester par les β -CDs	135
99	Structure de la β -CD bis-imidazole	135

100	Ester cyclique de phosphate du 4- <i>tert</i> -butylcatéchol (substrat) et son monoester, produit de la réaction	136
101	Mécanisme d'action de la Ribonucléase A et de la CD bis-imidazole	136
102	Structure du complexe de zinc (II) d'une β -CD mono substituée par une diéthylène triamine	137
103	Mécanisme de la réaction de Mitsunobu	139
104	Mécanisme de formation des radicaux	140
105	Autre mécanisme possible de formation de 1	140
106	Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-S-thiophényl-cyclomaltoheptaose 27	142
107	Différents chromatogrammes obtenus	148
108	Différents isomères possibles pour une β -CD substituée en fonction du degré de substitution	150
109	Schéma de synthèse des 6-déoxy-6-thio-(2-mercaptobenzothiazolyl)-cyclomaltoheptaose 25 et 6 ^A ,6 ⁿ -didéoxy-6 ^A ,6 ⁿ -dithio-(2-mercapto-enzothiazolyl)-cyclomaltoheptaose 26	151
110	Complexe d'inclusion réactif possible de la réaction de Mitsunobu avec la β -CD	153
111	Schéma de synthèse de la 6 ^A ,6 ⁿ -didéoxy-6 ^A ,6 ⁿ -dithiobenzoyl-cyclomaltoheptaose 29	154
112	Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-thio-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)-cyclomaltoheptaose 30	157
113	Schéma de synthèse du 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose 4	158
114	Synthèse du composé 30	159
115	Intermédiaire réactionnel piégé dans la cavité de la β -CD	162
116	Synthèse de la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline 2	165
117	Schéma de synthèse du dimère 38	168
118	Schéma de synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 21	171
119	Essai de couplage de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 21 avec la 2,9-bis[(1-carboxamido)-2-aminoéthyl]-1,10-phénanthroline 2	173

120	Schéma de synthèse de la (2,3-di-O-méthyl-6-déoxy-6-thio-(2-mercaptobenzothiazolyl))hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 31	175
121	Essai de couplage de la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-cyclomaltoheptaose 21 avec le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose 4	178
122	Synthèse de l'heptakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthysilyl)-cyclomaltoheptaose 39	181
123	Essai de couplage par l'éthylène diamine	183
124	Schéma de synthèse des composés 41, 42, 43	186
125	Synthèse de la (2-déoxy-2-S-(2-mercaptobenzothiazolyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthysilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthysilyl)- β -CD 40	188
126	Schéma de synthèse du 1-(4-pyrène)-butanethiol 11	190
127	Schéma de synthèse du composé 44	191
128	Mécanisme de formation possible des époxydes	193
129	Essai de couplage avec une amine	195
130	Représentation schématique d'une endonucléase artificielle	196
131	Structure de la β -CD substituée par une acridine	197
132	Couplage de la 6-déoxy-6-amino-cyclomaltoheptaose avec l'acide 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique 7	197
133	Essai de couplage avec la 6-O-tosyl-cyclomaltoheptaose 12	198
134	Couplage avec la (2,3-Di-O-acétyl-6-O-tosyl)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 13 ou la (2,3-Di-O-acétyl-6-désoxy-6-iodo)-hexakis(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 14	199
135	Mécanisme de la réaction de Staudinger	200
136	Mécanisme de la réaction dite "phosphinimine" (anomère β)	201
137	Structure du dimère ponté par une butane diamine 35a	202
138	Schéma de synthèse des composés 33 et 34	205
139	Schéma de synthèse du dimère 36	207
140	Mécanisme supposé de la réaction avec les CDs	208
141	Schéma de synthèse du dimère 37	209
142	Schéma de synthèse des complexes métalliques de 36	211

143	Schéma de synthèse des complexes métalliques de 37	212
144	Schéma de synthèse de la synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(2-amino)éthylamino]-cyclomaltoheptaose 17	213
145	Schéma de synthèse de la 6-déoxy-6-[1-(6-amino)hexylamino]-cyclomaltoheptaose 18	214
146	Synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-bromo)-cyclomaltoheptaose 22	215
147	Mécanisme de la réaction de bromation	216
148	Schéma de synthèse de l'heptakis (6-déoxy-6-(1-(2-amino)-éthylamino))-cyclomaltoheptaose 23	216
149	Schéma de synthèse de la 6-S- β -D-galactopyranosyl-6-thio-cyclomaltpeptaose 16	218
150	Schéma de synthèse de l'heptakis(6-déoxy-6-S- β -D -galactopyranosyl)-6-thio-cyclomaltoheptaose 24	219
151	Spectre d'émission de fluorescence du kétoconazole	225
152	Spectre d'émission de fluorescence de l'itraconazole	225
153	Courbes de complexation de l'itraconazole et du kétoconazole	227
154	Courbe de complexation de l'hydrocortisone	228
155	Courbes de complexation du kétoconazole et de l'itraconazole	229
156	Courbe de complexation de l'hydrocortisone	230
157	Possibilités de complexation par un dimère de CDs	232
158	Structure du dimère utilisé	233
159	Cinétiques d'hydrolyse du BNPP en présence de cuivre (II)	235
160	Cinétiques d'hydrolyse du BNPP avec différents complexes métalliques du dimère 36	236
161	Courbe d'étalonnage UV-Vis. du <i>p</i> -nitrophénol	239
162	Mécanisme d'hydrolyse du complexe de lanthane d'un dimère de CDs	241
163	Mécanisme d'hydrolyse du complexe de cuivre d'un dimère de CDs	242
164	Spectre d'émission de la phénanthroline diamine 2 dans l'eau à $\lambda_{exc}=295nm$	243
165	Spectre d'émission du dimère 36 dans l'eau à $\lambda_{exc}=295nm$	243

166	Spectre d'émission du complexe de cuivre du dimère 36 dans l'eau à $\lambda_{exc}=295nm$	244
167	Spectre d'excitation de la diamine 2	244
168	Spectre d'excitation du dimère 36 à $\lambda_{em}=366nm$	245
169	Spectre d'excitation du complexe de cuivre (II) du dimère 36 à $\lambda_{em}=366nm$	245
170	Spectre d'émission de fluorescence du dimère 37 à $\lambda_{exc}=295nm$	246
171	Spectre d'émission de fluorescence du complexe de cuivre (II) du dimère 37 à $\lambda_{exc}=295nm$	246
172	Spectre d'excitation de fluorescence du dimère 37 à $\lambda_{em}=366nm$	246
173	Spectre d'excitation de fluorescence du complexe de cuivre du dimère 37 à $\lambda_{em}=366 nm$	247
174	Représentation schématique des interactions de spins en RMN	248
175	Positions possibles de l'unité galactose par rapport à la CD	248
176	Spectre RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42	250
177	Spectre RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) de la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42 (agrandissement entre 5,4 et 3,35ppm)	251
178	Corrélation COSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42	252
179	Corrélation COSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42 (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm)	253
180	Corrélation TOCSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42	255
181	Corrélation TOCSY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42 (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm)	256
182	Corrélation NOESY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> - butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42 (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm)	258

183	Corrélation ROESY pour la (2-déoxy-2-S-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -Dgalactopyranosyl)-6-O- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl))-Hexakis-(6-O- <i>tert</i> -butyldiméthyl-silyl)- β -CD 42 (agrandissement entre 5,3 et 3,3 ppm)	259
184	Représentation schématique, numérotation atomique et interactions dipolaires significatives entre les protons de l'unité thiogalactose et la cyclodextrine	260
185	Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère 36	263
186	Spectre 1D (500MHz, D ₂ O) de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36	264
187	Corrélations COSY (H-H) de la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36 (+ agrandissement)	265
188	Corrélation TOCSY pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36 (+ agrandissement)	266
189	Corrélation NOESY pour pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36 (+ agrandissement)	267
190	Corrélation ROESY pour pour la Bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis-(1-carboxamidoéthyl)-3-ureido]-1,10-phénanthroline 36	268
191	Représentation schématique et interactions dipolaires significatives entre les protons de la phénanthroline diamine et la cyclodextrine	269
191.1	Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère 37	270
191.2	Déplacements chimiques (δ) des protons du dimère 38	271
191.3	Spectre 1D (500MHz, DMSO- d_6) de la bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis (1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline 38	272
191.4	Corrélations COSY (H-H) de la bis cyclomaltoheptaosyl-6-[2,9-bis (1-carboxamidoéthyl)-3-amino]-1,10-phénanthroline 38	273
192	Spectre de la phénanthroline diamine 2 (400MHz, D ₂ O)	274
193	Spectre de du complexe de cuivre(II) de la phénanthroline diamine 2 (400MHz,D ₂ O)	275
194	Spectre de du complexe de Ruthénium (III) de la phénanthroline diamine 2 (400MHz, D ₂ O)	276
195	Spectre de du complexe de Cu (II) du dimère 36 (400MHz, D ₂ O)	277
196	Spectre de du complexe de Ruthénium(III) du dimère 36 (400MHz, D ₂ O)	278

Liste des Tableaux

Tableau	Intitulé	Page
1	Principales caractéristiques des CDs	4
2	Tosylation des cyclodextrines α , β et γ	9
3	Per tosylation et per mésylation des cyclodextrines α et β	12
4	Mono azidation et de mono amination des CDs	18
5	Mono alkyldiamination des CDs	20
6	Per azidation et per-amination des CDs	28
7	Per halogénéation des CDs	34
8	Mono oxydation des CDs	37
9	Déshydratation des CDs	43
10	Méthodes de réduction des CDs : Obtention des 6-déoxy-CDs	44
11	Méthodes de silylation des CDs	46
12	Pourcentages de chaque régioisomères en fonction des conditions de réaction	49
13	Tosylation des hydroxyles secondaires des CDs	53 et 55
14	Conditions des différentes monofonctionnalisations	64
15	Différents systèmes de transport des oligonucléotides	75
16	Structures des composés utilisés pour la formation des complexes "hôtes-invité"	80
17	Constantes et énergies libres de complexation	83
18	Synthèses de mono-S-glycosyles- β -CDs	91
19	Solubilité dans l'eau des CDs et CDs glycosylées	105
20	Inhibition de la floculation par les glycosyles-CDs	109
21	Constantes de complexation pour trois paires d'énantiomères	117
22	Structures et constantes de complexation des stéroïdes étudiés	120
23	Constantes de complexation de 1 avec et sans ion sodium	121
24	Quelques CDs modifiées et leur activité enzymatique potentielle	124

25	Sélectivité de clivage en 2' par les CDs des ribonucléotides cycliques	132
26	Sélectivité de clivage des polyribonucléotides par les CDs	133
27	Conditions de réaction utilisées pour la réaction de thio-Mitsunobu avec le thiophénol	143
28	Pourcentage relatif de chaque isomère en fonction des conditions de réaction	149
29	Conditions de réaction utilisées avec le 2-mercaptobenzothiazole	152
30	Conditions de la réaction de Mitsunobu réalisée avec l'acide thiobenzoïque et l'acide thiolacétique	155
31	Réaction de Mitsunobu réalisée avec le substituant 3-mercaptoprop-1-ène	156
32	Réaction de Mitsunobu réalisée avec les substituants 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose et 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-mannopyranose	160
33	Conditions de réaction utilisées pour le couplage de la β -CD à la diamine 2	167
34	Différentes conditions de réaction utilisées pour le couplage de 2 et 21	172
35	Conditions de réaction utilisées dans l'étude du couplage de 21 avec le 2-mercaptobenzothiazole	176
36	Essais de couplage entre la (2,3-di-O-méthyl-6-hydroxy)-hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl) cyclomaltoheptaose 21 et le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-galactopyranose 4	177
37	Cytotoxicité des dérivés de β -CDs	220
38	Constantes de vitesses des réactions d'hydrolyse du BNPP	238
39	Efficacité de l'hydrolyse du BNPP	239

Bibliographie

- [1] - NAGEL K.M., PHARM B.S., HOLSTAD S.G., PHARM D., ISENBERG K.E., *Pharmacotherapy*, **1993**, 13, 177-188.
- [2] - BYRN S.R., CARLSON D.V., CHEN J.K., CUSHMAN M.S., GOLDMAN M.E., MA W.P., PIDGEON C.L., RAY K.A., STOWELL J.G., WEITH H.L., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1991**, 6, 287-308.
- [3] - LEROY-LECHAT F., WOUESSIDJEW D., ANDREUX J-P., PUISIEUX F., DUCHENE D., *Int. J. Pharm.*, **1994**, 101, 97-103.
- [4] - CABRAL MARQUES H.M., *Rev. Port. Farm.*, **1994**, XLIV, 77-83.
- [5] - CROFT A.P., BARTSCH R.A., *Tetrahedron* , **1983**, 39, 1417-1474 et références citées à l'intérieur : LAUTSCH W., WIECHERT R., LEHMANN H., *Kolloid Z.*, **1954**, 135, 134; TABUSHI I., SHIMOKAWA K., SHIMIZU N., SHIRAKATA H., FUJITA K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 7855; MELTON L.D., SLESSOR K.N., *Carbohydr. Res.*, **1971**, 18, 29; CRAMER F., MACKENSEN G., SENSSE K., *Chem. Ber.*, **1969**, 102, 494; GIBSON A.R., MELTON L.D., SLESSOR K.N., *Can. J. Chem.*, **1974**, 52, 3905; HENNRICH N., CRAMER F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 1121;
- [6] - BAKÓ I., JICSINSZKY L., *J. Incl. Phenom.*, **1994**, 18, 275-289.
- [7] - LICHTENTHALER F.W., IMMEL S., *Int. Sugar J.*, **1995**, 97, 13-22.
- [8] - SAENGER W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, 19, 344-362.
- [9] - LEHN J-M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89-112.
- [10] - UEKAMA K., HIRAYAMA F., IRIE T., *Drug Targeting Delivery*, **1994**, 3, 411-456.
- [11] - SZEJTLI J., *Med. Res. Rev.*, **1994**, 14, 353-386.
- [12] - WEINSHENKER N.M., **1991**, US. Pat. Cl. 514-58. CA : **1992**, 116, 113525 g.
- [13] - PETTER R.C., SALEK J.S., SIKORSKI C.T., KUMARAVEL G., LIN F-T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 3860-3868.
- [14] - ZARZYCKI R., HOEHN P., DUONG B., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 663-668.
- [15] - GAO X-M., TONG L-H., INOUE Y., TAI A., *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 703-710.

- [16] - SEBILLE B., *Cyclodextrins and their industrial uses*, (Ed. DUCHENE D.), Editions de Santé, Paris, **1987**, Chap. 9, p. 351.
- [17] - MATSUI Y., YOKOI T., MOCHIDA K., *Chem. Lett.*, **1976**, 1037-1040.
- [18] - LANCELON-PIN C., *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, Grenoble I, **1992**.
- [19] - EKBERG B., ANDERSSON L.I., MOSBACH K., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 111-117.
- [20] - HAMASAKI K., IKEDA H., NAKAMURA A., UENO A., TODA F., SUZUKI I., OSA T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5035-5040.
- [21] - TAMAGAKI S., TAKAHASHI M., KANAMORI J., TAGAKI W., *Supramol. Chem.*, **1994**, 4, 159-164.
- [22] - DEFAYE J., GADELLE A., GUILLER A., DARCY R., O'SULLIVAN T., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 251-258.
- [23] - TAKAHASHI K., HATTORI K., TODA F., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3331-3334.
- [24] - TANAKA M., KAWAGUCHI Y., NIINAE T., SHONO T., *J. Chromatogr.*, **1984**, 314, 193-200.
- [25] - COTTAZ S., DRIGUEZ H., *Synthesis*, **1989**, 755-758.
- [26] - YAMAMURA H., FUJITA K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 2505-2508.
- [27] - BOGER J., CORCORAN R.J., LEHN J-M., *Helv. Chim. Acta*, **1978**, 61, 2191-2218.
- [28] - TAKEO K., UEMURA K., MITOH H., *J. Carbohydr. Chem.*, **1988**, 7, 293-308.
- [29] - FUJITA K., YAMAMURA H., MATSUNAGA A., IMOTO T., MIHASHI K., FUJIOKA T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 4509-4513.
- [30] - FUJITA K., MATSUNAGA A., YAMAMURA H., IMOTO T., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4520-4522.
- [31] - FUJITA K., YAMAMURA H., IMOTO T., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 6737-6740.
- [32] - FUJITA K., TAHARA T., EGASHIRA Y., IMOTO T., KOGA T., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 5385-5388.

- [33] - FUJITA K., YAMAMURA H., EGASHIRA Y., IMOTO T., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3511-3514.
- [34] - FUJITA K., TAHARA T., OHTA K., NOGAMI Y., KOGA T., YAMAGUCHI M., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3643-3647.
- [35] - KURODA Y., YAMADA M., TABUSHI I., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1989**, 1409-1415.
- [36] - BRESLOW R., CANARY J.W., VARNEY M., WADDELL S.T., YANG D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5212-5219.
- [37] - TABUSHI I., NABESHIMA T., IKEJI T., SHINKAI H., YAMAMURA K., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7017-7020.
- [38] - HAMADA F., FUKUSHIMA M., OSA T., IKEDA H., TODA F., UENO A., *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **1993**, 14, 287-291.
- [39] - HAMADA F., ISHIKAWA K., ITO R., SHIBUYA H., HAMAI S., SUZUKI I., OSA T., UENO A., *J. Incl. Phenom.*, **1995**, 20, 43-51.
- [40] - JICSINSZKY L., *J. Incl. Phenom.*, **1994**, 18, 247-254.
- [41] - PARROT-LOPEZ H., DJEDAÏNI F., PERLY B., COLEMAN A.W., GALONS H., MIOCQUE M., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 1999-2002.
- [42] - BEESON J.C., CZARNIK A.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **1994**, 2, 297-303.
- [43] - GALONS H., PARROT-LOPEZ H., DUPAS S., PERLY B., COLEMAN A.W., TSOUCARIS G., MIOCQUE M., *5th International Symposium on cyclodextrins*, Paris, **1990**, 134-137.
- [44] - BONOMO R.P., CUCINOTTA V., D'ALLESSANDRO F., IMPELLIZZERI G., MACCARRONE G., RIZZARELLI E., *J. Incl. Phenom.*, **1993**, 15, 167-180.
- [45] - BROWN S.E., COATES J.H., EASTON C.J., VAN EYK S.J., LINCOLN S.F., MAY B.L., STILE M.A., WHALLAND C.B., WILLIAMS M.L., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 47.
- [46] - TABUSHI I., KURODA Y., SHIMOKAWA K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1614-1615.
- [47] - LIU J., DAVIDSON R.S., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 241-244.

- [48] - HANESSIAN S., **1995**, Can. Pat. Appl. CA 2,100,820. CA : **1995**, 123, 231854 f.
- [49] - SZURMAI Z., LIPTÁK A., SZEJTLI J., *Starch/Stärke*, **1990**, 42, 447-449.
- [50] - PARROT-LOPEZ H., LING C-C., ZHANG P., BASZKIN A., ALBRECHT G., DE RANGO C., COLEMAN A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 5479-5480.
- [51] - GUILLO F., HAMELIN B., JULLIEN L., CANCEILL J., LEHN J-M., DE ROBERTIS L., DRIGUEZ H., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1995**, 132, 857-866.
- [52] - TABUSHI I., SHIMOKAWA K., FUJITA K., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 18, 1527-1530.
- [53] - YI G., BRADSHAW J.S., ROSSITER B.E., REESE S.L., PETERSSON P., MARKIDES K.E., LEE M.L., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2561-2565.
- [54] - YALPANI M., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 80-85.
- [55] - FIKES L.E., WINN D.T., SWEGER R.W., JOHNSON M.P., CZARNIK A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1493-1495.
- [56] - MARTIN K.A., MORTELLARO M.A., SWEGER R.W., FIKES L.E., WINN D.T., CLARY S., JOHNSON M.P., CZARNIK A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10443-10448.
- [57] - YOON J., HONG S., MARTIN K.A., CZARNIK A.W., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2792-2795.
- [58] - HADJLOUDIS E., KONDILIS P., MAVRIDIS I., TSOUCARIS G., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 119-123.
- [59] - KONDILIS P., HADJLOUDIS E., *5th International Symposium on cyclodextrins*, Paris, **1990**, 254-257.
- [60] - WILLNER I., GOREN Z., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1983**, 1469-1470.
- [61] - PIKRAMENOU Z., JOHNSON K.M., NOCERA D.G., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 3531-3534.

- [62] - PIKRAMENOU Z., NOCERA D.G., *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 532-536.
- [63] - TAMAGAKI S., KATAYAMA A., MAEDA M., YAMAMOTO N., TAGAKI W., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1994**, 507-511.
- [64] - TAKEO K., SUMIMOTO T., KUGE T., *Stärke*, **1974**, 26, 111-118.
- [65] - GADELLE A., DEFAYE J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 78-80.
- [66] - BAER H.H., VARGAS BERENGUEL A., SHU Y.Y., DEFAYE J., GADELLE A., SANTOYO GONZÁLEZ F., *Carbohydr. Res.*, **1992**, 228, 307-314.
- [67] - ASHTON P.R., BOYD S.E., GATTUSO G., HARTWELL E.Y., KÖNIGER R., SPENCER N., STODDART J.F., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 3898-3903.
- [68] - BERBERAN-SANTOS M.N., CANCEILL J., BROCHON J-C., JULLIEN L., LEHN J-M., POUGET J., TAUC P., VALEUR B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6427-6436.
- [69] - ICHELN D., RUNGE T., GEHRCKE B., KÖNIG W.A., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 616-621.
- [70] - KHAN A.R., D'SOUZA V.T., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 7492-7495.
- [71] - MARTIN K.A., CZARNIK A.W., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 6781-6782.
- [72] - PFITZNER K.E., MOFFATT J.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 5661-5670.
- [73] - HUFF J.B., BIENIARZ C., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 7511-7516.
- [74] - CORNWELL M.J., HUFF J.B., BIENIARZ C., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8371-8374.
- [75] - FLOOR M., PETERS J.A., VAN BEKKUM H., KIEBOOM A.P.G., KOEK J.H., SMEETS F.L.M., NIEMANTSVERDRIET R.E., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 203, 19-32.
- [76] - KURODA Y., KOBAYASHI O., SUZUKI Y., OGOSHI H., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 7225-7228.
- [77] - KURODA Y., EGAWA Y., SESHIMO H., OGOSHI H., *Chem. Lett.*, **1994**, 2361-2364.
- [78] - AKIIKE T., NAGANO Y., YAMAMOTO Y., NAKAMURA A., IKEDA H., UENO A., TODA F., *Chem. Lett.*, **1994**, 1089-1092.

- [79] - HAMELIN B., JULLIEN L., GUILLO F., LEHN J-M., JARDY A., DE ROBERTIS L., DRIGUEZ H., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 17877-17885.
- [80] - WANG Y., UENO A., TODA F., *Chem. Lett.*, **1994**, 167-170.
- [81] - PITHA J., MALLIS L.M., LAMB D.J., IRIE T., UEKAMA K., *Pharm. Res.*, **1991**, 8, 1151-1154.
- [82] - MORIYA T., KURITA H., MATSUMOTO K., OTAKE T., MORI H., MORIMOTO M., UEBA N., KUNITA N., *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2301-2304.
- [83] - MORIYA T., SAITO K., KURITA H., MATSUMOTO K., OTAKE T., MORI H., MORIMOTO M., UEBA N., KUNITA N., *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1674-1677.
- [84] - OTAKE T., SCHOLS D., WITVROUW M., NAESSENS L., NAKASHIMA H., MORIYA T., KURITA H., MATSUMOTO K., UEBA N., DE CLERCQ E., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1994**, 5, 155-161.
- [85] - WITVROUW M., DESMYTER J., DE CLERCQ E., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1994**, 5, 345-359.
- [86] - HIRONORI K., **1991**, Eur. Pat. EP 447, 171. CA : **1992**, 116, 174676 d.
- [87] - TEICHER B.A., SOTOMAYOR E.A., HUANG Z.D., ARA G., HOLDEN S., KHANDEKAR V., CHEN Y-N., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1993**, 33, 229-238.
- [88] - TAIT R.J., SKANCHY D.J., THOMPSON D.P., CHETWYN N.C., DUNSHEE D.A., RAJEWSKI R.A., STELLA V.J., STODDART J-F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1992**, 10, 615-622.
- [89] - ASHTON P.R., ELLWOOD P., STATON I., STODDART J.F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 80-81.
- [90] - YAMAMURA H., NOGAOKA H., KAWAI M., BUTSUGAN Y., FUJITA K., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1093-1094.
- [91] - LIGHT J., BRESLOW R., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 2957-2958.
- [92] - FUGEDI P., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 366-369.
- [93] - ZHANG P., LING C-C., COLEMAN A.W., PARROT-LOPEZ H., GALONS H., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 2769-2770.

- [94] - COLEMAN A.W., ZHANG P., LING C-C., PARROT-LOPEZ H., GALONS H., *Carbohydr. Res.* **1992**, 224, 307-309.
- [95] - TANIMOTO T., SAKAKI T., KOIZUMI K., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 267, 27-37.
- [96] - KHAN A.R., BARTON L., D'SOUZA V.T., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**, 1112-1114.
- [97] - VAN DIENST E., SNELLINK B.H.M., VON PIEKARTZ I., GROTE GANSEY M.H.B., VENEMA F., FEITERS M.C., NOLTE R.J.M., ENGBERSEN J.F.J., REINHOUDT D.N., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 6537-6545.
- [98] - ZHANG P., COLEMAN A.W., *Supramol. Chem.*, **1993**, 2, 255-263.
- [99] - PREGEL M.J., BUNCCEL E., *Can. J. Chem.*, **1991**, 69, 130-137.
- [100] - WENZ G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 803-822.
- [101] - MURAKAMI T., HARADA K., MORIMOTO S., TSUDA K., **1986**, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,266,401. CA : **1987**, 106, 1738383 x.
- [102] - BOGER J., BRENNER D.G., KNOWLES J.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 7630-7631.
- [103] - TANIMOTO T., TANAKA M., YUNO T., KOIZUMI K., *Carbohydr. Res.* **1992**, 223, 1-10.
- [103a] - LING C-C., COLEMAN A.W., MIOCQUE M., *Carbohydr. Res.*, **1992**, 223, 287-291.
- [104] - TAKEICHI T., SHIMURA S., TORIYAMA H., TAKAYAMA Y., MORIKAWA M., *Chem. Lett.*, **1992**, 1069-1072.
- [105] - GAHM K.H., YOSHIDA W., NIEMCZURA W.P., STALCUP A.M., *Carbohydr. Res.* , **1993**, 248, 119-128.
- [106] - TROTTA F., MARZONA M., MORAGLIO G., MARITANO S., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 92-95.
- [107] - UENO A., BRESLOW R., *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 3451-3454.
- [108] - FUJITA K., NAGAMURA S., IMOTO T., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 5673-5676.

- [109] - MURAKAMI T., HARATA K., MORIMOTO S., *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 321-324.
- [110] - RONG D., D'SOUZA V.T., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 4275-4278.
- [111] - IKEDA H., NAGANO Y., DU Y-Q., IKEDA T., TODA F., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5045-5048.
- [112] - BRESLOW R., CZARNIK A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 1390-1391.
- [113] - JIANG T., SUKUMARAN D.K., SONI S-D., LAWRENCE D.S., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 5149-5155.
- [114] - RONG D., YE H., BOEHLOW T.R., D'SOUZA V.T., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 163-167.
- [115] - IKEDA T., IKEDA H., TO Y-C., NAGANO Y., YOON C-J., TODA F., *5th International Symposium on cyclodextrins*, Paris, **1990**, 700-707.
- [116] - FUJITA K., TAHARA T., YAMAMURA H., IMOTO T., KOGA T., FUJIOKA T., MIHASHI K., *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 877-880.
- [117] - PALMER D.R.J., BUNCCEL E., THATCHER G.R.J., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 86-91.
- [118] - BRESLOW R., GREENSPOON N., GUO T., ZARZYCKI R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8296-8297.
- [119] - OKABE Y., YAMAMURA H., OBE K-I., OHTA K., KAWAI M., FUJITA K., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 581-582.
- [120] - JIANG T., LI M., LAWRENCE D.S., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 7293-7297.
- [121] - JIANG T., LAWRENCE D.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1857-1858.
- [122] - KHAN A.R., TONG W., D'SOUZA V.T., *Supramol. Chem.*, **1995**, 4, 243-246.
- [123] - COLEMAN A.W., ZHANG P., LING C-C., MAHUTEAU J., PARROT-LOPEZ H., MIOCQUE M., *Supramol. Chem.*, **1992**, 1, 11-14.
- [124] - VENEMA F., BASELIER C.M., VAN DIENST E., RUËL B.H.M., FEITERS M.C., ENGBERSEN J.F.J., REINHOUDT D.N., NOLTE R.J.M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 1773-1776.
- [125] - VENEMA F., BASELIER C.M., FEITERS M.C., NOLTE R.J.M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 8661-8664.

- [126] - STODDART J.F., ZARZYCKI R., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 197-203.
- [127] - TIAN S., D'SOUZA V.T., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 9339-9342.
- [128] - SZEJTLI J., LIPTÁK A., JODÁL I., FÜGEDI P., NÁNÁSI P., NESZMELYI A., *Starch/Stärke*, **1980**, *32*, 165-169.
- [129] - IRIE T., FUKUNAGA K., PITHA J., UEKAMA K., FALES H.M., SOKOLOWSKI E.A., *Carbohydr. Res.*, **1989**, *192*, 167-172.
- [130] - BAKÓ P., FENICHEL L., TÖKE L., SZENTE L., SZEJTLI J., *J. Incl. Phenom.*, **1994**, *18*, 307-314.
- [131] - COLEMAN A.W., TSOUCARIS G., GALONS H., PARROT H., MIOCQUE M., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 151-155.
- [132] - VON DER BEY E., GOTTLIEB M., WENZ G., *5th International Symposium on cyclodextrins*, Paris, **1990**, 82-85.
- [133] - JICSINSZKY L., SZEJTLI J., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 96-100.
- [134] - ANGIBEAUD P., UTILLE J-P., *Synthesis*, **1991**, 737-738.
- [135] - STEIN C.A., CHENG Y.C., *Science*, **1993**, *261*, 1004-1012.
- [136] - ROJANASAKUL Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, *18*, 115-131.
- [137] - AGRAWAL S., SARIN P.S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1991**, *6*, 251-270.
- [138] - SCHREIER H., *Pharm. Acta Helv.*, **1994**, *68*, 145-159.
- [139] - WAGNER R.W., *Nature*, **1994**, *372*, 333-335.
- [140] - KIM S., *Drugs*, **1993**, *46*, 618-638.
- [141] - HUANG L., KLIBANOV A.L., MORI A., GAO X., *J. Liposome Res.*, **1993**, *3*, 505-515.
- [142] - BENNETT C.F., CHIANG M.Y., CHAN H., GRIMM S., *CA* : **1993**, *119*, 15168 k.
- [142a] - MONSIGNY M., ROCHE A-C., MIDOUX P., MAYER R., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1994**, *14*, 1-24.

- [143] - CHAVANY C., LE DOAN T., COUVREUR P., PUISIEUX F., HELENE C., *Pharm. Res.*, **1992**, 9, 441-449.
- [144] - ASSELINE U., HAU J-F., CZERNECKI S., LE DIGUARHER T., PERLAT M-C., VALERY J-M., THUONG N.T., *Nucleic Acids Res.*, **1991**, 19, 4067-4074.
- [145] - KURODA Y., HATAKEYAMA H., SESHIMO H., OGOSHI H., *Supramol. Chem.*, **1994**, 3, 267-271.
- [146] - SESSLER J.L., FURUTA H., KRÁL V., *Supramol. Chem.*, **1993**, 1, 209-220.
- [147] - LI T., KRASNE S.J., PERSSON B., KABACK H.R., DIEDERICH F., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 380-384.
- [148] - TEULADE-FICHO M-P., VIGNERON J-P., LEHN J-M., *Supramol. Chem.*, **1995**, 5, 139-147.
- [149] - HOFFMAN J.L., BOCK R.M., *Biochemistry*, **1970**, 9, 3542-3550.
- [150] - DARRINGTON R.T., XIANG T.X., ANDERSON B.D., *Int. J. Pharm.*, **1990**, 59, 35-44.
- [151] - XIANG T.X., ANDERSON B.D., *Int. J. Pharm.*, **1990**, 59, 45-55.
- [152] - GORECKA B.A., SANZGIRI Y.D., BINDRA D.S., STELLA V.J., *Int. J. Pharm.*, **1995**, 125, 55-61.
- [153] - YATSIMIRSKY A.K., ELISEEV A.V., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1991**, 1769-1772.
- [154] - BOGER J., BRENNER D.G., KNOWLES J.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 7631-7633.
- [155] - ELISEEV A.V., SCHNEIDER H.J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 1331-1333.
- [156] - ELISEEV A.V., SCHNEIDER H.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6081-6088.
- [157] - KÖVÁRI E., HEITKER J., KRÄMER R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1205-1206.
- [158] - ZHAO Q., TEMSAMANI J., AGRAWAL S., *Antisense Res. Dev.*, **1995**, 5, 185-192.

- [159] - HABUS I., ZHAO Q., AGRAWAL S., *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 327-331.
- [160] - UENO M., MURAKAMI A., MAKINO K., MORII T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 12575-12576.
- [161] - DIVAKAR S., RAMASARMA P.R., MAHESWARAN M.M., *Indian J. Biochem. Biophys.*, **1991**, 28, 247-251.
- [162] - HASHIMOTO H., *New trends in cyclodextrins and derivatives*, (Ed. DUCHÊNE D.), Editions de Santé, Paris, **1991**, Chap. 3, p. 99.
- [162a] - FÜGEDI P., NANASI P., SZEJTLI J., *Carbohydr. Res.*, **1988**, 175, 173-181.
- [163] - DE ROBERTIS L., *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, Grenoble I, **1995**.
- [164] - LANCELON-PIN C., DRIGUEZ H., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3125-3128.
- [165] - O'SULLIVAN T., DARCY R., MAGESWARAN S., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 125-128.
- [166] - LAINE V., COSTE-SARGUET A., GADELLE A., DEFAYE J., PERLY B., DJEDAÏNI-PILLARD F., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1995**, 1479-1487.
- [167] - O'SULLIVAN T., DARCY R., GEORGANTA G., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 129-132.
- [168] - PARROT-LOPEZ H., GALONS H., COLEMAN A.W., MAHUTEAU J., MIOCQUE M., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 209-212.
- [169] - PARROT-LOPEZ H., LERAY E., COLEMAN A.W., *Supramol. Chem.*, **1993**, 3, 37-42.
- [170] - LERAY E., PARROT-LOPEZ H., AUGÉ C., COLEMAN A.W., FINANCE C., BONALY R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1019-1020.
- [171] - KOIZUMI K., OKADA Y., KUBOTA Y., UTAMURA T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 3413-3418.
- [172] - YAMAMOTO M., YOSHIDA A., HIRAYAMA F., UEKAMA K., *Int. J. Pharm.*, **1989**, 49, 163-171.

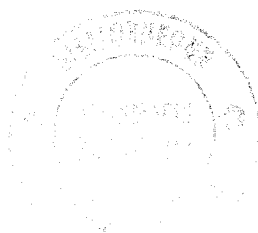
- [173] - UEKAMA K., YAMAMOTO M., IRIE T., HIRAYAMA F., *6th International Symposium on cyclodextrins*, Chicago, **1992**, 491-496.
- [174] - ATTIOUI F., *Thèse de l'Université Henri Poincaré*, Nancy 1, **1995**.
- [175] - LERAY E., LEROY-LECHAT F., PARROT-LOPEZ H., DUCHENE D., *Supramol. Chem.*, **1995**, *5*, 149-151.
- [176] - ATTIOUI F., AL-OMAR A., LERAY E., PARROT-LOPEZ H., FINANCE C., BONALY R., *Biol. Cell.*, **1994**, *82*, 161-167.
- [177] - ROCHE A C, *Mécanismes de reconnaissance moléculaire*, (Ed. M. DELAAGE) Editions INSERM, Paris, **1989**, *VOL 181*, *Chap 10*, p 219-273.
- [178] - SEYMOUR L.W., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1994**, *14*, 89-111.
- [179] - JONES M.N., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1994**, *13*, 215-250.
- [180] - DE ROBERTIS L., LANCELON-PIN C., DRIGUEZ H., ATTIOUI F., BONALY R., MARSURA A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 1127-1130.
- [181] - XIE R.Q., LIU Y.C., LEI X.G., *Res. Chem. Intermed.*, **1991**, *16*, 71-95.
- [182] - UENO A., *Fluorescent chemosensors for ion and molecule recognition*, (Ed. CZARNICK A.W.), ACS Symposium, **1993**, *Chap. 6*, 122-132.
- [183] - NELSON G., WARNER I.M., *Carbohydr. Res.*, **1989**, *192*, 305-312.
- [184] - UENO A., SUZUKI I., OSA T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6391-6397.
- [185] - SUZUKI I., SAKURAI Y., OHKUBO M., UENO A., OSA T., *Chem. Lett.*, **1992**, 2005-2008.
- [186] - SUZUKI I., OHKUBO M., UENO A., OSA T., *Chem. Lett.*, **1992**, 269-272.
- [187] - WANG Y., IKEDA T., UENO A., TODA F., *Chem. Lett.*, **1992**, 863-866.
- [188] - WANG Y., IKEDA T., IKEDA H., UENO A., TODA J., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1994**, *67*, 1598-1607.
- [189] - HAMADA F., KONDO Y., ITO R., SUZUKI I., OSA T., UENO A., *J. Incl. Phenom.*, **1993**, *15*, 273-279.
- [190] - NAKAMURA M., IKEDA T., NAKAMURA A., IKEDA H., UENO A., TODA F., *Chem. Lett.*, **1995**, 343-344.
- [191] - BRESLOW R., HALFON S., ZHANG B., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 377-388.

- [192] - NAKAMURA M., IKEDA A., ISE N., IKEDA T., IKEDA H., TODA F., UENO A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 721-722.
- [193] - D'SOUZA V.T., *Bioorg. Chem. Enzym. Catal.*, (Eds D'SOUZA V.T., FEDER J.), CRC Press, **1992**, Chap. 3, 27-39.
- [194] - LAWRENCE D.S., JIANG T., LEVETT M., *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2229-2260.
- [195] - REICHWEIN A.M., VERBOOM W., REINHOUDT D.N., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1994**, 113, 343-349.
- [196] - BRESLOW R., *Supramol. Chem.* **1993**, 1, 111-118.
- [197] - BRESLOW R., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1994**, 113, 493-498.
- [198] - BRESLOW R., *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 28, 146-153.
- [199] - SCHNEIDER H.J., RUF D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 1159-1160.
- [200] - TAGAKI W., YANO K., YAMANAKA K., YAMAMOTO H., MIYASAKA T., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3897-3900.
- [201] - ROSENTHAL M.I., CZARNIK A.W., *J. Incl. Phenom.*, **1991**, 10, 119-126.
- [202] - RAMA RAO K., SRINIVASAN T.N., BHANUMATHI N., SATTUR P.B., *J. Chem. soc. Chem. Commun.*, **1990**, 10-11.
- [203] - KOJIN R., TO Y-C., IKEDA H., YOON C-J., IJIMA M., IKEDA T., TODA F., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 509-512.
- [204] - ZOH K.D., LEE S.H., SUH J., *Bioorg. Chem.*, **1994**, 22, 242-252.
- [205] - DESPER J.M., BRESLOW R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 12081-12082.
- [206] - YE H., TONG W., D'SOUZA V.T., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1994**, 2431-2437.
- [207] - MARZONA M., GIRAUDI G., *Advances in Inclusion Science*, (Eds. HUBER O., SZEJTLI J.), Proceeding of the fourth International Symposium on cyclodextrins. Kluwer Academic Publishers, Munich, **1988**, 513-517.
- [208] - BRESLOW R., CHUNG S., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 4353-5356.
- [209] - ZIMMERMAN S.C., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 4357-4358.

- [210] - PALMER D.R.J., BUNCEL E., THATCHER G.R.J., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 5286-5291.
- [211] - HOSSEINI M.W., *2nd International Summer School on Supramolecular Chemistry*, Strasbourg, Septembre **1992**.
- [212] - MORROW J.R., SHELTON V.M., *New J. Chem.*, **1994**, 18, 371-375.
- [213] - YASHIRO M., ISHIKUBO A., TAKARADA T., KOMIYAMA M., *Chem. Lett.*, **1995**, 665-666.
- [214] - TAKEDA N., IRISAWA M., KOMIYAMA M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 2773-2774.
- [215] - BRESLOW R., ZHANG B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7893-7894.
- [216] - HASHIMOTO S., YAMASHITA R., NAKAMURA Y., *Chem. Lett.*, **1992**, 1639-1642.
- [217] - MOTOMURA T., ARAKI K., KOBAYASHI K., TOI H., AOYAMA Y., *Chem. Lett.*, **1992**, 963-966.
- [218] - YOUNG M.J., CHIN J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10577-10578.
- [219] - LINKLETTER B., CHIN J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 472-474.
- [220] - YASHIRO M., ISHIKUBO A., KOMIYAMA M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1793-1794.
- [221] - SIGMAN D.S., MAZUMDER A., PERRIN D.M., *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295-2316.
- [222] - PRATVIEL G., BERNADOU J., MEUNIER B., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 746-769.
- [223] - MONTENAY-GARESTIERT T., HELENE C., THUONG N.T., *Host-guest molecular interactions : from chemistry to biology CIBA Foundation Symposium 158*, (Eds CHAOWICK D.J., WIDDOWS K.), JOHN WILEY, **1991**, 147-157.
- [224] - KOMIYAMA M., *Bioorg. Chem. Enzym. Catal.*, (Eds D'SOUZA V.T., FEDER J.), CRC Press, **1992**, Chap. 7, 91-100.
- [225] - KOMIYAMA M., SAWATA S., TAKESHIGE Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1070-1074.

- [226] - HENGGE A.C., CHELAND W.W., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 1972-1974.
- [227] - BRESLOW R., ANSLYN E., HUANG D.L., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 2365-2376.
- [228] - MATSUMOTO Y., KOMIYAMA M., *J. Mol. Catal.*, **1990**, 61, 129-136.
- [229] - MITSUNOBU O., *Synthesis*, **1981**, 1-28.
- [230] - CAMP D., HANSON G.R., JENKINS I.D., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2977-2980.
- [231] - BESSON T., AL NEIRABEYEH M., VIAUD M.C., ROLLIN P., *Synth. Commun.*, **1990**, 20, 1631-1639.
- [232] - DANCY I., LAUPICHLER L., ROLLIN P., THIEM J., *Synlett*, **1992**, 283-284.
- [233] - DANCY I., LAUPICHLER L., ROLLIN P., THIEM J., *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 343-350.
- [233a] - SALLAS F., LEROY P., MARSURA A., NICOLAS A., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 6079-6082.
- [234] - YE H., TONG W., D'SOUZA V.T., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 6271-6274.
- [235] - WANG G., BERGSTROM D.E., *Synlett*, **1992**, 422-424.
- [236] - CHANDLER C.J., DEADY L.W., REISS J.A., *J. Heterocyclic Chem.*, **1981**, 18, 599-601.
- [237] - IKEDA T., YOSHIDA K., SCHNEIDER H.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1453-1454.
- [238] - MESZÁROS P., PINTÉR I., KOVÁCS J., TÓTH G., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 258, 287-291.
- [239] - PINTER I., KOVÁCS J., TÓTH G., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 273, 99-108.
- [240] - KOVÁCS J., PINTER I., MESSMER A., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 141, 99-65.
- [241] - FRIANT-MICHEL P., MARSURA A., KOVÁCS J., PINTER I., RIVAIL J-L., *Theochem.*, **1996**, sous presse.
- [242] - FRIANT-MICHEL P., MARSURA A., PINTER I., RIVAIL J-L., Résultats non publiés

- [242a] - SALLAS F., KOVÁCS J., PINTER I., JICSINSZKY L., MARSURA A., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4011-4014.
- [243] - AL-OMAR A., ATTIOUI F., SALLAS F., DE ROBERTIS L., DRIGUEZ H., PARROT-LOPEZ H., FINANCE C., BONALY R., Mini Colloque INSERM : "Glycoconjugués en Biologie et Santé", Lille, 7-8-9 Décembre 1994.
- [244] - CONREUX A., *D.E.A. de l'Université Henri Poincaré*, Nancy 1, **1995**.
- [245] - PEDERSEN M., EDELSTEN M., NIELSEN V.F., SCARPELLINI A., SKYTTE S., SLOT C., *Int.J. Pharm.*, **1993**, 90, 247-254.
- [246] - HOSTETLER J.S., HANSON L.H., STEVENS D.A., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1992**, 36, 477-480.
- [247] - BRESLOW R., ZHANG B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 5882-5883.
- [248] - KRATI N., BREMBILLA A., LOCHON P., *J. Mol. Catal.*, **1994**, 94, 263-279.
- [249] - TAKASAKI B.K., CHIN J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 8582-8585.
- [250] - DESCHENAUX R., RUCH T., DESCHENAUX P-F. *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 619-628.



Nom, Prénom : S A L L A S Florence

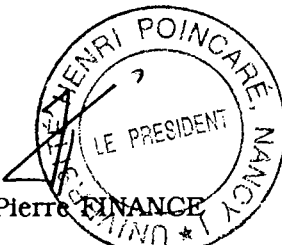
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 11.07.96 n° 49

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1


Jean Pierre FINANCE

Le travail effectué s'inscrit dans une thématique d'élaboration de systèmes de transport et de ciblage des actifs médicamenteux classiques et des oligonucléotides antisens dans la cellule. Cette thématique comprend aussi la conception de modèles d'enzymes artificielles susceptibles de cliver l'ADN. Les applications potentielles et les implications de tels systèmes dans des domaines comme les thérapies anti-virales et anticancéreuses sont particulièrement importantes. Dans cette optique, ce travail décrit, dans une première partie, l'étude méthodologique de la réaction de thio-Mitsunobu appliquée aux CDs comme nouvelle voie de monofonctionnalisation directe des faces des hydroxyles primaires et secondaires des CDs par les thiols. Cette méthode a permis l'obtention de différents dérivés substitués par des unités galactosyles ou des thiols aromatiques dont les aptitudes à la reconnaissance moléculaire ont été évaluées. Par ailleurs, une CD substituée par un fluorophore a ainsi été préparée et constitue potentiellement un outil de choix comme traceur d'événements en milieu biologique.

Dans un deuxième temps, plusieurs amino-CDs ont été préparées en tant que transporteurs d'oligonucléotides antisens, leur cytotoxicité et leur capacité de complexation ont été évaluées.

Enfin, des dimères de β -CDs ont été synthétisés et leurs complexes métalliques préparés comme modèles de nucléases artificielles. L'efficacité des complexes métalliques à catalyser le clivage de liaisons phosphodiester d'un composé synthétique a été quantifiée, elle a été qualifiée avec un ADN. Les propriétés des dimères à solubiliser des principes actifs ont été étudiées.

Une étude structurale détaillée en RMN 2D a été réalisée sur les nouveaux dérivés.

Mots-clés : Réaction de Mitsunobu-Cyclodextrines fonctionnalisées-Dimères de CDs-Enzymes artificielles-Complexes métalliques-Physico-chimie.