



**HAL**  
open science

# Récepteurs auto-assemblés pour des molécules d'intérêt biologique

Alexandre Héloin

► **To cite this version:**

Alexandre Héloin. Récepteurs auto-assemblés pour des molécules d'intérêt biologique. Autre. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1096 . tel-02305400

**HAL Id: tel-02305400**

**<https://theses.hal.science/tel-02305400>**

Submitted on 4 Oct 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N°206**  
**Chimie, Procédés, Environnement**

**Spécialité de doctorat** : Chimie  
**Discipline** : Chimie organique

Soutenue publiquement le 05/07/2019, par :  
**Alexandre Héloin**

---

**Récepteurs auto-assemblés pour des  
molécules d'intérêt biologique**

---

Devant le jury composé de :

Amgoune, Abderrahmane	Professeur, Université Lyon 1,	Examineur
Bibal, Brigitte	Maître de conférence, Université de Bordeaux,	Rapporteuse
Cougnon, Fabien	Chercheur, Université de Genève,	Rapporteur
Martinez, Alexandre	Professeur, Université Aix-Marseille,	Examineur
Reinaud, Olivia	Professeure, Université Paris Descartes	Examinatrice
Leclaire, Julien	Professeur, Université Lyon 1	Directeur de thèse
Vial, Laurent	Chargé de recherche CNRS, Université Lyon 1	Co-directeur

---



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique  
Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil Formation et Vie  
Universitaire  
Vice-président de la Commission Recherche  
Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
M. le Professeur Didier REVEL  
M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE  
Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude  
Bernard  
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon  
Sud – Charles Mérieux  
Faculté d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques  
Institut des Sciences et Techniques de la  
Réadaptation  
Département de formation et Centre de  
Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C.  
BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.  
VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M.  
SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies  
Département Biologie  
Département Chimie Biochimie  
Département GEP  
Département Informatique  
Département Mathématiques  
Département Mécanique  
Département Physique  
UFR Sciences et Techniques des Activités  
Physiques et Sportives  
Observatoire des Sciences de l'Univers de  
Lyon  
Polytech Lyon  
Ecole Supérieure de Chimie Physique  
Electronique  
Institut Universitaire de Technologie de Lyon  
1  
Ecole Supérieure du Professorat et de  
l'Education  
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A.  
MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## ABREVIATIONS

Å : angström

AcOH : acide acétique

ADN : acide desoxyribonucléique

AEC : 3-amino-9-éthylcarbazole

AIBN : Azobisisobutyronitrile

AO : Acridine orange

BCA : 2,2'-bisquinoléine-4-4'-dicaarboxylique

BOC : tertbutoxycarbonyle

BT : base de Tröger

c : facteur de sigmoïde

CAN : Cérium d'ammonium et de nitrate

CB : cucurbituril

CCD : Chimie combinatoire dynamique

CI : Indexation cellulaire

COSY : COrrelation Spectroscopy

$\delta$  : déplacement chimique

DABCO : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

Dbz : Dibenzylidèneacétone

DBO : 3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene

DCM : dichlorométhane

DMA : N,N-diméthylformacétamide

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DOSY : Diffusion Ordered Spectroscopy

ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ESI : electrospray

FITC : isothiocyanate de la fluorescéine

GABA : acide  $\gamma$ -butyrique

GLU : acide glutamique

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Connectivity

HRMS : high resolution mass spectroscopy

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

IC<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice médiane

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

LED : diode électroluminescente

LC/MS : Liquid chromatography-mass spectrometry

Lys : Lysine

M : mol.L<sup>-1</sup>

MeCN : Acetonitrile

NBS : N-bromosuccinimide

NMP : N-méthyl-2-pyrrolidone

ODC : orthonine decarboxylase

pD : potentiel deutérium

pH : potentiel hydrogène

ppm : partie par million

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RTCA : Real Time Cell Analysis

SASA : surface accessible au solvant

Spd : Spermidine

Spm : spermine

S<sub>N</sub>2 : Substitution nucléophile d'ordre 2

T : température

t<sub>r</sub> : temps de rétention

TA : Température ambiante

---

TCNB : 1,2,4,5-tétracyanobenzène

TEA : triéthylamine

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TMEDA : N,N,N',N'-  
tétraméthyléthylènediamine

TMS : tétraméthylsilane

TMSP : Acide triméthylsilylpropanoïque  
deutééré

TRIS : 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-  
1,3-diol

Z : impédance

---

## Remerciement

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Mme Brigitte Bibal et M. Fabien Cougnon pour avoir accepté d'évaluer le travail de ce manuscrit en tant que rapporteur et d'avoir évalué la soutenance. Je souhaite remercier tout autant M. Alexandre Martinez, Mme Olivia Reinaud d'avoir assisté à la soutenance de thèse et d'évaluer la présentation. Je remercie M. Abderrahmane Angoume d'avoir joué le rôle de président du jury de thèse.

Je tiens ensuite à remercier mon directeur de thèse, Julien Leclaire, qui m'a permis de développer les travaux dans une thématique originale et innovante. Je le remercie pour sa patience, pour la qualité scientifique apportée dans ses travaux de recherche et par conséquent dans mon projet. Notamment, les discussions très enrichissantes autour du perfectionnement des analyses en ITC ont été pour moi des moments très riches d'un point de vue travail et rigueur. Je remercie tout autant Laurent Vial, mon co-directeur de thèse, pour l'implication dans la créativité et le développement du projet. Cela a été très enrichissant de développer des thématiques pluridisciplinaires à l'interface de la biologie ou de la physique, avec des idées nouvelles qui chaque jour venaient dynamiser le projet.

Mes deux directeurs de thèse m'ont aussi permis de travailler avec de nombreux collaborateurs en France ou à l'étranger : Yvan Huc et Pradeep Mendal pour la cristallographie, Elise Dumont pour la chimie théorique, Fabien Cougnon et Kenji Caprice pour les synthèses de briques sur l'extrusion de soufre ou encore le Ferenc Fenyvesi pour m'avoir accueilli très chaleureusement en Hongrie pendant trois semaines hivernales pour les travaux en biologie et de microscopie. Je remercie aussi le personnel des centres communs de masses et de spectroscopies qui ont su fournir des analyses de qualité pour consolider les résultats obtenus pendant ces trois années de thèse.

Je remercie ensuite tous mes collègues de l'équipe CSAp. Difficile de rester concis sur cette partie. Je tiens d'abord à remercier Mélissa, Marion, Emeric, Geoffroy et Jean avec qui j'ai passé ma première année. Geoffroy, tu as su être un élément indispensable par ton aide au laboratoire, par tes musiques animant la vie du laboratoire, ou tout simplement, par nos nombreuses discussions côte à côte au bureau. Ensuite, les premiers stagiaires sont arrivés : Yves et sa passion pour le RnB et le twerk, Léa et son « shim award of the month », Clara et son émotivité débordante, Francesca et son accent ou Fanny et nos défis musical, Appoline et sa timidité, Ousseynou et son côté tranquiiiiiiiille, ou Geoffrey et son caractère bien caché ou encore Jim ses évolutions capillaires. Clara, Francesca et Fanny ont ensuite fait partie de l'aventure de la thèse en tant que thésarde et non plus stagiaire. Très vite la team des Fighi est passée de collègue à amis et nous avons pu profiter autour de nombreux pots, soirées et escape game. Je suis fier de vous avoir comme amis aujourd'hui et je vous souhaite énormément de courage pour la suite de vos projets professionnels. Clara je n'oublierai pas les fous rires que j'ai eu grâce à chaque petite action du quotidien au laboratoire. Fanny je suis fier de la relation de confiance que nous avons créée ainsi que le processus de confiance en soi que nous avons pu établir et de nos repas/jeu de société que nous avons partagé plus récemment. Francesca je suis honoré d'avoir fait part de ton début de séjour en France et d'avoir été ton +1 pour plusieurs soirées. Enfin, un dernier thésard du CSAp et de la Team Fighi doit être mentionné : Benjamin Ourri. Je te remercie infiniment de m'avoir soutenu pendant ces 3 années chaque jour côte à côte, dans le même labo (ou pas), dans le même bureau (ou pas). Toutes nos discussions personnelles, professionnelles et autres... nous ont permis de passer un cap dans notre amitié. Pour moi, tu as été mon frère de thèse, mon frère de galère. Je te souhaite tout plein de courage pour la fin de ton aventure au CSAp et j'espère que tu ne changeras jamais car tu sais très bien que tu es le meilleur collègue que je ne puisse avoir dans ma vie. Je tiens ensuite à remercier les permanents du CSAp : Florent et ton côté boute-en-train, Nathalie et nos innombrables discussions sur

---

les enseignements, l'avenir dans l'éducation nationale ou encore sur les joies du quotidien et enfin Isabelle pour m'avoir impliqué fortement dans les olympiades de la chimie et aussi pour ce soutien apporté à chaque passage dans votre bureau.

Je souhaite ensuite chaleureusement remercier l'ensemble des membres de l'ICBMS, que ce soit pour de simple discussion au détour d'un couloir, ou bien des activités en dehors du laboratoire. Youssef, Aurélie et William, vous avez été de vraies révélations tant bien sur le plan professionnel, à pouvoir échanger et discuter sur de nombreux sujets, que sur le point amical. Je vous remercie pour votre authenticité.

Enfin, je remercie l'ensemble des gens avec qui j'ai partagé de nombreux moments au fur et à mesure de ces trois années de thèse. Impossible de pouvoir citer tout le monde, je tiens donc à remercier Cécile, Corentin, Alix, Marianne, Bastien, Nathalie, Nicolas, Adrien, Mathieu, Octavie, Bérengère, Pierre-Henry, Toto, Astrid, Augustin, Delphine, Julien, Albert, Aline, Clément, Vincent, Mika, Alex, Stéphanie... Une mention spéciale est à attribuer à Camille, Momo et Lolo. Vous êtes mes compagnons de galère, de voyage, de bonheur et je vous remercie d'avoir été à mes côtés et d'être à mes côtés pour toujours. Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir soutenu à travers toutes ces années d'études et de m'avoir permis de réaliser mes projets.

---

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE INTRODUCTIF</b> .....	3
<b>I) Présentation de la chimie supramoléculaire</b> .....	4
1) Généralités .....	4
2) Description des premiers hôtes supramoléculaires .....	4
3) La chimie combinatoire dynamique .....	6
A) Présentation .....	6
B) Synthèse de thiophénols .....	8
C) Chimiothèque exploitant la chimie des disulfures .....	12
<b>II) Analyse énergétique de supramolécules</b> .....	14
1) Définitions .....	14
2) Outils analytiques .....	14
A) Généralités .....	14
B) Obtention de données thermodynamiques par ITC .....	14
<b>III) Objectifs</b> .....	16
<b>CHAPITRE 1 : Les dynarènes polycarboxylates : hôtes supramoléculaires pour des invités d'intérêt biologique</b> .....	19
<b>Partie A : Etude bibliographique – la reconnaissance moléculaire de cations en solution aqueuse et ses applications au sein des cellules</b> .....	21
<b>I) Présentation des hôtes supramoléculaires hydrosolubles capables d'effectuer de la reconnaissance de cation</b> .....	21
1) Description des cyclodextrines .....	21
2) Description des calixarènes .....	22
3) Description des pillararènes .....	22
4) Description des cucurbiturils .....	23
<b>II) Thermodynamique de la reconnaissance en solution aqueuse</b> .....	24
1) Thermodynamique de l'association hôte-invité .....	24
2) Analyse en phase gaz de la complexation .....	25
A) Présentation du modèle « clé-serrure » : analyse de l'enthalpie .....	25
B) Modifications des degrés de liberté : analyse entropique .....	26
3) Influence du solvant sur la complexation .....	27

---

A)	Effet hydrophobe classique .....	27
B)	Effets hydrophobes non classiques : rôle de la cavité.....	27
4)	Conclusion sur la stabilité des complexes en solution aqueuse .....	31
III)	Formation de supramolécules dans les cellules .....	32
1)	Les polyamines : rôles biologiques.....	32
A)	Présentation et synthèses de polyamines .....	32
B)	Rôle des polyamines .....	33
2)	Détection de la spermine en milieu cellulaire .....	34
A)	Biocompatibilité des récepteurs supramoléculaires .....	34
B)	Reconnaissance de la spermine en solution aqueuse .....	35
C)	Utilisation de principes actifs : chimiothérapie supramoléculaire .....	36
D)	Preuve d'internalisation dans les cellules.....	37
<b>Partie B : Synthèse de dyn[n]arène à l'aide de la chimie combinatoire dynamique et application à la complexation de cation en solution aqueuse.....</b>		<b>40</b>
I)	Une nouvelle famille de récepteur : les dyn[n]arènes .....	40
1)	Présentation générale des divers dynarènes.....	40
2)	Synthèses et caractérisations des dyn[n]arènes polycarboxylates .....	41
A)	Etude autour de la brique 4.....	41
B)	Etude autour de la brique 5.....	49
C)	Etude des bibliothèques mixtes avec les briques 4 et 5.....	53
II)	Interactions des dynarènes polycarboxylates avec des diamines d'intérêt biologique .....	55
1)	Cas des diamines.....	55
A)	Présentation de l'étude .....	55
B)	Cas du trimère 4 <sub>3</sub> .....	56
C)	Cas du tétramère 4 <sub>4</sub> .....	58
2)	Cas de la spermine et de la spermidine .....	64
A)	Cas du dyn[3]arène .....	64
B)	Cas du macrocycle de taille 4 .....	67
III)	Interactions des dynarènes polycarboxylates avec des métaux.....	69
1)	Contextualisation.....	69
2)	Etude de la formation de complexe dynarène-métaux par ITC.....	69
3)	Mise en évidence du rôle effecteur des métaux pour la complexation de molécules organiques avec les dyn[4]rènes.....	71
A)	Retour sur les travaux effectués avec les acides aminés .....	71
B)	Complexation de l'histidine à l'aide du calcium .....	72

---

C)	Extension de la stratégie à d'autres ligands organiques .....	74
D)	Complexation de diols à l'aide de métaux alcalins à l'état solide .....	76
IV)	Conclusion sur la complexation des dynarènes en solution aqueuse .....	77
	<b>Partie C : Utilisation des dyn[n]arènes polycarboxylates en système cellulaire .....</b>	<b>78</b>
I)	Cadre de l'étude.....	78
1)	Système HeLa et hypothèses d'étude .....	78
2)	Principe de la méthode RTCA .....	78
II)	Mise en évidence d'un effet cytostatique .....	79
III)	Identification de l'origine du phénomène antiprolifératif .....	80
1)	Spectre des hypothèses .....	80
2)	Suivi cinétique en présence de différents agents chimiques .....	81
A)	Comparaison avec les briques élémentaires .....	81
B)	Comparaison avec d'autres récepteurs macrocycliques .....	82
C)	Incubation avec des complexes dynarènes-polyamines .....	84
3)	Etude de l'internalisation dans les cellules.....	87
A)	Conception d'un ligand fluorophore .....	87
B)	Expérience de microscopie : internalisation dans les cellules .....	88
C)	Conclusion sur les hypothèses .....	90
IV)	Identification de l'origine du régime transitoire .....	91
1)	Position du problème et hypothèses .....	91
2)	Détermination de l'évolution la quantité de spermine synthetase.....	91
A)	Contexte .....	91
B)	Détermination du taux de protéine .....	92
C)	Détermination du taux d'enzyme .....	93
D)	Conclusions .....	94
	<b>CONCLUSION DU CHAPITRE 1.....</b>	<b>95</b>
	<b>CHAPITRE 2 : Modification structurelle des dynarènes par extrusion de soufre .....</b>	<b>97</b>
	<b>Partie A : Etude bibliographique – Formation de liens thioéthers par processus d'extrusion de soufre .....</b>	<b>99</b>
I)	Présentation générale .....	99
1)	Définition .....	99
2)	Avantage des réactions d'extrusion de soufre pour la synthèse de thioéthers.....	99
II)	Synthèse de thioéther par substitution directe.....	100

---

III)	Synthèse de thioéthers à l'aide d'agent phosphoré.....	102
1)	Présentation des agents phosphorés.....	102
2)	Analyse mécanistique de l'extrusion de soufre à l'aide d'aminophosphine.....	104
3)	Facteurs influençant l'extrusion de soufre.....	106
A)	Influence des paramètres physico-chimiques.....	106
B)	Influence de la structure du substrat.....	107
4)	Applications.....	109
A)	Extrusion de soufre sur des glycoprotéines.....	109
B)	Synthèses de récepteurs supramoléculaires par extrusion de soufre.....	109
IV)	Synthèse de squelette carboné par extrusion de soufre.....	111
1)	Formation d'alcènes par extrusion de soufre.....	111
2)	Création d'alcane par extrusion de soufre.....	112
Partie B : Etude de l'extrusion de soufre pour la synthèse de dérivés des dynarènes.....		114
I)	Cadre de l'étude et objectifs.....	114
II)	Post-modification de disulfures issus de briques monothiolées.....	115
1)	Synthèse des briques élémentaires.....	115
A)	Briques élémentaires de première génération.....	115
B)	Briques élémentaires de deuxième génération.....	116
2)	Extrusion de soufre par substitution directe.....	119
A)	Identification des références.....	119
B)	Suivi de la réaction de substitution directe.....	121
3)	Extrusion de soufre à l'aide d'agent phosphoré.....	122
III)	Phénomène d'extrusion de soufre spontanée sur des macrocycles poly(disulfures) pyridinium carboxylates.....	126
1)	Présentation des briques pyridinium.....	126
2)	Synthèse de macrocycles en chimiothèque.....	127
3)	Rationalisation du phénomène d'extrusion spontanée à l'aide de briques monomériques.....	131
4)	Perspectives.....	133
CONCLUSION - CHAPITRE 2.....		135
CHAPITRE 3 : Conception de précurseur pour la synthèse d'iminothiocines.....		137
Partie A : Etude bibliographique - les Dithiocines et analogues.....		139
I)	Études des bases de Tröger.....	139
1)	Description et synthèses des bases de Tröger.....	139
A)	Présentation générale.....	139

---

B) Analogues fonctionnalisés des bases de Tröger .....	140
a) Fonctionnalisation/modification du pont méthylène .....	140
b) Fonctionnalisation du cycle aromatique.....	141
2) Applications des bases de Tröger .....	142
A) Oligomères de Bases de Tröger et applications.....	142
B) Macrocyces mixtes incluant un motif base de Tröger.....	144
II) Les imino-1,5-dithiocines : nouveaux analogues des bases de Tröger .....	146
1) Présentation générale des dithiocines.....	146
A) Définition et analyse structurale.....	146
B) Synthèse d'imino-1,5-dithiocines et mécanisme.....	147
2) Fonctionnalisation de dithiocines .....	148
A) Fonctionnalisation du pont azoté .....	148
B) Fonctionnalisation des noyaux aromatiques.....	150
Partie B : Vers de nouvelles structures dérivés des dithiocines.....	151
I) Cadre de l'étude.....	151
1) Mise en évidence des dithiocines dans le laboratoire .....	151
2) Travaux antérieurs effectués dans le laboratoire.....	151
3) Objectifs .....	153
II) Synthèse de nouvelles dithiocines hydrosolubles.....	153
1) Synthèse du précurseur thiolé .....	153
2) Synthèse d'amine hydrophile.....	154
3) Synthèse de dithiocine fonctionnalisée .....	154
4) Etude de l'échange de l'amine sur les dithiocines.....	155
III) Synthèse des précurseurs de polydithiocines.....	156
1) Précurseurs de polydithiocines macrocycliques.....	156
A) Synthèse de dithiophénol diformylés .....	156
B) Applications .....	159
2) Précurseurs de poly-dithiocines disulfures.....	161
3) Précurseurs de polydithiocines présentant des unités biphényles .....	164
Experimental section .....	167
I) General informations.....	168
1) Reagents and solvents .....	168

---

2) NMR.....	168
3) Mass spectra, HRMS and LC-MS.....	168
4) Melting point .....	168
5) Potentiometric titration .....	168
II) Organic Syntheses.....	169
1) Syntheses from the first chapter.....	169
2) Synthesis from second chapter .....	173
3) Synthesis from third chapter .....	178
III) ITC experiments .....	191
1) General procedures .....	191
2) Results .....	191
A) Macrocycle 4 <sub>3</sub> .....	191
B) Macrocycle 4 <sub>4</sub> .....	192
C) Substitution from dynarène-ethylènediamine complex 4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> .....	195
IV) Combinatorial libraries – HPLC analysis.....	195
1) Methods .....	195
2) Procedures .....	196
A) Dynamic combinatorial libraries with building block 4, 5 or 4 and 5 with or without template.....	196
B) Sulfur extrusion analysis.....	196
V) Cristallographic structure .....	196
VI) NMR Titration .....	198
VII) RTCA experiments.....	198
1) General procedure for Cell Cycle Analysis with a single molecule: IC <sub>50</sub> measurement .....	198
2) General procedure for Cell Cycle Analysis with precomplexed 4 <sub>4</sub> .....	199
VIII) Microscopy.....	199
IX) Human Spermine Synthase KIT ELISA .....	200
X) Protein Assay Kit .....	200
ANNEXES .....	201
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	219
BIBLIOGRAPHIE.....	220

---



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les interactions intermoléculaires sont à la base des processus de formation d'assemblages supramoléculaires. Ces interactions sont présentes dans de nombreux systèmes du monde du vivant et sources d'inspiration au laboratoire lors de l'élaboration de récepteurs moléculaires. Conçue dans le but d'obtenir des récepteurs synthétiques capables d'être aussi efficaces et sélectifs que les récepteurs naturels, la chimie combinatoire dynamique est une approche qui s'est distinguée de la synthèse traditionnelle. Cette approche, qui peut être mise en œuvre en conditions douces, est développée depuis la fin du XX<sup>e</sup> siècle et s'inspire des travaux de Pedersen sur la synthèse des éthers couronnés par « effet template ». L'objectif de ce manuscrit est de concevoir des récepteurs par une approche chimie combinatoire dynamique (CCD) et d'analyser les affinités de ces récepteurs pour des molécules d'intérêt biologiques en milieu aqueux.

Dans un premier chapitre, nous développerons une famille de para-cyclophanes contenant des liaisons disulfures : les dyn[n]arènes. Ces macrocycles synthétisés via une approche de CCD ont été obtenus à l'échelle du gramme à partir de briques moléculaires de type 1,4-dithiophénol polyfonctionnalisé, par formation de ponts disulfures. Une attention particulière sera portée ici aux dyn[n]arènes hydrosolubles fonctionnalisées par des groupements carboxylates ( $n = 3, 4$ ). Les caractéristiques structurales de ces édifices seront étudiées, ainsi que leurs propriétés de reconnaissance pour des polyamines, métaux et acides aminés. D'un point de vue fondamental, l'étude de la complexation du dyn[4]arène avec une série d' $\alpha, \omega$ -alkyle-diamines de longueur de chaîne croissante permettra de montrer le rôle capital des processus de solvatation/désolvatation lors de la reconnaissance : l'eau est donc un partenaire à part entière lors de la complexation en solution aqueuse, pouvant être à l'origine de la sélectivité d'un hôte pour un invité. La flexibilité conformationnelle des dynarènes et la capacité à subir un ajustement induit seront exploitées pour effectuer de nouvelles complexations d'acides aminés à l'aide de métaux effecteurs. Une étude de la reconnaissance moléculaire de polyamines biogéniques par les dynarènes sera menée *in cellulo* dans le but d'explorer l'effet cytostatique anti-prolifératif transitoire de ces cyclophanes sur les cellules cancéreuses HeLa. Une série d'expérience sera présentée dans le but d'identifier le mode d'action du macrocycle, son éventuelle internalisation au sein des cellules et la raison du caractère transitoire du phénomène observé.

Dans un second chapitre, les réactions d'extrusion de soufre seront présentées comme voie potentielle de post-modification des dyn[n]arènes. Les méthodes décrites depuis les années 1960 pour former des thioéthers à partir des disulfures pourraient nous permettre d'obtenir des dérivés des dynarènes structurellement plus robustes face aux oxydants et nucléophiles présents lors de processus de reconnaissance moléculaire. Ainsi, à partir de molécules modèles, nous tenterons de montrer qu'il est possible de combiner chimie combinatoire dynamique et post-conversion par les deux grandes stratégies de substitutions nucléophiles décrites dans la littérature : la substitution directe à l'aide d'un thiol et la substitution à l'aide d'un agent phosphoré sur des disulfures. Une chimiothèque composée d'une nouvelle famille de macrocycles capables d'effectuer de l'extrusion spontanée et inattendue de soufre sera étudiée. Ces hétérocycloligomères pourront servir de point de départ à la conception de récepteurs à acides aminés.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous présenterons une nouvelle classe de molécules peu décrite dans la littérature : les iminodithiocines. Ces édifices chiraux en forme de V sont des objets structurellement proches de bases de Tröger. Les bases de Tröger ont notamment été incorporées dans des édifices macrocycliques hydrosolubles : leur rigidité et leur forme de pince moléculaire ont été exploitées pour

effectuer de la reconnaissance moléculaire, notamment d'acides nucléiques. Nous étudierons dans un premier temps la formation d'iminodithiocines fonctionnalisées et hydrosolubles à partir de briques monothiophénols. Nous présenterons enfin différents précurseurs dithiophénols, conçus dans le but de créer des nouveaux cavitands polydithiocines se distinguant des dynarènes à la fois par la forme (cavité ovoïde et non parallépipédique) et l'orientation des groupements substituants (équatoriaux et non axiaux).

# CHAPITRE INTRODUCTIF

# I) Présentation de la chimie supramoléculaire

## 1) Généralités

La chimie supramoléculaire est une branche de la chimie basée sur l'étude des interactions non covalentes entre plusieurs molécules. Jean-Marie Lehn l'introduit, en 1978, comme une chimie dite « au-delà de la chimie moléculaire » où l'on forme des assemblages non covalents entre molécules.<sup>1</sup> Les travaux de recherche en chimie supramoléculaire consistent à étudier le comportement de molécules entre elles et tentent d'identifier les propriétés résultantes lors de leurs assemblages.<sup>2</sup> Les interactions sont à l'origine des phénomènes biologiques tels que le transport membranaire ou encore la catalyse enzymatique, sources d'inspiration de la chimie supramoléculaire. La conception de ces édifices à l'échelle du laboratoire constitue, pour le chimiste, un moyen de reproduire des systèmes biologiques, dans le but d'être capable de les comprendre, les analyser et d'aller jusqu'à les mimer. Un panel de liaisons intermoléculaires est connu dans la littérature selon la nature des constituants des différents partenaires.<sup>2,3</sup> Les cinq grandes classes de forces intermoléculaires, catégorisées selon leurs forces et les fonctions chimiques des partenaires lors de l'interaction sont présentées sur la figure 1. Ces forces sont plus faibles que les liaisons covalentes (qui elles, sont supérieures à  $200 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) donc les assemblages supramoléculaires sont moins stables sur le plan thermodynamique et plus labiles sur le plan cinétique que les édifices covalents.

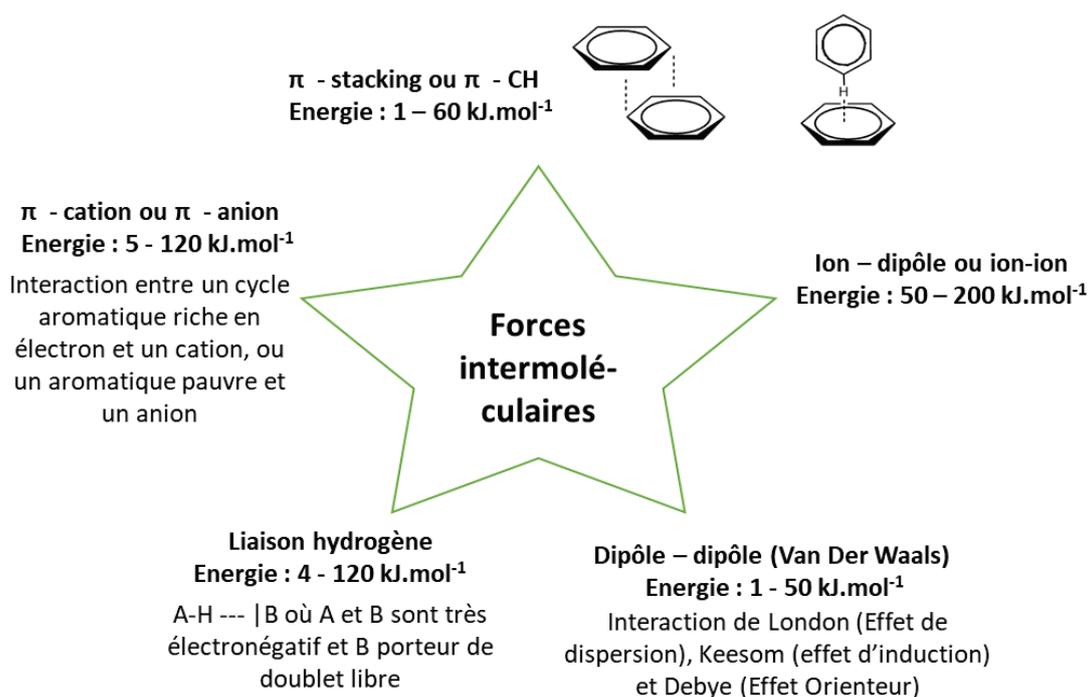


Figure 1 : principales forces intermoléculaires

## 2) Description des premiers hôtes supramoléculaires

Une supramolécule peut être décrite comme l'assemblage de deux ou plusieurs molécules : un « hôte » accueille un partenaire qualifié « d'invité » dans un site favorisant les interactions intermoléculaires. On parle alors de chimie hôte-invité (figure 2). De manière générale, l'hôte est une molécule organique macrocyclique possédant des sites d'interaction effectuant des liaisons de façon convergente et l'invité de façon divergente.<sup>4</sup>

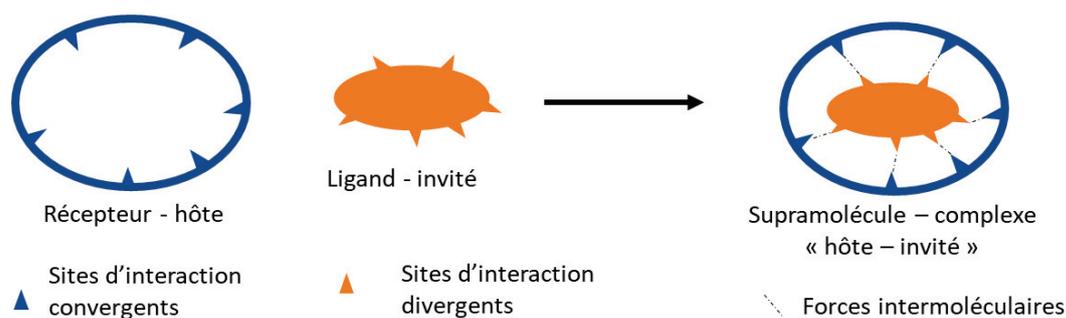


Figure 2 : Présentation de la réaction élémentaire de la chimie « hôte – invité »

Le fil conducteur de la chimie supramoléculaire depuis les années 1970 s'articule autour de l'élaboration d'hôtes synthétiques, efficaces et sélectifs pour une molécule invitée ciblée. Historiquement, la chimie supramoléculaire débute avec la complexation de cations par des éthers couronnes (figures 3a et 3b) : l'hôte qui présente les sites de coordination convergents est l'éther couronne, et la molécule présentant les sites de coordination divergents est par exemple un cation alcalin, ici  $K^+$ . Ici, les interactions intermoléculaires qui régissent la formation de complexe hôte-invité sont des interactions de type ion-dipôle entre les doublets des oxygènes et le cation. La découverte des éthers couronnes a été récompensée d'un Prix Nobel attribué à Pedersen en 1987 et de nombreux éthers couronnes sont répertoriés dans la littérature.<sup>5</sup> La complexation du potassium par un éther couronne permet de mimer le processus qu'effectue la valinomycine (figure 3c), synthétisée dans les bactéries<sup>6</sup> : cette molécule possède une structure en forme de couronne et permet, après complexation à l'aide des groupements carbonyles convergents vers le centre de la structure, le transport des ions potassium à travers les membranes. Les éthers couronnes sont ainsi des molécules modèles simplifiés permettant une représentation des processus du monde du vivant.

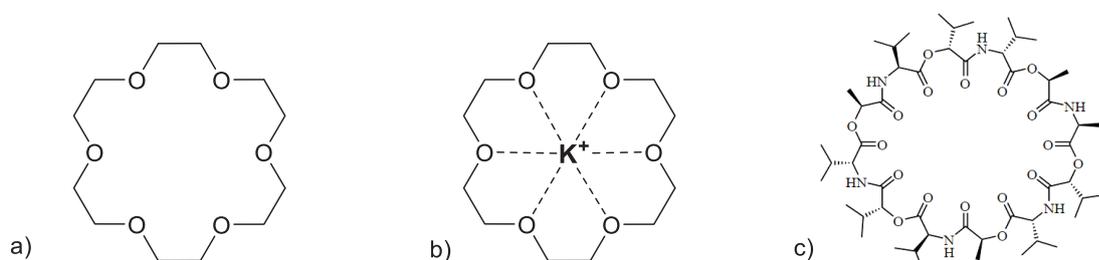


Figure 3 : a) Schéma d'un éther couronne, b) complexe "hôte-invité" entre un éther-couronne et un cation potassium, c) structure de la valinomycine.

Ainsi, au fur et à mesure du développement de nouveaux outils synthétiques et d'analyses, de nouveaux macrocycles ont été ajoutés à la famille des hôtes supramoléculaires. Plusieurs motivations peuvent justifier la synthèse de nouveaux hôtes pour complexer différents invités. Ces hôtes peuvent donc présenter :

- Des sites de coordination plus ou moins nombreux et variés.
- Un volume d'accueil plus ou moins important.

Ainsi, une nouvelle génération d'hôtes supramoléculaires, les cyclodextrines (figure 4a) sont décrites dans la littérature et présentent structurellement une cavité plus développée dans l'espace avec plusieurs sites de coordinations. Elles ont été décrites comme des hôtes étant capables de séquestrer, entre autres, des composés aromatiques<sup>7</sup>. Les calixarènes (figure 4b) sont apparus comme une nouvelle génération d'hôte supramoléculaire : la présence d'une cavité en forme de cône a permis de

complexer des petits composés aromatiques par  $\pi$ -stacking ou encore de piéger du monoxyde d'azote<sup>8,9</sup>. Ces entités font alors partie des structures incontournables de la chimie supramoléculaire. Parmi les autres structures incontournables, on peut citer les cryptands (figure 4c), découvert par Jean-Marie Lehn, ou encore les sphérands (figure 4d), découvert par Donald James Cram. Lehn et Cram sont tous les deux lauréats du Prix Nobel en 1987 avec Pedersen.<sup>10</sup> Ces divers hôtes présentent ainsi une cavité bien définie, de volumes différents avec des sites d'interactions variés.

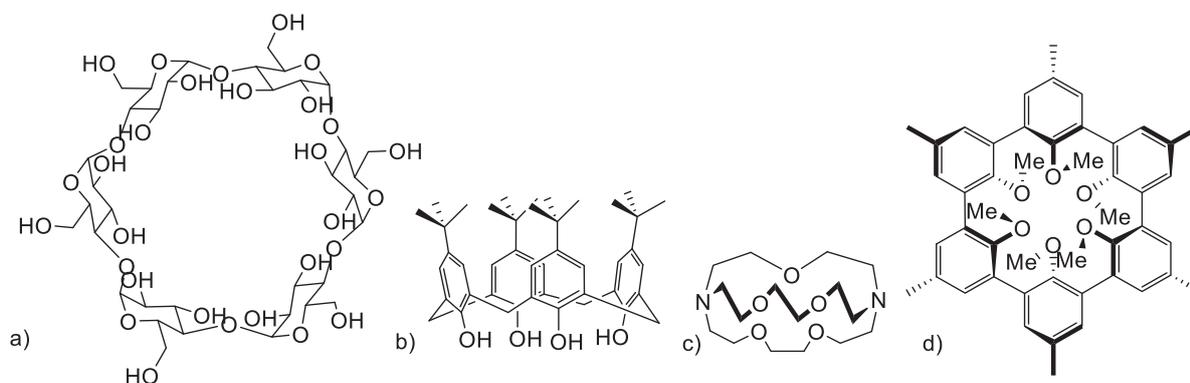


Figure 4 : Exemples d'hôtes : a) cyclodextrine, b) calixarène, c) cryptand et d) sphérand

Hormis les cyclodextrines, la synthèse de tels composés est généralement fastidieuse et demande souvent de nombreux efforts en termes de purification. En effet, la synthèse d'un macrocycle souhaité conduit généralement à la formation de plusieurs sous-produits : d'autres macrocycles avec des propriétés similaires qu'il faut séparer, ou des espèces linéaires non désirées. La découverte fortuite par Pedersen des éthers couronnes a permis de décrire « l'effet template » selon lequel la prédisposition des constituants du futur récepteur autour d'une molécule facilite sa formation. Il est possible de récupérer le macrocycle formé en éliminant le template du milieu réactionnel. Un développement de cette approche a été effectué et mis en pratique dans des stratégies plus récentes : c'est le principe de la chimie combinatoire dynamique.

### 3) La chimie combinatoire dynamique

#### A) Présentation

De manière à former des macrocycles dans des conditions douces, le concept de chimie combinatoire dynamique (CCD) a initié dans les années 90.<sup>11</sup> Le principe de cette approche est présenté à la figure 5. Une ou plusieurs entités, appelées « briques moléculaires » pouvant se lier par des liaisons réversibles sont mises en solution. Il est ainsi possible de former toutes les diverses combinaisons possibles en termes de taille et de séquence d'oligomères. La réversibilité de la formation des liaisons est mise en jeu jusqu'à atteindre un état d'équilibre entre les différents oligomères. Le système est appelé « chimiothèque dynamique ».<sup>12</sup> Sous contrôle thermodynamique, les proportions de chacune des espèces formées sont directement reliées à leurs stabilités. Par ajout d'un template adéquat, la réversibilité des réactions de formation des liaisons entre les différentes briques entraîne des modifications dans les stabilités des différentes espèces formées. Il en résulte donc un changement des concentrations des espèces dans la chimiothèque. Le cas optimal est d'obtenir l'amplification exclusive d'une espèce, c'est-à-dire la formation d'une unique espèce dans la chimiothèque à l'équilibre thermodynamique. Dans ce cas, l'isolation et la purification du macrocycle,

par retrait du template sont grandement facilitées. La reproduction à grande échelle de la bibliothèque permet une synthèse simple de macrocycle, sans employer de techniques de purification fastidieuses.

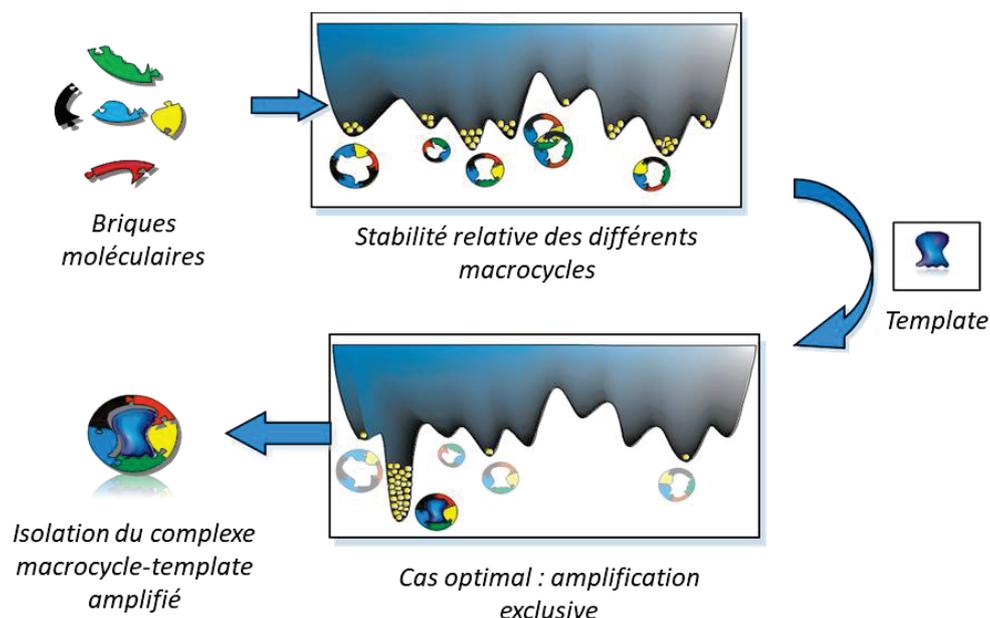


Figure 5 : explication du concept de chimie dynamique combinatoire

Les différents liens covalents réversibles qu'il est possible d'exploiter dans cette approche pour former des macrocycles sont présentés en figure 6.<sup>11</sup>

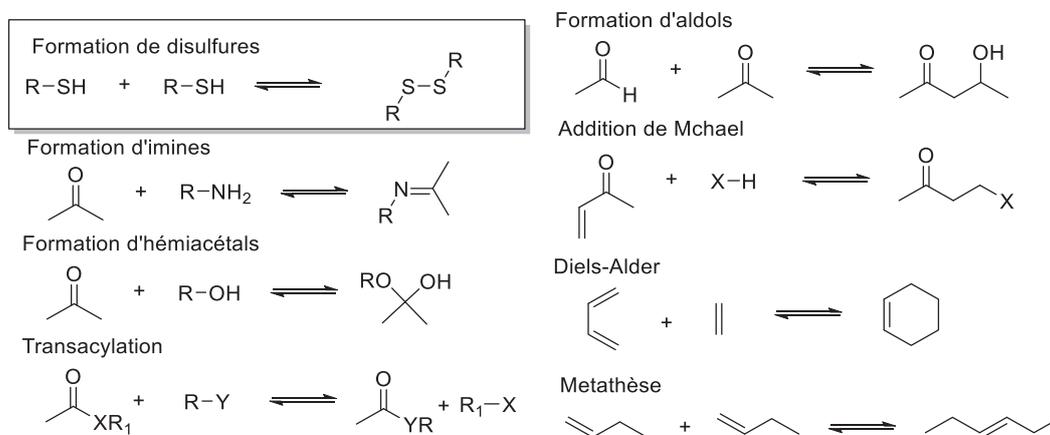


Figure 6 : réactions réversibles utilisées en chimie combinatoire dynamique

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé principalement des thiols aromatiques pour la formation de ponts disulfures. La chimie des ponts disulfures est compatible avec des conditions douces, en milieu organique ou aqueux. Elle est donc souvent mise en place dans des chimiothèques dynamiques. La chimie des ponts disulfures joue de plus un rôle important en biologie, car elle est impliquée par exemple dans la maintenance du potentiel d'oxydo-réduction des cellules ou encore dans le clivage de l'ADN par la calicheamicine et l'esperamicine<sup>13</sup>. A des pH neutres, la thermodynamique et la cinétique d'oxydation des thiols en disulfures à l'aide du dioxygène sont favorables (figure 7). Il est aussi possible d'effectuer des réactions d'échanges, entre un pont disulfure et un thiol libre ou un thiolate, de manière à former de nouveaux ponts disulfures. Ces réactions

réversibles peuvent donc être utilisées en CCD pour concevoir de nouveaux récepteurs appliqués en chimie combinatoire dynamique.

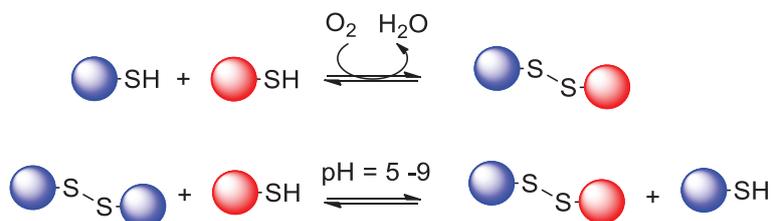


Figure 7 : Oxydation des ponts disulfure et réversibilité de l'échange

Nous allons faire un résumé des voies de synthèses de thiophénols répertoriées dans la littérature à ce jour.

## B) Synthèse de thiophénols

### a) A partir de dérivés halogénés

De nombreuses réactions utilisant la catalyse par les métaux de transition sont utilisées pour la formation de thiophénols **0-B** en partant de composé de type halogénure d'aryle **0-A**. Trois voies principales sont décrites en figure 8.

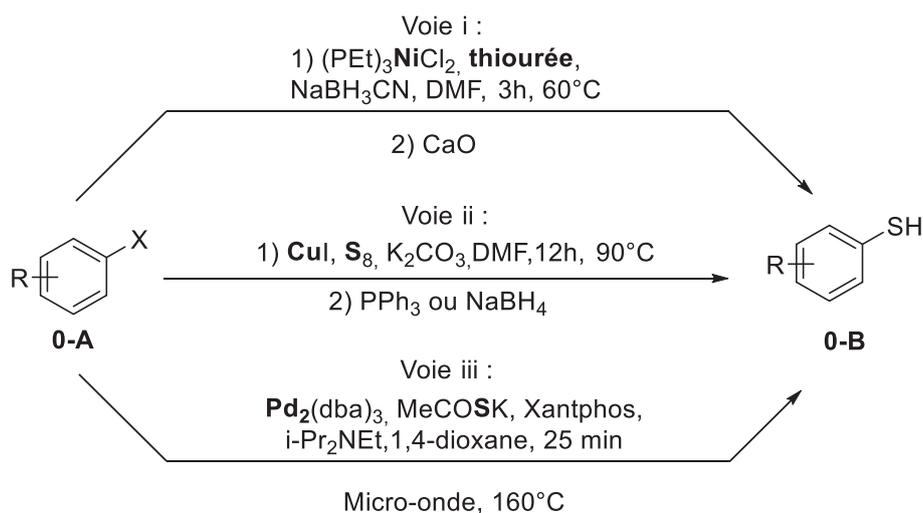


Figure 8 : Voies principales de conversion des halogénures d'aryles en thiophénols.

La voie de synthèse i de la figure 8 présente l'action du nickel.<sup>14</sup> Dans les conditions utilisées, le composé boré vient réduire le nickel au degré zéro, capable de catalyser un couplage entre la thiourée et l'halogénure d'aryle **0-A**. Après action de l'oxyde de calcium, on forme un thiol **0-B** ainsi que de l'urée. Cette méthode est cependant peu compatible avec des conditions douces par l'utilisation du DMF.

La voie de synthèse ii de la figure 8 fait intervenir le soufre colloïdal comme réactif et le cuivre(I) comme catalyseur.<sup>15</sup> Cette méthode permet d'obtenir le produit soufré **0-B** désiré avec des rendements supérieurs à 85% aussi bien avec des aromatiques enrichis ou appauvris électroniquement. Un des inconvénients est la restriction du substrat de départ : seuls les composés de types iodés sont généralement réactifs.

Enfin, la voie iii de la figure 8 repose sur une méthode au palladium<sup>16</sup>. Le complexe formé entre le palladium et le Xantphos catalyse la formation du thiophénol **0-B**. L'utilisation des micro-ondes permet d'atteindre des rendements supérieurs à 85%. Néanmoins, peu de fonctions chimiques sont compatibles avec ces conditions chimiques, limitant les choix de substrat. Aussi, les dérivés chlorés ne sont pas réactifs.

Une autre stratégie que nous emploierons dans ce manuscrit fait appel au phénol comme précurseur de synthèse de thiophénols.

*b) A partir de phénols – réarrangement de Newman-Kwart*

La stratégie majeure reportée dans la littérature pour synthétiser des thiophénols **0-B** est la séquence réactionnelle présentée à la figure 9. L'avantage principal de cette séquence est de partir de phénol **0-C** très souvent disponible commercialement.

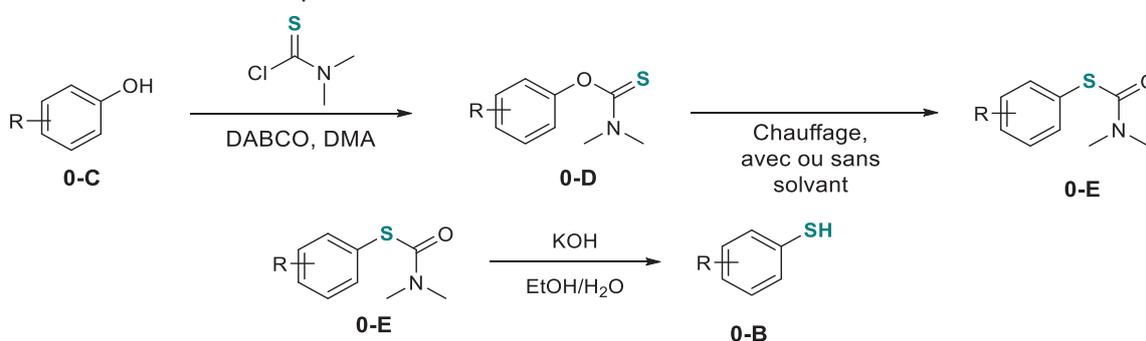
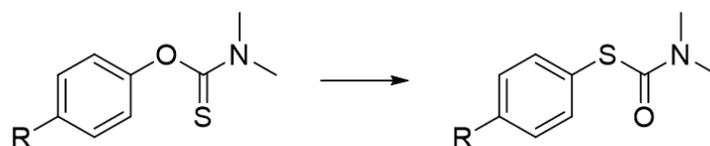


Figure 9 : Stratégie de synthèse de conversion des phénols en thiophénols

Après conversion de la fonction phénol de **0-C** en fonction O-thiocarbamate **0-D** au cours d'une première étape, on effectue un réarrangement de Newman-Kwart pour former le S-thiocarbamate **0-E**. Enfin, une hydrolyse basique conduit à la formation du thiol **0-B** souhaité. Les étapes 1 et 3 sont relativement simples à maîtriser en prenant deux précautions : le substituant R doit être chimio-compatible avec les conditions basiques employées, et enfin, la libération de thiol en fin de réaction nécessite de travailler en absence d'oxygène pour prévenir la formation de ponts disulfures. L'étape la plus difficile à maîtriser d'un point de vue synthétique est le réarrangement de Newman-Kwart lui-même. Nous allons détailler les méthodes de la littérature pour effectuer cette réaction.

Cinq stratégies majeures ont été développées entre 1966 et 2018 et sont résumées sur la figure 10. La première méthode (figure 10 – cadre 1) est la méthode historique par activation thermique introduite par Newman<sup>17</sup> et Kwart<sup>18</sup>. Celle-ci sera la plus employée dans la suite de ce manuscrit. Elle se décline en trois différentes versions : avec ou sans solvant par simple chauffage, ou encore avec solvant par activation micro-onde.



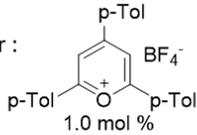
<p><b>1 - Induction thermique – Newman/Kwart et al. (1966)</b></p> <p>Avec ou sans solvant, chauffage classique ou micro-onde (200 à 300 °C)</p> <p>R électroattracteurs – R = NO<sub>2</sub> à 235°C sans solvant chauffage classique r = 95 %</p>	<p><b>2 - Réaction palladocatalysée – Lloyd – Jones et al. (2009)</b></p> <p>Avec Catalyseur [Pd(tBu<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>] à 2 mol% (100°C)</p> <p>R électroattracteurs – R = NO<sub>2</sub> Toluène r &gt; 99 %</p>	<p><b>3 - Réaction photocatalytique – Nicewicz et al. (2015)</b></p> <p>Catalyseur :</p>  <p>R électrodonneurs – R = OMe à température ambiante - MeCN Blue LED - r = 99 %</p>
<p><b>4 - Activation rédox. – Pittelkow et al. (2018)</b></p> <p>1 éq. CAN (Cérium (IV) Nitrate Ammonium) – Température ambiante</p> <p>R électrodonneurs – R = OMe r = 99 %</p>	<p><b>5 - Réaction électrocatalysée – Broese et al. (2018)</b></p> <p>Electrolyse galvanostatique Température ambiante</p> <p>R électrodonneurs – R = OMe r = 99 %</p>	

Figure 10 : Conditions classiques pour le réarrangement de Newman-Kwart

Dans le mécanisme proposé (figure 11), l'élément soufre est le meilleur nucléophile capable d'attaquer le carbone en position ipso du cycle aromatique de **O-D** par un processus intramoléculaire. Il se forme ainsi un intermédiaire réactionnel **O-F** de type 1,3-oxathietane à 4 centres stabilisé par les différentes formes de résonance issues de la délocalisation de la charge négative dans le cycle carboné. Enfin, la régénération du cycle aromatique s'accompagne de la rupture de la liaison carbone ipso – oxygène de façon à former le groupement O-thiocarbamate. D'un point de vue thermodynamique, la réaction est favorisée par la formation d'une liaison C=O plus stable qu'une liaison C=S : en effet, l'énergie de dissociation d'une liaison C=O vaut 799 kJ.mol<sup>-1</sup> tandis que pour une liaison C=S l'énergie de dissociation vaut 573 kJ.mol<sup>-1</sup>.<sup>19</sup> L'état de transition est ainsi élevé, dû à un intermédiaire chargé et tendu : cette réaction présente une forte énergie d'activation, la conversion nécessitant des températures de réactions conséquentes.<sup>17</sup>

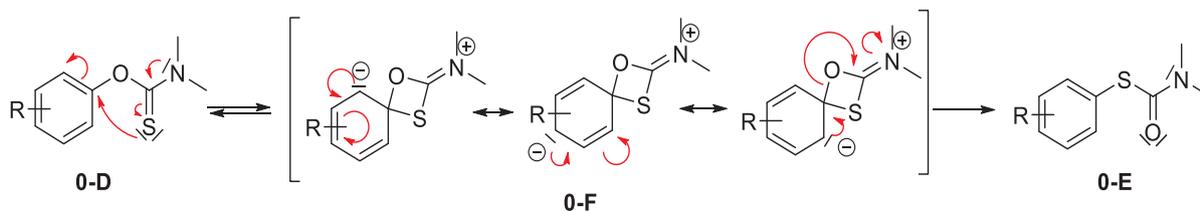


Figure 11 : Mécanisme du réarrangement de Newman-Kwart

Des études cinétiques et théoriques sont en accord avec ce mécanisme d'ordre 1 et cet intermédiaire réactionnel monomoléculaire.<sup>18</sup> L'analyse du mécanisme montre que les groupements

électroattracteurs sur le cycle aromatique peuvent stabiliser les charges localisées en position ortho et para du groupement thiocarbamate et donc améliorer la réaction sous contrôle cinétique (figure 11). Par exemple, un substrat présentant des groupements nitro est converti avec des rendements remarquables comme l'exemple précisé en figure 10. L'intermédiaire réactionnel étant polaire, il est aussi stabilisé par des solvants polaires : certains réarrangements décrits dans la littérature sont donc effectués dans des solvants très polaires type dichlorobenzène, diphényléther ou NMP.<sup>20</sup> Les micro-ondes sont décrites dans la littérature comme outils performants pour la réaction de réarrangement, compatible avec la présence de groupements donneurs ou accepteurs sur le substrat aromatique.<sup>20</sup> De façon générale cette réaction est compatible avec un nombre varié de fonctions chimiques initialement présentes sur le cycle aromatique. Cependant, il faut optimiser les conditions réactionnelles maximisant la conversion du substrat en réduisant le taux de dégradation thermique, car les températures appliquées sont généralement supérieures à 200°C.

Plus de 40 ans plus tard, de nouvelles méthodes basées sur des processus catalytiques ont vu le jour : la catalyse au palladium est effectuée à plus basse température (100°C), de manière à limiter les réactions de dégradations (figure 10 – cadre 2).<sup>21</sup> Cette réaction s'effectue par insertion du palladium entre la liaison oxygène – carbone ipso. Ce type de conversion est aussi favorisée en présence de groupements électroattracteurs sur le cycle aromatique, mais est peu tolérante à la présence d'autres groupements fonctionnels. En réalité, cette réaction présente de nombreuses limitations en termes de solubilité et doit s'effectuer dans des conditions anaérobies strictes. De très rares substrats ont été compatibles avec cette méthode.

En 2015, Nicewicz et al. proposent un nouveau type de réaction, photocatalysée en présence d'une base de type pyrylium (figure 10 – cadre 3).<sup>22</sup> Cette réaction d'oxydo-réduction photochimique est favorisée par la présence de groupements électrodonneurs sur le substrat et s'effectue à température ambiante. Elle a aussi l'avantage d'être tolérante par rapport à de nombreuses fonctions chimiques, mais présente l'inconvénient d'exclure les substrats photolabiles.

En 2018, deux nouvelles méthodes basées sur des processus radicalaires ont vu le jour, permettant de faire réagir des substrats équipés de groupements électrodonneurs. La méthode de Pittelkow et al. utilise le nitrate d'ammonium de cérium (IV) CAN dans le DMSO à température ambiante (figure 10 – cadre 4).<sup>23</sup> Ce processus passe par une barrière d'activation beaucoup plus faible énergétiquement que dans le cas d'une activation thermique simple (près de 110 kJ.mol<sup>-1</sup> d'écart entre les deux barrières d'activation), impliquant un état de transition radicalaire chargé positivement. Ces mêmes auteurs ont aussi montré la possibilité d'effectuer une réaction de réarrangement sur des substrats O-thiocarbamate benzylique.<sup>24</sup> La méthode de Broese a permis de démontrer la possibilité d'effectuer des réarrangements de Newman-Kwart par électrolyse en mode galvanostatique en appliquant des apports de charges catalytiques à température ambiante (figure 10 – cadre 5).<sup>25</sup> Ces conditions sont compatibles avec un large panel de substrat présentant des groupements électrodonneurs à nouveau.

Dans la suite de ce manuscrit, la réaction de Newman-Kwart sera effectuée en présence de groupements électroattracteurs sur le cycle aromatique tels que des esters ou des aldéhydes. On fera donc plutôt appel à la première méthode décrite pour effectuer ces réarrangements.

### C) Chimiothèque exploitant la chimie des disulfures

Plusieurs exemples dans la littérature décrivent l'utilisation de thiophénols ou de thiols benzyliques fonctionnalisés pour la synthèse de nouveaux récepteurs par chimie combinatoire dynamique. Généralement, des fonctionnalisations supplémentaires de sulfates ou carboxylates sont présentes sur ces thiophénols permettant d'effectuer une chimie en milieu aqueux.<sup>12</sup>

A partir de trois briques élémentaires **O-F**, **O-G** et **O-H**, Otto et al. ont montré qu'il était possible de générer une chimiothèque à pH = 8 en présence d'air comprenant 45 espèces cycliques issues de la formation de ponts disulfures entre les briques de départ. En l'absence de template, deux macrocycles majoritaires ont pu être identifiés dans la chimiothèque A (figure 12) : un homodimère **O-H<sub>2</sub>** et un **O-FGH** hétérotrimère.<sup>26</sup> L'utilisation de l'iodure de 2-méthylisoquinolinium **O-I** comme template permet l'amplification d'un hétérotrimère **O-F<sub>2</sub>G** (chimiothèque B, figure 12) qui était minoritaire dans la bibliothèque initiale. L'utilisation d'un autre template, la morphine N-méthyle **O-J** conduit à l'amplification d'un homotrimère **O-F<sub>3</sub>** (chimiothèque C, figure 12) lui aussi minoritaire dans la bibliothèque sans template. Il est possible d'isoler ces macrocycles par HPLC préparative avec d'excellents rendements de 65 et 95 %.

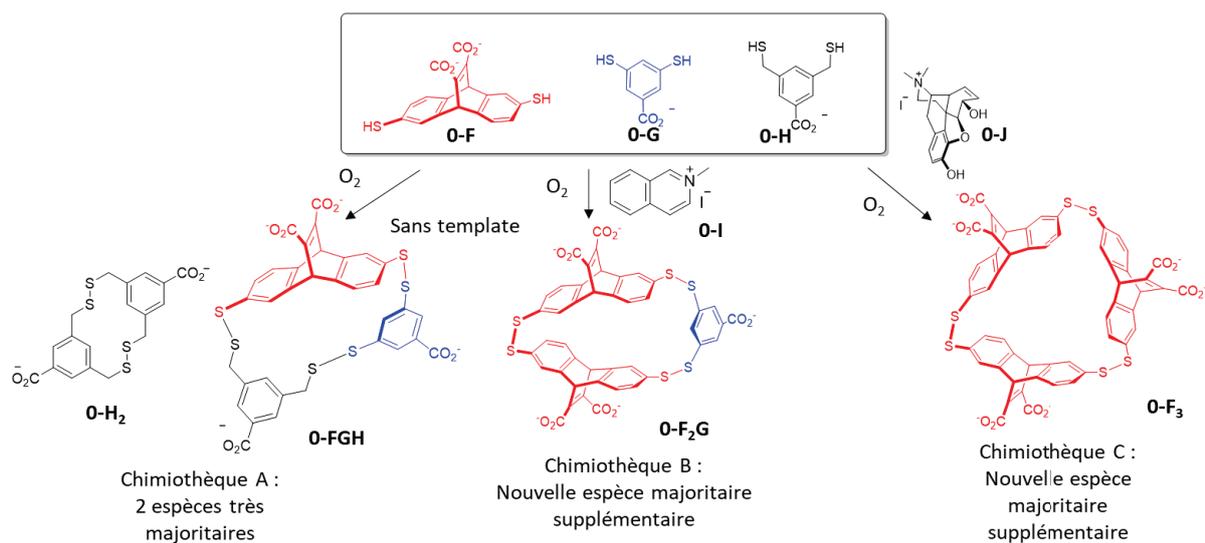


Figure 12 : Macrocycles majoritaires issus des chimiothèques étudiées par Otto et al selon le template employé.

De plus, Waters et al. ont montré que le macrocycle **O-F<sub>2</sub>G** est un récepteur capable de mimer la sélectivité de la protéine chromodomain HP 1 avec la triméthyl lysine par rapport à ses homologues moins méthylés (figure 13).<sup>27</sup>

Enfin, certains Otto et coll. ont montré que des différences sur le choix de la fonction chimique sur un dithiophénol aromatique pouvait mener à une forte divergence dans la composition des chimiothèques (figure 14).<sup>28</sup>

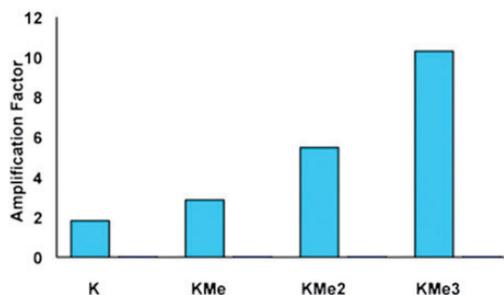
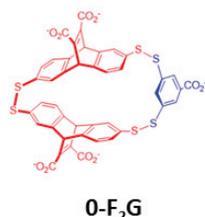
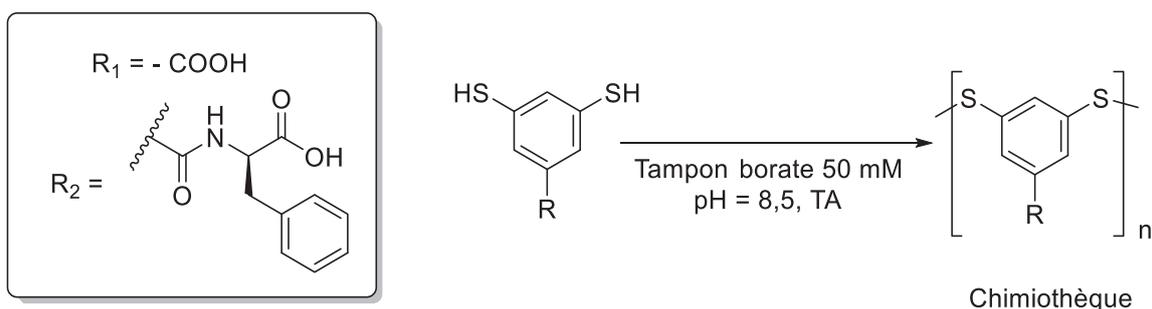


Figure 13 : Amplification obtenue pour la formation du macrocycle **I-F<sub>2</sub>G** par HPLC par Waters avec le template K et ses analogues poly-méthylés.



Entrée	Groupement R	Template	Macrocycle(s) identifié(s) dans la chimiothèque : valeur de n
1	R = R <sub>1</sub>	Pas de template	3 et 4
2	R = R <sub>2</sub>	Pas de template	3 à 15
3	R = R <sub>2</sub>	Hexane-1,6-diamine	6

Figure 14 : Macrocyclus générés dans différentes chimiothèques à partir de brique 1,3-dithiophénols substitués

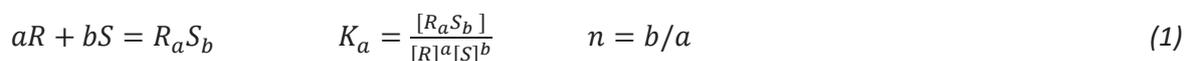
Lorsque R est un substituant de type acide carboxylique (figure 14, entrée 1) deux espèces majoritaires sont observées : un trimère et un tétramère cycliques. La formation de macrocycles de tailles supérieures étant probablement entropiquement défavorisée. Cependant, dans les mêmes conditions, la présence d'un substituant de nature et de taille différentes (même s'il reste anionique) conduit à la formation de tous les macrocycles de la taille 3 à la taille 15 inclus (figure 14, entrée 2). Cette diversité peut être drastiquement réduite vers une amplification exclusive d'un macrocycle à 6 chaînons (90% de la chimiothèque) avec l'utilisation de l'hexane-1,6-diamine comme *template* (figure 14, entrée 3).

Nous avons donc choisi l'utilisation de la chimie combinatoire dynamique mettant en jeu la formation de ponts disulfures à partir de briques thiophénols afin d'accéder à de nouveaux hôtes moléculaires pour des molécules invités d'intérêt biologique. Nous allons maintenant nous focaliser sur les méthodes d'analyse disponibles pour étudier les interactions au sein d'une supramolécule.

## II) Analyse énergétique de supramolécules

### 1) Définitions

La complexation d'un hôte (ou récepteur, noté R par la suite) avec un invité (ou substrat, noté S par la suite) est caractérisée par une constante d'association appelée  $K_a$  (équation 1). Pour simplifier l'équation utilisée, les coefficients d'activités sont approximés à 1 et  $C^\circ = 1 \text{ M}^{-1}$ . a et b représentent les coefficients stœchiométriques.



Plus la constante d'association est élevée, plus l'équilibre est déplacé en faveur de la supramolécule : la comparaison des constantes d'association permet d'évaluer une sélectivité d'un récepteur vis-à-vis d'un substrat par rapport à un autre. Sur l'exemple de la valinomycine évoqué précédemment, la constante d'association avec le potassium est de l'ordre de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  alors qu'avec le sodium elle est de  $10 \text{ M}^{-1}$ . Il y a donc une sélectivité du récepteur pour le potassium, ce qui entraîne un rôle particulier de la valinomycine pour transporter les ions potassium à travers les membranes.<sup>6</sup>

La stœchiométrie n est un paramètre tout aussi important à déterminer pour décrire la structure lors de l'association. Dans le cas d'une association entre un substrat et un récepteur, on parle d'association 1:1 ( $n = 1$ ) et la constante d'association s'exprime en  $\text{L.mol}^{-1}$  que l'on notera  $\text{M}^{-1}$  par la suite ; dans le cas d'une association entre deux substrats et un récepteur, on parlera d'association 1:2 ( $n = 2$ ) et la constante  $K_a$  sera en  $\text{M}^{-2}$  et enfin dans le cas d'un cas d'une association entre un substrat et deux récepteurs, on parlera d'association 2:1 ( $n = 0,5$ ) et la constante d'association s'exprimera en  $\text{M}^{-2}$ .

### 2) Outils analytiques

#### A) Généralités

De manière à déterminer les constantes d'association des macromolécules et évaluer les grandeurs présentées précédemment, plusieurs outils analytiques sont accessibles :

- *La résonance magnétique nucléaire (RMN)* : une analyse comparative de spectre RMN des formes libres et liés permet, par analyse de la variation des déplacements chimiques, une étude préliminaire de la complexation au sein la supramolécule. Une titration en RMN peut permettre, après modélisation de la variation du déplacement chimique des signaux des protons portés par le titré en fonction du ratio titré-titrant, l'accès à la constante d'équilibre et à la stœchiométrie. Remarque : il est aussi possible d'effectuer des titrations en fluorescence pour obtenir ces paramètres.
- *La titration calorimétrique isotherme (ITC)* : Cette technique permet l'obtention de la constante de réaction, de la stœchiométrie ainsi que des entropies et enthalpies de réaction.

L'analyse par ITC est la méthode la plus efficace pour obtenir la totalité des paramètres thermodynamiques utiles à l'étude de la formation de la supramolécule. Nous allons détailler cette technique.

#### B) Obtention de données thermodynamiques par ITC

Une expérience d'ITC permet l'étude de l'interaction d'un ligand avec un hôte dans le but de déterminer l'enthalpie de la réaction ( $\Delta H$ ), ainsi que la constante d'association ( $K_a$ ) et la stœchiométrie de la réaction ( $n$ ). On peut en déduire l'entropie de la réaction ( $\Delta S$ ) à l'aide de l'équation de Gibbs.

Généralement, l'invité, contenu dans une seringue, est titré dans une solution d'hôte présent dans une cellule adiabatique (figure 15a). L'expérience est réalisée à température constante et consiste à effectuer des micro-ajouts de solution d'invité dans la cellule. Ainsi, la chaleur dégagée par l'association est mesurée par rapport à une cellule de référence remplie de solution tampon. La différence de chaleur est exprimée comme la puissance électrique requise pour maintenir une température constante entre la cellule de travail et la cellule de référence. Quand la cavité de l'hôte est saturée par le ligand, le signal de chaleur diminue et il ne reste plus que la chaleur de dilution. À l'issue de l'expérience, on obtient le thermogramme présenté ci-dessus en figure 15b. L'intégration de l'aire sous chacun des pics du profil B permet l'obtention du profil C, après correction des données énergétiques obtenues par soustraction de la contribution de la dilution du ligand (figure 15c). La différence énergétique entre les dégagements de chaleur initiaux et finaux permet l'accès à la variation d'enthalpie de réaction. Le point d'inflexion informe sur la stœchiométrie entre l'invité et l'hôte et enfin la pente de la sigmoïde donne la valeur de la constante  $K_a$ . L'entropie de réaction s'obtient à l'aide de  $K_a$  et de  $\Delta H$ . Le domaine des constantes d'association mesurable par ITC est compris entre  $10^2$  et  $10^8$ .<sup>29</sup>

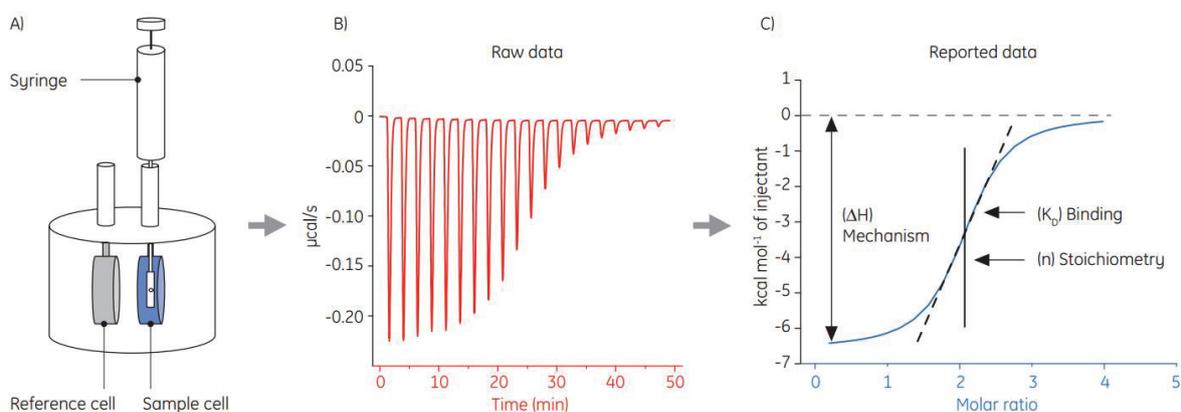


Figure 15 : principe de l'ITC. A) Schéma de l'appareil, B) Chromatogramme représentant les dégagements de chaleur en fonction du temps C) Chromatogramme représentant les dégagements de chaleur d'injectant en fonction du nombre d'équivalents.

Ainsi, la validité des grandeurs thermodynamiques obtenues dépend de l'allure de la courbe. Il est nécessaire de respecter plusieurs critères lors de l'obtention de la sigmoïde :

- Avoir des dégagements de chaleur significatifs malgré la soustraction de la dilution
- Avoir un nombre de points satisfaisant définissant la pente de la sigmoïde
- Avoir des plateaux bien défini pour obtenir les extrêmes de la sigmoïde

Pour respecter le premier point, on peut définir la quantité de chaleur par injection  $Q_{inj}$ , dépendant de la concentration en invité, du volume d'injection  $V_{inj}$  et l'enthalpie de réaction  $\Delta H$  (équation 2). Il est décrit que des chaleurs dégagées par pic de l'ordre de 5000  $\mu\text{cal}$  sont trop important et que des pics inférieurs à 10  $\mu\text{cal}$  sont trop faibles pour être intégrés.<sup>29</sup> Il est nécessaire de réguler concentration et volume d'injection pour avoir ainsi des valeurs significatives et acceptables.

$$Q_{inj} = [\text{Titrant}] \times \Delta H \times V_{inj} \quad (2)$$

Pour respecter les deux autres points, un paramètre appelé la facteur « c » a été défini par Wiseman et Turbull (équation 3).<sup>30</sup> Ce paramètre est défini selon l'équation suivante, comme le produit de la concentration en hôte, par la stœchiométrie et la constante d'association.

$$c = [\text{Titré}] \times n \times K_a \quad (3)$$

Diverses études ont montré qu'un paramètre c supérieur à 10 était nécessaire pour avoir une sigmoïde (sinon, on obtient une simple pente sans réel plateau défini) et inférieur à 500 pour ne pas avoir deux plateaux séparés par une délimitation horizontale.<sup>30</sup> Pour c inférieur à 10, on ne peut pas définir un point d'inflexion. Les situations optimales sont généralement données pour c proche de 100 (figure 16).

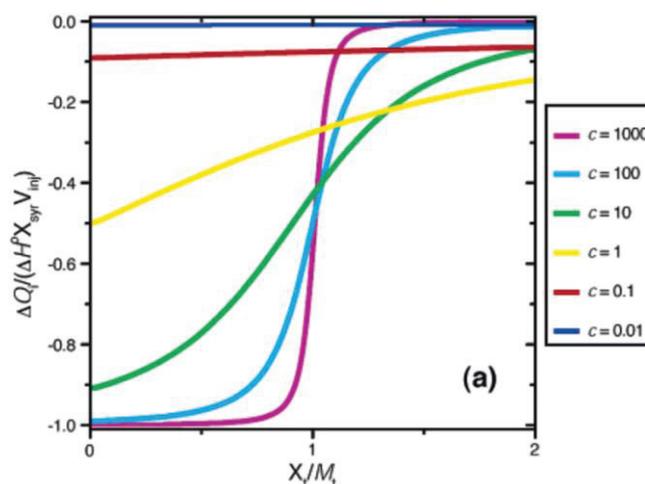


Figure 16 : Allure des différentes sigmoïdes en fonction de la valeur de c

Pour améliorer une sigmoïde, plusieurs alternatives sont possibles :

- Modifier la concentration en hôte : un facteur  $c < 10$  doit être corrigé en concentrant les solutions de travail, un facteur  $c > 1000$  est corrigé en diluant les solutions de travail.
- Faire des expériences de mesure indirecte : la constante mesurée est trop élevée (supérieure à  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ), on doit ainsi pré-complexer l'hôte avec un invité moins affiné et mesurer la constante d'association lors de la substitution par un ligand plus affiné<sup>31</sup>.
- Travailler à faible valeur de facteur c, mais imposer la valeur de la stœchiométrie. Dans ce cas, on obtient généralement des demi-sigmoïdes. Les données sur ces types d'expérience sont à consolider par d'autre méthode.

Enfin, une précision sur les concentrations de travail est nécessaire. Généralement, une erreur sur la concentration en hôte fausse la valeur de n, une erreur sur la concentration en invité fausse la valeur de  $\Delta H$ . Les grandeurs énergétiques sont généralement validées après une série de triplicata. Malgré toutes ces contraintes, les mesures par ITC sont très complètes et l'ITC est une méthode de choix pour la compréhension des phénomènes d'association en chimie supramoléculaire.

### III) Objectifs

L'objectif principal de ce manuscrit sera donc d'effectuer de nouvelles avancées dans le domaine de la chimie supramoléculaire, en exploitant la chimie combinatoire dynamique avec des briques soufrées de manière à former de nouveaux récepteurs moléculaires. Ces récepteurs seront

identifiés, et si possible isolés et analysés structurellement, dans le but d'anticiper les interactions « hôte-invité » avec des ligands. Nous porterons un intérêt particulier à la reconnaissance de molécules d'intérêt biologique. Différents liens ou motifs seront synthétisés sur ces divers hôtes (figure 17).

Ainsi, dans un premier chapitre, nous aborderons la synthèse d'une nouvelle famille de récepteurs fonctionnalisés appelés dyn[n]arènes présentant des liens disulfures, capables d'effectuer de la reconnaissance de cations en solution aqueuse. Un dyn[n]arène particulier, présentant des fonctions carboxylates, s'est distingué par des constantes d'affinité remarquables avec des polyamines mesurées par la technique ITC. Ainsi, un panel d'expérience sur des cellules cancéreuses a été mis en place afin de montrer un effet thérapeutique par l'action du macrocyle sur ces cellules cancéreuses. Dans les chapitres suivants, la formation des liens carbone-soufre ont été étudié en remplacement des liens disulfures des dyn[n]arènes pour rendre ces objets moléculaires plus robustes en solution aqueuse ou *in cellulo*. Dans le second chapitre, le processus d'extrusion de soufre sera étudié de manière à l'appliquer à la synthèse de nouveau macrocyle présentant des liens thioéthers. Dans le troisième chapitre, une réaction à trois composantes sera étudiée, mettant en jeu l'attaque conjointe du soufre nucléophile et de l'azote nucléophile sur un aldéhyde électrophile de manière à former des liens de type dithiocine.

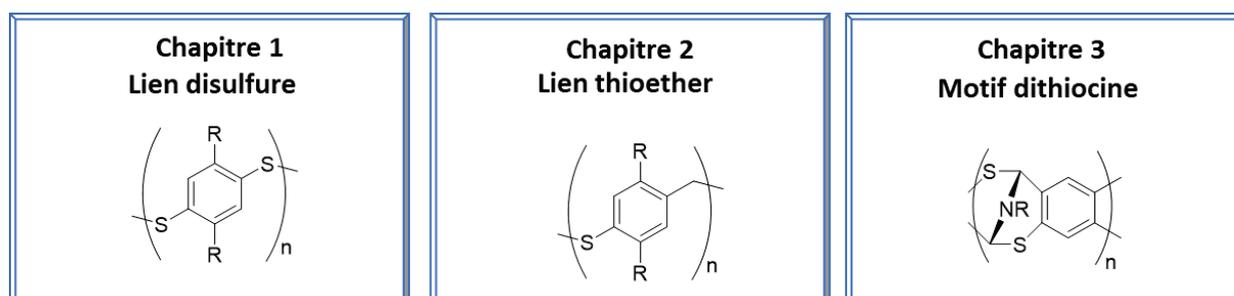


Figure 17 : Trois grands axes du manuscrit



**CHAPITRE 1 : Les dynarènes polycarboxylates :  
hôtes supramoléculaires pour des invités  
d'intérêt biologique**

**Objectif :** Dans ce chapitre, nous allons décrire une famille de récepteurs appelés dyn[n]arènes et explorer les propriétés complexantes de ces macrocycles. Une première étude s'intéressera à l'analyse de supramolécules formées entre les dynarènes et des ligands d'intérêts biologiques par analyse des forces motrices de leur stabilité en solution aqueuse. Enfin, une seconde étude sera effectuée *in cellulo* afin d'identifier de potentielles applications thérapeutiques par complexation. (figure 18)

**Réalisation :** L'approche chimie combinatoire dynamique est ici illustrée pour décrire la synthèse de dynarènes. Une série d'études en LC/MS ont permis de révéler les *templates* menant à l'expression de dyn[n]arènes de différentes tailles. Des analyses physico-chimiques (titrage pH-métrique, cristallographique) ont ensuite permis une caractérisation structurale complète des macrocycles. Par ailleurs, les outils analytiques (RMN et ITC) ont été utilisés pour étudier leurs propriétés de reconnaissance : des constantes d'association allant jusqu'à  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  ont été mesurées avec des polyamines d'intérêt biologique, témoignant de l'affinité et de la sélectivité des dynarènes pour certains ligands d'intérêt biologique. L'utilisation de métaux, dans le but de déformer la cavité du macrocycle et d'induire des variations de sélectivité, a été étudiée, conduisant à des résultats tant positifs que négatifs sur leurs actions. Enfin, l'étude a été étendue *in cellulo*, où un effet cytostatique anti-prolifératif transitoire du dyn[4]arène polycarboxylate sur les cellules cancéreuses a été identifié. La synthèse et l'utilisation de fluorophore a permis de prouver l'internalisation dans des cellules. Nous avons finalement tenté de comprendre l'origine de cet effet anti-prolifératif ainsi que son caractère transitoire.

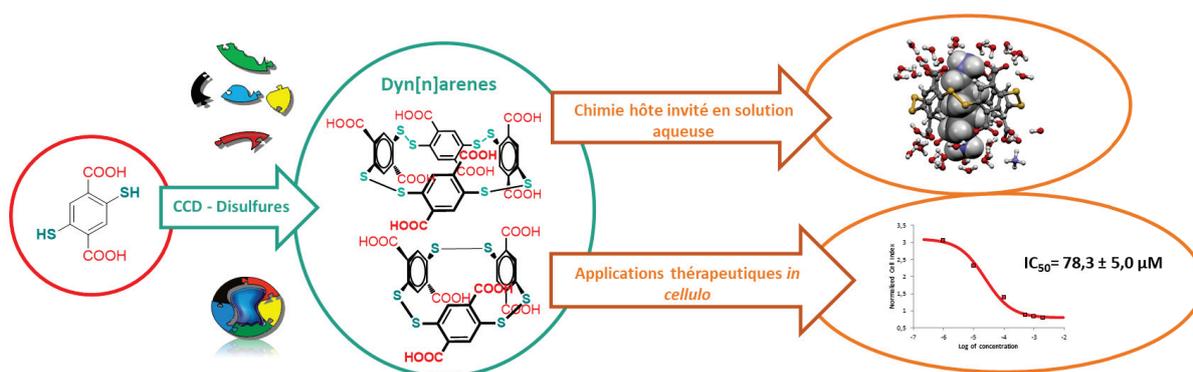


Figure 18 : Schéma bilan du chapitre 1.

## Partie A : Etude bibliographique – la reconnaissance moléculaire de cations en solution aqueuse et ses applications au sein des cellules

Parmi les nombreux hôtes supramoléculaires décrits dans la littérature, seuls quelques-uns sont hydrosolubles (figure 19) : les cyclodextrines et les cucurbiturils (intrinsèquement) ainsi que les pillararènes et les calixarènes (après introduction de groupements hydrosolubles). Nous avons sélectionné uniquement les hôtes capables d'effectuer de la reconnaissance de cations en solution aqueuse : ces hôtes font partie de la famille des cavitands capable d'effectuer de la reconnaissance moléculaire au sein de leur cavité. Nous allons dans un premier temps montrer les similitudes structurales de ces hôtes, puis présenter une étude physico-chimique des interactions hôte-invité vis-à-vis de cations en solution aqueuse. Ensuite, nous présenterons les hôtes supramoléculaires utilisés au sein des cellules et les applications potentielles.

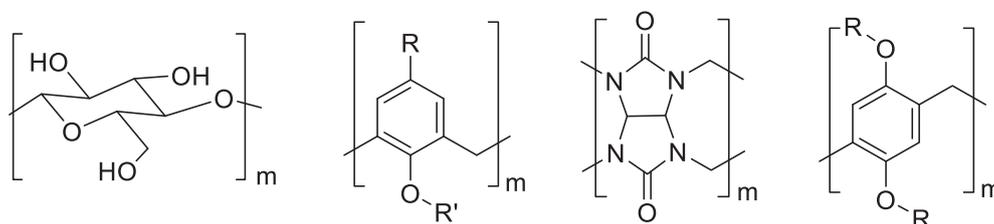


Figure 19 : structures générales des familles de récepteurs hydrosolubles : cyclodextrines, calixarènes, cucurbiturils et pillararènes (de gauche à droite).

### I) Présentation des hôtes supramoléculaires hydrosolubles capables d'effectuer de la reconnaissance de cation

#### 1) Description des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des polysaccharides cycliques composés de 6 ( $\alpha$ -cyclodextrines), 7 ( $\beta$ -cyclodextrines) ou 8 ( $\gamma$ -cyclodextrines) unités 1,4-D-glycopyranoses, reliées par des liens glycosidiques, obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon à l'échelle industrielle.

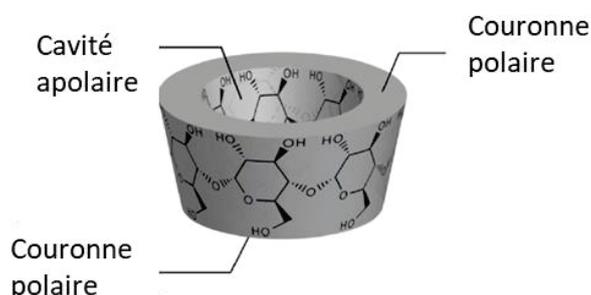


Figure 20 : Analyse structurale des cyclodextrines<sup>32</sup>

La cavité de l' $\alpha$ -cyclodextrine en figure 20 présente une géométrie conique, avec la présence de couronnes polaires regroupant des alcools primaires d'une part et des alcools secondaires d'autres part.<sup>33</sup> La cavité est hydrophobe et les diamètres de cavité accessibles sont de 5.7 Å pour l' $\alpha$ -

cyclodextrine à 9.5 Å pour la  $\gamma$ -cyclodextrine.<sup>32</sup> Ces macrocycles sont décrits comme de meilleurs récepteurs à anion qu'à cation. Des dérivés fonctionnalisés ont été synthétisés pour améliorer la reconnaissance des cations : on peut citer des constantes comprises entre  $10^3$  et  $10^5$  M<sup>-1</sup> pour la reconnaissance de dérivés fonctionnalisés des adamantanes par diverses cyclodextrines.<sup>34</sup>

## 2) Description des calixarènes

Les calix[n]arènes sont des macrocycles issus de la réaction entre le tert-butylphénol et le formaldéhyde. Le nombre d'unités aromatiques n est compris entre 4 et 9. Ils présentent aussi une structure conique. Le diamètre de la couronne formée par les unités phénoliques est de l'ordre de 2 Å pour le tertbutyl-calix[4]arène, permettant la complexation de petit cation alcalins sur leur couronne inférieure. Intrinsèquement, ces hôtes ne sont pas hydrosolubles : des post-fonctionnalisations ont été ainsi décrites dans la littérature. Ainsi, les calixarènes fonctionnalisés par des acides carboxyliques **I-A** ou des sulfates **I-B** sur la couronne inférieure ou supérieure sont décrits comme étant hydrosolubles (figure 21). De façon similaire aux cyclodextrines, ces macrocycles présentent des couronnes de fonctions polaires et une cavité apolaire et sont capables de complexer des cations inorganiques, mais aussi des cations organiques comme des ammoniums ou des dérivés d'acides aminés.<sup>35</sup> Ainsi, le calix[4]arène sulfonaté **I-B** a été recensé comme un excellent complexant de la phénylalanine avec une constante d'association de  $6,27 \cdot 10^5$  M<sup>-1</sup>.<sup>36</sup>

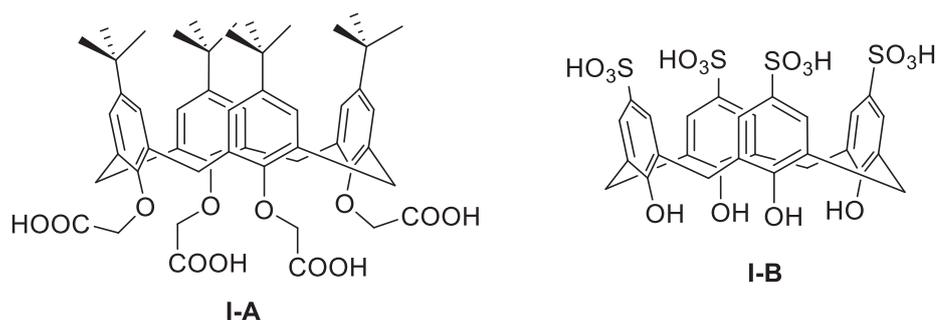


Figure 21 : Calixarènes hydrosolubles **I-A** et **I-B** fonctionnalisés pour la reconnaissance de cations.

## 3) Description des pillararènes

Les pillar[n]arènes sont des macrocycles apparentés aux calixarènes. Ils sont constitués d'unités hydroquinones espacées par un bras méthylénique, possédant ainsi une cavité en forme de prisme. A nouveau, il est possible d'identifier une cavité apolaire avec des couronnes polaires aux entrées.<sup>37</sup> Intrinsèquement, ces objets ne sont pas hydrosolubles et nécessitent une post-fonctionnalisation pour améliorer les propriétés des solubilités en solution aqueuse. Les récepteurs hydrosolubles anioniques à pH physiologique sont capables d'effectuer de la reconnaissance de cation. Le pillararène carboxylate **I-C** (figure 22) est capable de reconnaître des acides aminés ou encore des polyamines comme la spermine ( $K_a = 2,58 \cdot 10^7$  M<sup>-1</sup>). Le dérivé phosphate **I-D** est capable de reconnaître des sels d'ammonium organiques avec des constantes d'association allant jusqu'à  $10^5$  M<sup>-1</sup>.<sup>38,39</sup>

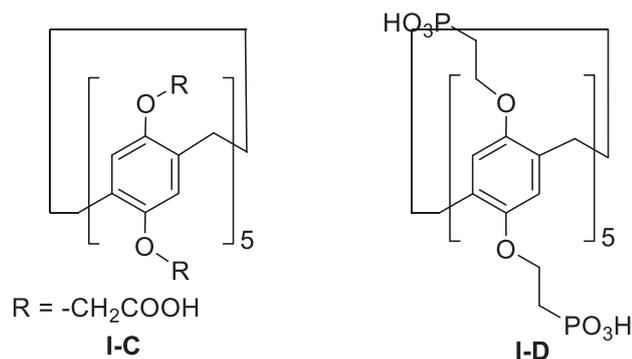


Figure 22 : Pillar[5]arènes hydrosolubles pour la reconnaissance de cations.

#### 4) Description des cucurbiturils

Les cucurbiturils sont des macrocycles issus de la condensation entre des unités glycolurils avec le formaldéhyde. La nomenclature de ces macrocycles est CB[n] avec n, le nombre de monomère compris entre 5 et 8 généralement et présentent une cavité ovoïde. Comme le montre la carte de l'énergie potentielle à la figure 23, les fonctions carbonyles forment des couronnes polaires et hydrophiles électroniquement enrichies avec une cavité hydrophobe.<sup>40</sup> Les unités glycolurils sont appauvries en électron. Les diamètres de cavité vont de 4.4 Å pour CB[5] à 12.4 Å pour CB[8].

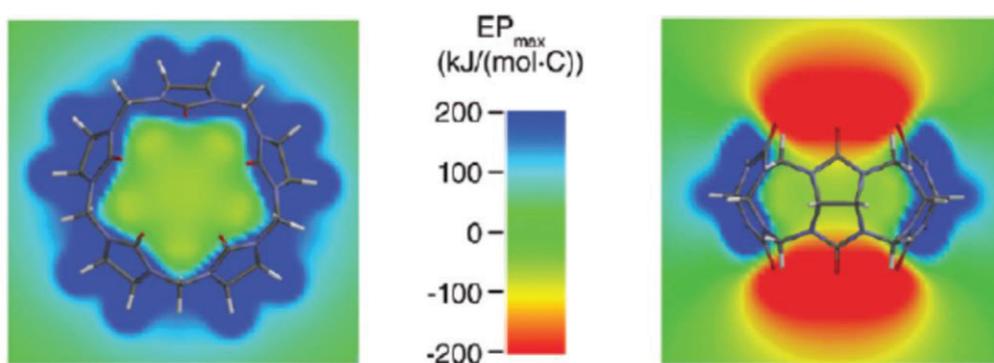


Figure 23 : Analyse du potentiel électrostatique des cucurbiturils sur l'exemple du CB[5]

Les cations métalliques, les ammoniums organiques ou encore les imidazoliums sont identifiés dans la littérature comme d'excellents ligands de ces récepteurs. Ces récepteurs sont remarquablement performant dans les processus de reconnaissance : CB[7] interagit avec les dérivés de l'adamantane fonctionnalisés par des ammoniums avec des constantes d'association allant jusqu'à  $7,2 \cdot 10^{17} \text{ M}^{-1}$ , ce qui est l'une des plus grandes constantes d'association décrites en solution aqueuse en ce jour avec un hôte synthétique (figure 24).<sup>41,42</sup>

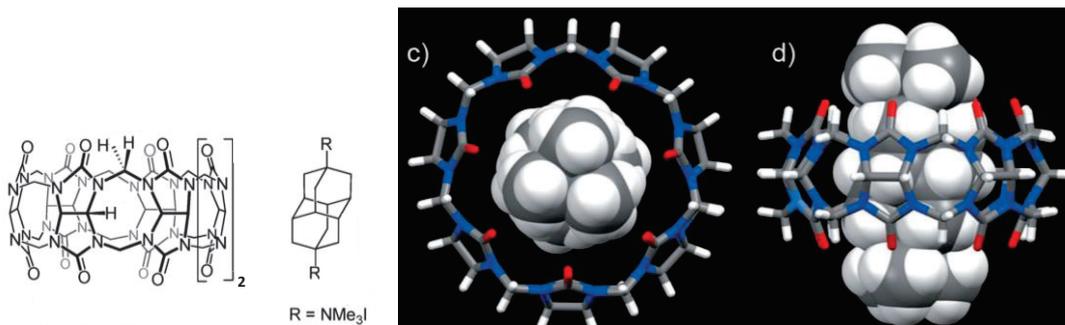


Figure 24 : Complexe CB[7]-diammonium adamantane.

Ces quatre familles de récepteurs présentent donc des similitudes dans leurs structures : leurs régions polaires permettent la solubilité dans l'eau et la cavité apolaire permet de reconnaître des composés organiques. Nous allons ainsi aborder les caractéristiques de la reconnaissance en solution aqueuse.

## II) Thermodynamique de la reconnaissance en solution aqueuse

L'exploration des forces motrices dirigeant l'association entre un hôte et un invité est très importante dans les domaines pharmaceutiques ou encore la protéomique. Les problèmes auxquels font face les chercheurs travaillant dans la conception de médicament concernent les différences entre les modes de liaison du système médicament-récepteur qui diffèrent de l'attente théorique. Généralement, ces problèmes sont liés à la non prise en compte des effets de solvant ou alors liés au manque de compréhension de la flexibilité conformationnelle que peut acquérir le récepteur (souvent, une protéine). Une étude physico-chimique est ainsi requise pour comprendre ces processus.

### 1) Thermodynamique de l'association hôte-invité

Tout événement de complexation entre un hôte et un invité possède un moteur énergétique qu'il est nécessaire d'identifier dans le but de comprendre l'origine de l'association. On peut donc généraliser tout événement de complexation à la décomposition suivante par un cycle thermodynamique fictif prenant en compte le solvant, c'est-à-dire l'eau (figure 25).

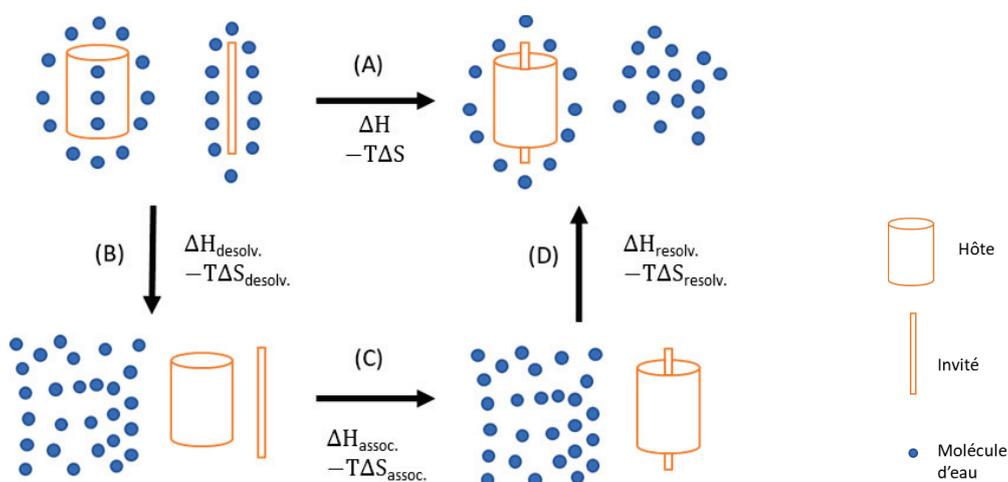


Figure 25 : décomposition en étapes élémentaires fictives du processus de formation d'une supramolécule en solution

La réaction de complexation (étape A) peut ainsi être décomposée en trois étapes élémentaires fictives : d'abord une étape de désolvatation de l'hôte et de l'invité (étape B), ensuite intervient une étape d'association en phase gazeuse (étape C) et enfin une étape de resolvatation du complexe hôte-invité (étape D). La constante d'association K est un paramètre-clef quantifiant la stabilité de la supramolécule formée, mais l'analyse des paramètres thermodynamiques  $\Delta H$  et  $\Delta S$  permet de comprendre la force motrice de l'association. La loi de Hess permet donc d'effectuer une décomposition de l'enthalpie (équation 4) et l'entropie de l'association (équation 5).

$$\Delta H = \Delta H_{\text{desolv.}} + \Delta H_{\text{assoc.}} + \Delta H_{\text{resolv.}} \quad (4)$$

$$-T\Delta S = (-T\Delta S_{\text{desolv.}}) + (-T\Delta S_{\text{assoc.}}) + (-T\Delta S_{\text{resolv.}}) \quad (5)$$

L'ITC donnant accès à l'entropie et l'enthalpie du processus global A, on peut expérimentalement savoir lequel de ces deux termes guide la complexation. Cependant, plusieurs modèles proposent des compléments d'interprétations sur les termes issus de la décomposition énergétique (généralement par spectrométrie de masse ou par calculs théoriques). Nous allons voir quels sont les principaux modèles de complexation permettant une analyse fine de l'entropie et l'enthalpie de réaction.

## 2) Analyse en phase gaz de la complexation

L'analyse en phase gaz permet d'obtenir des informations sur les termes  $\Delta H_{\text{assoc.}}$  et  $\Delta S_{\text{assoc.}}$ .

### A) Présentation du modèle « clé-serrure » : analyse de l'enthalpie

En 1894, Emil Fischer propose un modèle selon lequel l'association entre une enzyme et un substrat doit se faire selon une complémentarité structurelle géométrique et électronique.<sup>43</sup> Ce modèle est appelé « clé – serrure » (ou Lock-and-key) (figure 26). Ce modèle repose principalement sur une maximisation des interactions intermoléculaires entre hôte et invité (complémentarité de structure électronique), et sur une minimisation de la surface accessible au solvant (complémentarité de géométrie).

Un modèle additionnel a par la suite été introduit par Koshland en 1958, reflétant le caractère flexible des enzymes d'un point de vue conformationnel.<sup>44</sup> Il s'agit du modèle d'ajustement induit selon lequel la déformation d'une enzyme (donc d'un hôte) est possible de manière à obtenir un complexe hôte-invité avec complémentarité de géométrie et de structure électronique. Cette déformation de la structure ajoute donc une pénalité entropique aux contributions énergétiques. Il s'agit des bases du principe de reconnaissance moléculaire et décrivent principalement une phase d'association sans prise en compte de solvant : ainsi, ce modèle permet d'évaluer l'enthalpie et l'entropie de l'étape C de la décomposition effectuée à la figure 25.

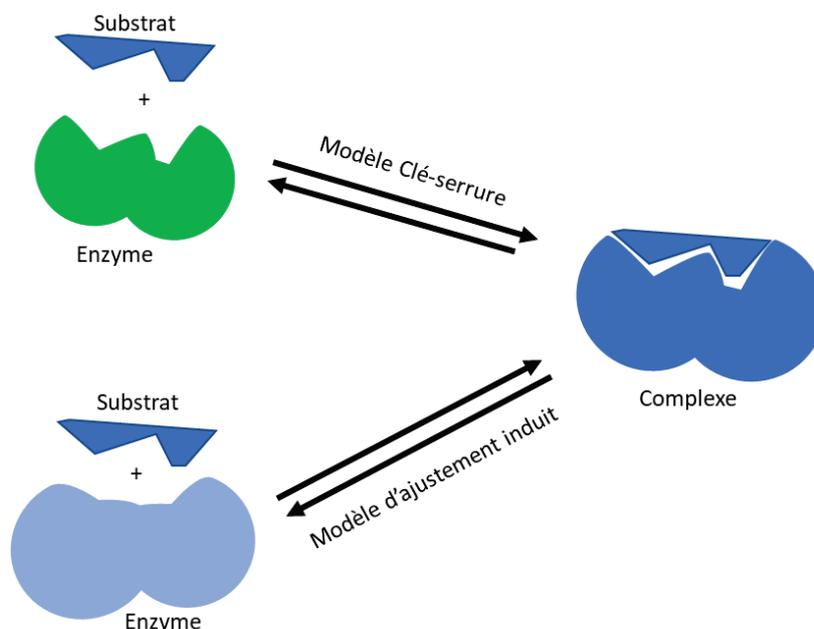


Figure 26 : Présentation des modèles clé-serrure et d'ajustement induit

Ainsi, l'adamantane, structure très apolaire tend à maximiser les forces de dispersion avec son partenaire lorsqu'il se trouve au sein d'une cavité hydrophobe. Ceci est un premier argument à sa forte affinité avec CB[7] (figure 24). Cependant, ce modèle ne prend pas en compte la totalité des contributions entropiques, notamment en lien avec les modifications des degrés de liberté des partenaires de complexation.

### B) Modifications des degrés de liberté : analyse entropique

Des pénalités entropiques peuvent survenir au cours de l'association due à la modification des degrés de liberté des molécules considérées. En effet, les partenaires de l'association présentent différents degrés de liberté internes et externes. Une molécule non linéaire possédant  $N$  atomes présente  $3N$  degrés de liberté, où l'on distingue les degrés de liberté externes au nombre de 6 correspondant aux translations et aux rotations, ainsi que les degrés de liberté internes au nombre de  $3N-6$ , correspondant aux vibrations. Ainsi, il faut analyser, dans l'étape C de la figure 24 les modifications des degrés de liberté par passage des formes libres aux formes liées.

Plus le nombre d'interactions intermoléculaire sera élevé entre l'hôte et l'invité, plus les degrés de liberté des différents partenaires seront modifiés et les espèces moins mobiles. Des restrictions conformationnelles sont aussi à considérer pour le macrocycle. Ainsi, un système dans lequel l'enthalpie  $\Delta H_{\text{assoc}}$  serait élevée grâce à de multiples interactions subirait une augmentation du terme  $-T\Delta S_{\text{assoc}}$  dû à la diminution des degrés de liberté et aux restrictions conformationnelles. Ce phénomène est appelé compensation entropie-enthalpie.<sup>45,46</sup> Les énergies liées aux degrés de liberté externes sont des pénalités énergétiques très élevées. La perte des degrés de liberté translationnel peut atteindre  $150 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  et ceux rotationnels peut s'élever jusqu'à  $20 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .<sup>47</sup> Les degrés de liberté vibrationnels sont d'ordres moins élevés, mais sont parfois responsables de sélectivité. Un cas particulier est à souligner : la formation de pont salin est en général entropiquement favorisée (par éjection des contre-ions), et est plus tolérante vis-à-vis d'un manque de pré-organisation du système

par rapport aux autres forces intermoléculaires en solution aqueuse. Une énergie globale de 5 à 8  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  est associée à la formation d'une paire d'ions.<sup>47</sup>

En solution aqueuse, on peut s'attendre à une atténuation de ces interactions due à la solvatation. Cependant, en réalité, pour des interactions ammonium-carboxylate, Dougherty et coll. ont montré que la solvatation vient stabiliser l'interaction électrostatique entre les partenaires quand le système est pré-organisé.<sup>47-48</sup> Ainsi, il semblerait que ces considérations doivent nécessairement s'accompagner du rôle crucial d'un partenaire négligé jusqu'ici dans les modèles précédents : le solvant. Cependant, la force des interactions électrostatiques résultante dans l'eau peuvent parfois diminuer de deux ordres de grandeur par rapport au cas en phase gaz et pourtant, des constantes excellentes sont quand même observées.<sup>49</sup> Il faut donc prendre en compte les interactions invité – solvant, hôte – solvant et solvant – solvant en plus des interactions hôte-invité pour être complet. Nous allons aborder les principales contributions du solvant lors du processus de complexation.

### 3) Influence du solvant sur la complexation

L'influence du solvant permet d'obtenir des informations sur les termes  $\Delta H_{\text{solv}}$ ,  $\Delta S_{\text{solv}}$ ,  $\Delta H_{\text{desolv}}$  et  $\Delta S_{\text{desolv}}$ . Une des principales explications qui permet de comprendre les processus de complexation sont les effets hydrophobes. Deux effets hydrophobes sont généralement décrits dans la littérature : ce sont les effets hydrophobes « classiques » et « non-classiques ».<sup>50</sup>

#### A) Effet hydrophobe classique

L'effet hydrophobe dit « classique » correspond à un gain entropique par assemblage de molécules hydrophobes (ou présentant des parties hydrophobes) permettant le relâchement de plusieurs molécules d'eau dans la sphère de solvatation. Cette interaction intermoléculaire contribue donc à un gain entropique ( $\Delta S > 0$ ).<sup>50</sup> En effet, en solution aqueuse, un substrat hydrophobe casse le réseau de liaison hydrogène de l'eau, créant ainsi une couche de molécules d'eau plus ordonnées et peu mobiles appelées clathrates autour du substrat (figure 27).<sup>51</sup> Dès lors que les composés hydrophobes vont s'assembler entre eux, les molécules d'eau relâchées seront plus mobiles ce qui explique le gain entropique.

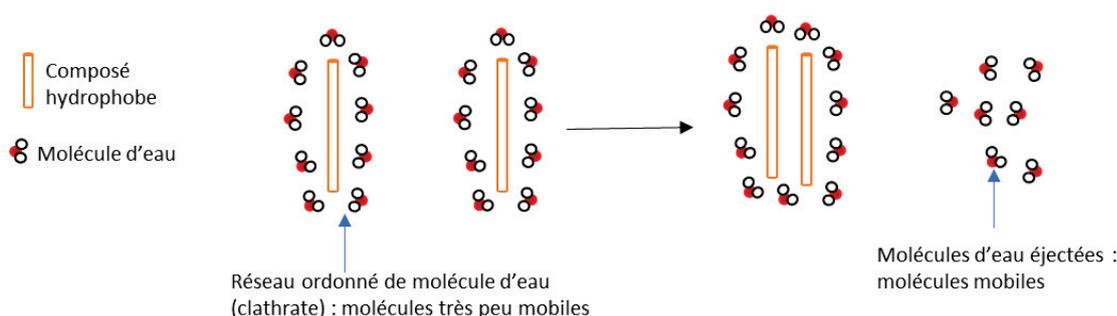


Figure 27 : Schématisation de l'effet hydrophobe classique

#### B) Effets hydrophobes non classiques : rôle de la cavité

L'effet hydrophobe « non classique » correspond à un gain enthalpique dû à l'expulsion d'une ou plusieurs molécules d'eau dite de « haute énergie » d'une cavité hydrophobe. Quelques cas sont exposés en figure 28, mettant en relation l'amplitude de l'effet hydrophobe avec le nombre de molécules d'eau initialement présentes dans la cavité de l'hôte.

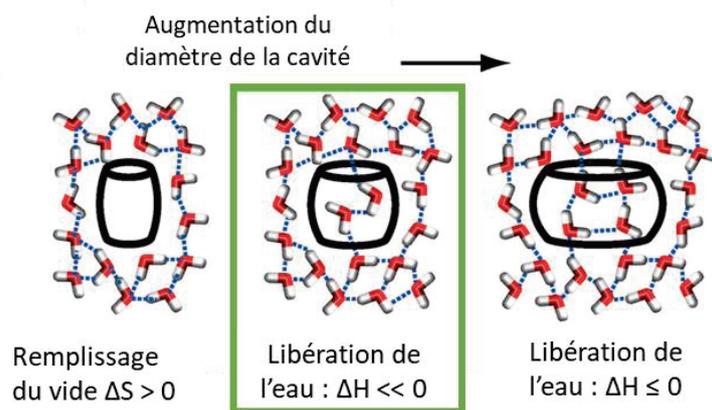


Figure 28 : effets hydrophobes selon le volume de la cavité.

Une cavité trop petite contient uniquement du vide et pas de molécule d'eau. Ainsi, un gain seul un gain entropique est observé par effet hydrophobe classique lors d'une association hors cavité.<sup>50</sup>

Quand le volume de la cavité augmente suffisamment pour accueillir quelques molécules d'eau dans la cavité, elles empêchent l'absence de matière. Seules quelques molécules d'eau peuvent créer des liaisons hydrogène avec leurs voisines de la sphère de solvation. Ces molécules d'eau sont ainsi dites de très haute énergie, car elles sont peu stabilisées dans la cavité : leur éjection dans la sphère de solvation provoquera une forte stabilisation enthalpique par formation de nouvelle liaison hydrogène. C'est ce phénomène qui est donc traduit par l'effet hydrophobe dit « non classique ».<sup>50</sup>

Cependant, si la cavité est plus grande, alors le nombre de molécules d'eau augmente. Le réseau de liaison hydrogène sera plus stable au sein de la cavité, ces molécules d'eau ne seront pas de « haute énergie » et donc la libération de ces molécules d'eau lors de la complexation engendrera une stabilité enthalpique moindre par rapport au cas intermédiaire.<sup>50</sup>

Il est aussi nécessaire d'avoir un arrangement spatial particulier des fonctions polaires de la couronne du macrocycle : en effet pour ne pas stabiliser les molécules d'eau à l'intérieur de la cavité, les fonctions polaires accepteuses ou donneuses de liaisons hydrogène capables de fonctionnaliser les récepteurs doivent être orientées de façon divergente vers l'extérieur de la cavité. C'est le cas des structures des différents cavitands présentés précédemment qui peuvent donc accumuler des molécules d'eau « de haute énergie ».

	CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]
<b>Nombre de molécules d'eau dans la cavité</b>	2	4	8	12
<b>Nombre de liaisons hydrogène moyen pour les molécules d'eau dans la cavité</b>	0	1,3	2,0	2,5
<b>Différence énergétique pour désolvater la cavité (kJ.mol<sup>-1</sup>).</b>	- 42,0	- 51,1	- 102,4	- 66,2

Tableau 2 : informations sur les molécules d'eau au sein des cavités des cucurbiturils.

Le tableau 2 présente pour les différents cucurbiturils le nombre de molécules d'eau frustrées dans leur cavité, le nombre moyen de liaisons hydrogène de ces molécules d'eau et la stabilisation énergétique induite par le départ de l'eau présente dans la cavité. Le cas le plus favorable énergétiquement est celui du CB[7], où les 8 molécules d'eau forment un réseau présentant en moyenne 2 liaisons hydrogène par molécule d'eau. Ainsi, les molécules d'eau de la cavité de CB[7] sont

les plus frustrées : il en résulte lors de l'éjection de ces molécules d'eau une stabilisation énergétique – 102,4 kJ/mol.<sup>52</sup>

La complexation comparée de CB[7] et CB[8] avec le 3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene (DBO) montre l'importance de l'expulsion des molécules d'eau dans la sphère de solvation.<sup>52</sup> En effet, alors que le **DBO** s'avère être un bon hôte pour CB[7] ( $K = 1,34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), la plus grande cavité de CB[8] permet une complexation du **DBO** en conservant 9 molécules d'eau dans la cavité formant un réseau de liaisons hydrogène (figure 29). Le manque de complémentarité entre la taille de la cavité et l'invité provoque une faible association, tout comme la présence de molécule d'eau dans la cavité malgré complexation ( $K = 16 \text{ M}^{-1}$ ).

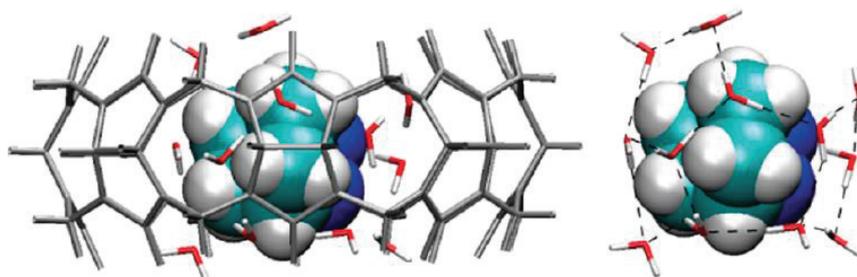


Figure 29 : modélisation du complexe CB[8] avec le **DBO** et de réseaux de molécule d'eau

Enfin, certains hôtes moléculaires cités précédemment possèdent eux aussi des molécules d'eau dans leur cavité selon leur taille ou encore leurs stéréoisomères.<sup>50</sup> Les cyclodextrines présentent cependant en général un réseau de molécule d'eau plus important et donc plus stable à l'intérieur de la cavité. Il en résulte un effet hydrophobe non classique plus faible que pour les cucurbiturils, et similaire aux cyclophanes.<sup>50</sup> Pour ce qui est des calixarènes, le calix[4]arène décrit par Hontama et al. possède une unique molécule d'eau, effectuant deux liaisons O-H--- $\pi$  avec les groupements aryles de la structure. Il s'agit de la « plus petite coupelle d'eau » décrite dans la littérature.<sup>53</sup> Ainsi, le cucurbituril se distingue des autres cavitands par des molécules d'eau de très haute énergie présentes dans la cavité : ceci est un argument supplémentaire à la forte constante d'association relevée avec le dérivé de l'adamantane. On peut noter que certaines protéines possèdent aussi des molécules d'eau dans leur cavité. C'est le cas de la tetrabrachione, protéine peu polaire de la bactérie *Staphylothermus marinus* possède 9 molécules d'eau au sein de sa cavité. Il a été montré que l'association de cette protéine avec des anhydrides carboniques est dirigée principalement par le déplacement des molécules d'eau de la cavité.<sup>54</sup>

Les effets hydrophobes ont été pris en compte précédemment en se basant uniquement sur le volume accessible de la cavité. Il faut aussi analyser les interactions du lors de la solvation et désolvation partielle des zones polaires.

### C) Application à la reconnaissance de diamines en solution aqueuse : mise en évidence de l'impact de la solvation/ désolvation des zones polaires

Une démarche d'investigation a été menée par Kim et coll. sur les cucurbiturils CB[6] et CB[7] interagissant avec différents ions  $\alpha, \omega$ -alkyldiammoniums. L'analyse en phase aqueuse et en phase gaz

dans le but de décomposer les énergies associées aux étapes élémentaires dans le processus de reconnaissance a été décrite.<sup>55</sup> Nous résumerons uniquement l'étude sur CB[6].

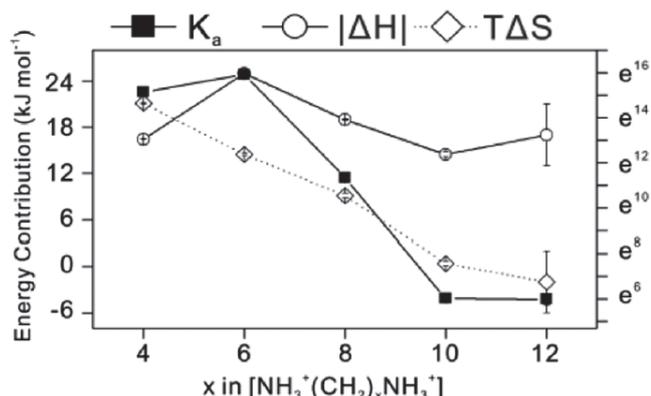


Figure 30 : Evolution des grandeurs thermodynamiques entre l'hôte CB[6] et les  $\alpha,\omega$ -alkyldiammoniums

Les données énergétiques obtenus en ITC (figure 30) avec CB[6] montrent que chacune des associations mesurées avec les diammoniums sont de stœchiométrie 1:1. La constante d'association est maximale pour  $x = 6$  puis décroît avec l'augmentation de la taille de la chaîne carbonée : une sélectivité est observée pour l'hexane-1,6-diammonium avec une constante d'association  $K = 8.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Pour chacune des diamines, la complexation est favorisée enthalpiquement et entropiquement. A l'aide du modèle théorique clé-serrure et de résultats expérimentaux en spectroscopies (par dissociation induite par collision), les auteurs ont montré que les interactions ion-dipôle ammoniums-carboxyles sont principalement responsables de la formation du complexe d'inclusion en phase gaz. Le cas optimal en phase gaz est obtenu avec la butane-1,4-diamine, ce qui est en désaccord avec les résultats expérimentaux en solution. En effet, la distance entre les carboxyles d'une couronne à l'autre du cucurbiturils est de 6,2 Å tandis que les distances ammonium-ammonium dans la butane-1,4-diammonium et l'hexane-1,6-diammonium sont respectivement de 6,3 Å et 8,8 Å. Il y a donc une complémentarité de structure entre la butane-1,4-diamine et le CB[7], puisque les distances entre les partenaires des interactions électrostatiques sont minimisées, ce qui maximise l'enthalpie globale.

Lorsque l'on mesure les grandeurs thermodynamiques du système en présence du solvant, on observe une tendance générale :  $K$  décroît avec la longueur de la chaîne carbonée de l'invité.

Deux contributions majeures sur l'entropie sont observées. Premièrement, un gain entropique  $-T\Delta S$  global est présent pour chaque cas par le relâchement de molécules d'eau initialement présente dans la cavité de CB[6] (l'effet hydrophobe classique). Ce terme n'induit cependant pas de sélectivité entre les différentes diamines, mais explique l'affinité. Deuxièmement, on peut décrire une pénalité entropique principalement due à la diminution des degrés de libertés du diammonium à l'intérieur de la cavité par comparaison à la forme non complexée. Dans le cas d'invité de taille importante, le rapprochement des charges implique une réorganisation des ammoniums ce qui justifie la croissance du terme entropique  $-T\Delta S$ . Ce terme induit ainsi des sélectivités.

Deux contributions majeures sur l'enthalpie sont observées. Premièrement, un gain enthalpique  $\Delta H$  est attribué au relâchement des molécules dites de « haute énergie » présente dans la cavité du cucurbituril initialement (effet hydrophobe non classique). Ce terme n'induit cependant pas de sélectivité entre les différentes diamines, mais explique l'affinité. Deuxièmement, on note un

gain enthalpique supplémentaire pour l'hexane-1,6-diammonium, car malgré la distorsion observée dans le complexe pour les parties polaires du ligand, les ammoniums sont stabilisés par la formation de liaison hydrogène au sein du complexe :

- Des modélisations théoriques ont montré un nombre moyen de liaisons hydrogène entre les ammoniums du ligand et les carbonyles de l'hôte de 1,8 pour la butane-1,4-diammonium, 3,2 pour l'hexane-1,6-diammonium et inférieur à 0,5 pour les tailles supérieures.
- De plus, des liaisons hydrogène supplémentaires sont mises en jeu lorsque les ammoniums polaires sont exposés hors de la cavité avec les molécules d'eau de la première sphère de solvation : ce nombre de forces intermoléculaires augmente avec la taille de la chaîne carbonée, car l'ammonium est de plus en plus exposé au solvant (figure 31).

Par conséquent, la contribution moyenne des liaisons hydrogène de ces deux processus est similaire pour chacune des diamines, excepté pour l'hexane-1,6-diammonium où elles sont plus importantes globalement.

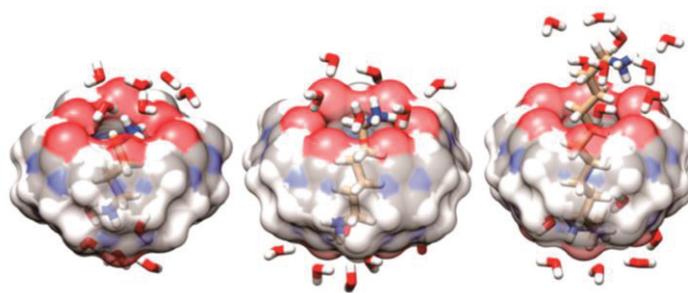


Figure 31 : Cliché des dynamiques moléculaires (10 ns simulation dans une « boîte » de molécules d'eau) pour différents complexes. A gauche, CB[6]-butane-1,4-diammonium. Au centre CB[6]-hexane-1,6-diammonium. A droite, CB[6]-Dodecane-1,12-diammonium.

En conclusion, cette étude montre que l'affinité de l'association est principalement dirigée par les interactions ion-dipôle entre les diammoniums et les cucurbiturils. Les auteurs ont montré que la sélectivité s'explique par le rôle crucial des molécules d'eau au cours des étapes de solvation ainsi que les restrictions conformationnelles des plus grands ligands.

#### 4) Conclusion sur la stabilité des complexes en solution aqueuse

Le tableau 3 résume l'ensemble des interactions et des effets à analyser dans le but de pouvoir interpréter des affinités et/ou sélectivités lors de processus de complexation.

	Contributions enthalpiques	Contributions entropiques
Interactions hôte – invité	<b>Lock and key</b> : analyse des forces intermoléculaires	<b>Degrés de liberté internes et externes</b>
Interactions avec le solvant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Effet hydrophobe non classique</b></li> <li>- <b>Solvation et désolvation des zones polaires</b></li> </ul>	<b>Effet hydrophobe classique</b>

Tableau 3 : Résumé des contributions entropiques et enthalpiques lors de l'association

Nous avons donc vu une approche fondamentale à la reconnaissance d'invité par des cavitands dans l'eau. Le solvant est donc à prendre en compte comme un réel partenaire de complexation en

solution aqueuse. L'intérêt de développer de telles études est ensuite de viser à travailler avec des systèmes biologiques, par exemple lors de la complexation et du relâchement de principe actif vers un organe ciblé ou encore de la séquestration de molécule cibles d'intérêt biologique dans le but de détecter des effets thérapeutiques.

### III) Formation de supramolécules dans les cellules

#### 1) Les polyamines : rôles biologiques

##### A) Présentation et synthèses de polyamines

Les polyamines sont omniprésentes dans les cellules des animaux, des bactéries ou encore dans les plantes. Ces polyamines sont regroupées en trois familles : les polyamines aliphatiques, que nous étudierons ensuite, les polyamines aromatiques et les polyamines hétérocycliques. Les amines aliphatiques sont synthétisées principalement par des réactions de décarboxylations sur des acides aminés : la putrescine (ou butane-1,4-diamine), la spermidine (ou N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine) et la spermine (N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane), représentées en figure 32 jouent un rôle régulateur dans les cellules. À pH physiologique, ces molécules sont totalement protonées sous forme de polyammoniums.

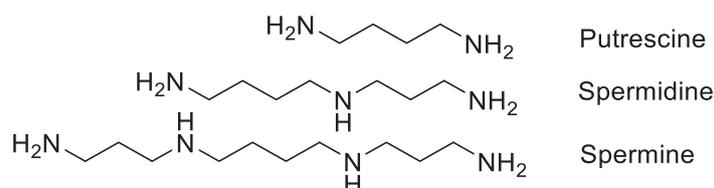


Figure 32 : Polyamines aliphatiques d'intérêt biologique.

La biosynthèse de ces polyamines est présentée à la figure 33.<sup>56</sup> La spermine, la spermidine et la putrescine sont synthétisées dans le cytoplasme à partir d'un précurseur commun : l'ornithine, elle-même issue de la décarboxylation de l'arginine. L'arginine est d'abord décarboxylée par l'ornithine décarboxylase, ce qui conduit à la putrescine. Pour former la spermidine, la S-adenosylmethionine decarboxylase convertit la S-adenosylmethionine en S-adenosylmethionine décarboxylée, qui joue le rôle de donneur d'aminopropyl sur la putrescine. Le même principe est appliqué pour convertir la spermidine en spermine. Dans la conversion observée, il est possible d'acétyler la spermine ou la spermidine à l'aide de la transférase associée et la N-acétylspermine et la N-acétylspermidine peuvent être extraites des cellules ou être oxydés à l'aide d'une oxydase respectivement en spermidine et en putrescine. Elles peuvent aussi être oxydées de façon irréversible par des protéines contenant du cuivre et être éliminées du système cellulaire par la suite.

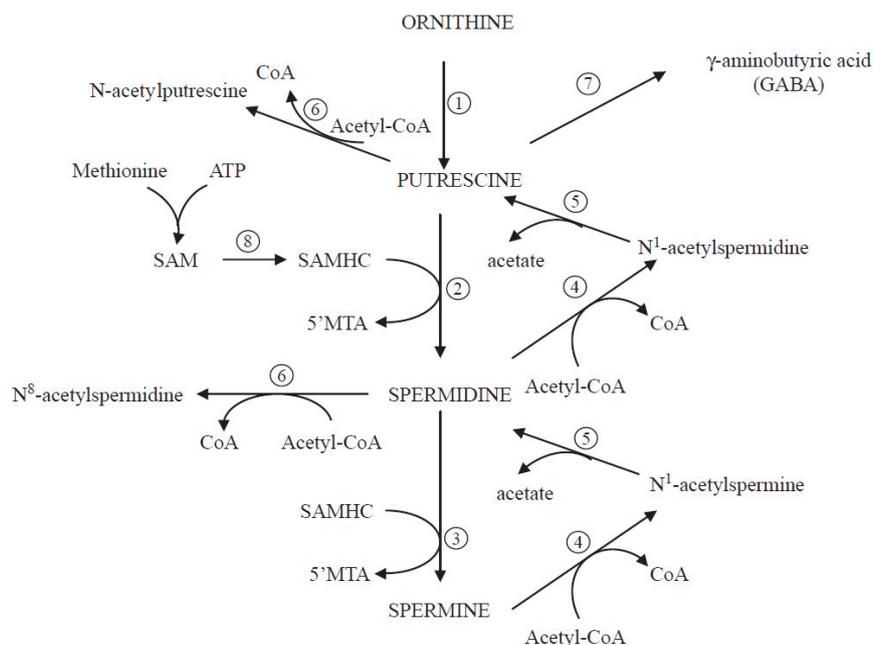


Figure 33 : synthèse et interconversion des polyamines. 1) Ornithine-décarboxylase, 2) Spermidine synthase, 3) Spermine Synthase, 4) Acetyl-CoA : spermidine/spermine N1-acétyltransférase (SSAT), 5) polyamine-oxydase (PAO), 6) N8-acetyltransférase 7) Diamineoxydase (DAO) 8) SAM-décarboxylase (SAMdc). SAM : S-adenosyl-méthionine, SAMHC : S-adenosyl-S-méthylhomocystéamine, 5MTA : 5-méthylthioadenosine.<sup>56</sup>

Les concentrations respectives de ces polyamines dans les cellules varient selon le tissu analysé. En général chez les eucaryotes, les concentrations en putrescine sont plus faibles que pour la spermine et la spermidine. Le tableau ci-dessous résume les concentrations de quelques systèmes cellulaires sains ou cancéreux.<sup>57,58,59</sup>

	Putrescine	Spermidine	Spermine
<b>Cancer colorectal</b>			
Cellule saine	0,8	4	6
Cellule cancéreuse	2	13	23
<b>Cancer du sein</b>	2,1	10,9	21,7
<b>Cancer du foie</b>	1,0	0,13	9,8

Tableau 3 : concentration en nmol pour 100 mg de tumeur en poids humide en polyamines

## B) Rôle des polyamines

De nombreuses recherches ont mis en évidence les fonctions régulatrices des polyamines dans les cellules. Les polyamines sont ainsi décrites pour interagir avec les acides nucléiques et les ribosomes, stimuler *in vitro* et *in vivo* la synthèse de protéines, induire la réparation des tissus endommagés, ou encore agir sur les processus de prolifération cellulaire et de différenciation cellulaire.<sup>60</sup>

Une quantité trop faible ou trop importante de polyamines peut avoir des conséquences dramatiques sur la vie des cellules.<sup>61</sup> Les enzymes mises en jeu dans la synthèse de ces polyamines, la

spermine synthase et la spermidine synthase sont capables de surproduire les polyamines en cas de déficit au sein des cellules. Des inhibiteurs peuvent quant à eux réguler une trop haute concentration en polyamine.<sup>62</sup> Différents mécanismes impliquant la régulation des polyamines sont pris en compte dans la stimulation des flux de calcium, dans la formation des oxygènes radicaux pour éviter leur surexpression. Heby et al. ont trouvé une corrélation linéaire entre le ratio cellulaire spermidine/spermine et la vitesse de croissance des cellules dans les processus de différenciation cellulaire.<sup>63</sup>

Dans les cellules cancéreuses, les concentrations de ces polyamines sont plus élevées que dans les cellules saines, notamment dans le cas de cancers colorectaux ou cancer de la langue (cf. tableau 3).<sup>64</sup> En effet, dès les années 1980 des études ont montré un taux élevé de polyamines dans le sang ou les urines chez les patients atteints de cancer. Ces taux élevés reviennent à la normale une fois la tumeur éradiquée.<sup>65</sup> Cependant la spermine a une activité biologique plus importante que la spermidine dans les processus de régulation cellulaire.<sup>66,58</sup> L'utilisation d'inhibiteur de l'ODC (orthonine decarboxylase) dans les tissus montre une décroissance forte de la concentration en putrescine et de la spermidine, alors que pour celle de la spermine, on observe généralement une augmentation. La spermine est ainsi souvent utilisée comme un biomarqueur des cellules cancéreuses et le suivi de sa concentration comme un indicateur de la prolifération des cellules. Le rôle des polyamines dans les cellules cancéreuses n'est pas encore totalement élucidé à ce jour ; une des hypothèses émises stipule que les polyamines affectent spécifiquement l'expression de certains gènes au cours de la transcription et la post-transcription de l'ADN.

L'analyse du taux de spermine est généralement effectuée par des dosages ou des techniques chromatographiques qui sont des processus plutôt coûteux.<sup>67</sup> Les moyens de détection de la spermine dont certains basés sur la chimie supramoléculaire se sont multipliés dans le but d'identifier les cellules cancéreuses.

## 2) Détection de la spermine en milieu cellulaire

### A) Biocompatibilité des récepteurs supramoléculaires

En plus de l'hydrosolubilité, les récepteurs supramoléculaires doivent être biocompatibles vis-à-vis des organes non visés et stables dans les milieux biologiques. Chacun des macrocycles décrits comme étant hydrosolubles dans la littérature est biocompatible avec les cellules saines avec de très faibles toxicités.<sup>68</sup> Certains calixarènes sont reportés comme ayant des activités antibactériennes, antituberculeuses ou antifongiques.<sup>69</sup> De façon générale, ces cavitands sont utilisés pour complexer des principes actifs<sup>70</sup> : par exemple, les cyclodextrines sont capables de complexer des anticancéreux tels que la Doxorubicin, le Paclitaxel ou encore la Camptothécine.<sup>71</sup> La complexation des principes actifs améliore leur solubilité et certaines études rapportent même la diminution de la toxicité de principe actif à l'aide. L'oxaliplatine, anticancéreux est peu sélectif des cellules cancéreuses. Cependant, lorsqu'il est complexé par le CB[7], le complexe résultant a une toxicité très faible, comme CB[7] seul : il y a donc une inhibition de la toxicité par effet supramoléculaire (figure 34).<sup>72</sup> Les cavitands sont par la suite capable de relarguer sélectivement le principe actif dans les cellules cancéreuses : la substitution du principe actif par un biomarqueur, tel que la spermine qui est surexprimée dans les cellules cancéreuses permet d'être sélectif de ces cellules.

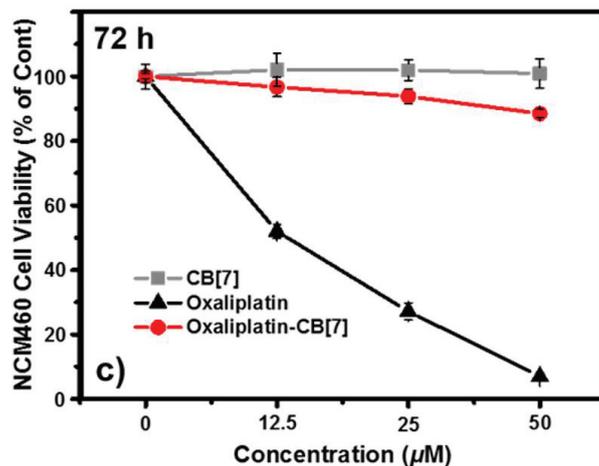


Figure 34 : Etude *in vitro* de la toxicité de **CB[7]**, de l'oxaliplatine et du complexe résultant pour des cellules colorectales saines après 78 heures d'incubation.

Dans le but de détecter les polyamines et notamment la spermine au sein des cellules, nous allons voir quels sont les cavitants capables de reconnaître sélectivement la spermine.

### B) Reconnaissance de la spermine en solution aqueuse

Parmi les hôtes supramoléculaires hydrosolubles décrits précédemment, les calixarènes, cucurbiturils et pillararènes ont été décrits comme des complexants de la spermine.

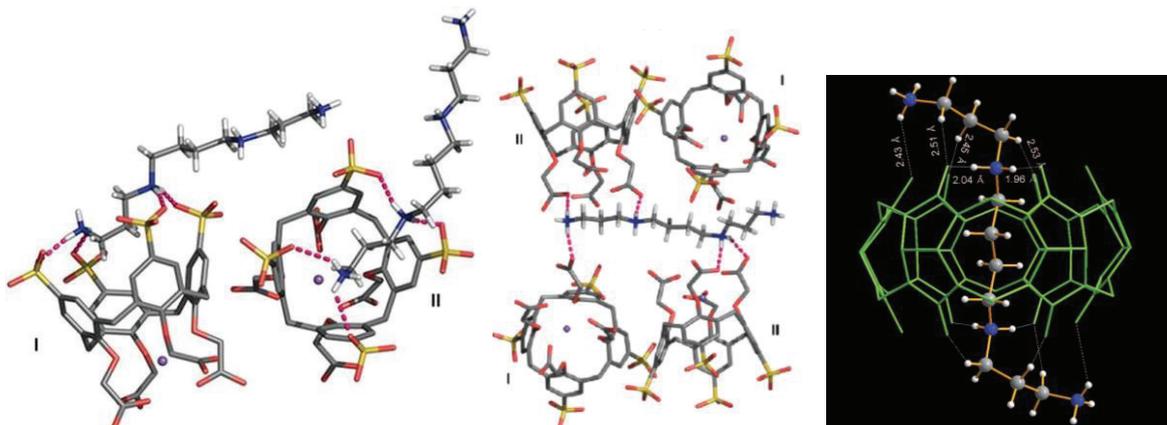


Figure 35 : Structures cristallographiques calixarène – spermine et cucurbituril - spermine

D'Urso et al. ont obtenu une preuve de la complexation de la spermine par un calix[4]arène hydrosoluble (du à la présence de groupements sulfonates et carboxylates) en solution à l'aide d'expérience en fluorescence et à l'état solide à l'aide de structures cristallographiques.<sup>73</sup> Les différents modes de complexation sont présentés en figure 35 pour des ratios calixarène:spermine 2:1 et 1:1. Dans le mode de complexation 1:1, des interactions électrostatiques hors cavité entre les phosphates de la partie supérieure du calixarène sont observées, ou encore des interactions électrostatiques ainsi que des liaisons hydrogène entre les acides carboxyliques et la spermine. Le mode de complexation 2:1 correspond aux mêmes interactions hors cavité. Les auteurs ne reportent pas de constantes d'associations pour ces systèmes.

Les pillar[n]arènes ont pour leur part montré une complexation de la spermine par inclusion : fonctionnalisé par des groupements carboxylates, le pillar[6]arène reconnaît la spermine en solution aqueuse avec une constante d'association de  $2,58 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ .<sup>74</sup> Cependant, les cucurbiturils se sont à nouveau démarqués comme étant des hôtes remarquables pour la spermine. CB[6] et CB[7] sont capables de reconnaître la spermine en solution aqueuse avec des constantes d'associations respectivement de l'ordre de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  et de l'ordre de  $10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}$ . Une structure cristallographique de l'association CB[6]-spermine est décrite dans la littérature, montrant un repliement particulier des ammoniums terminaux de la spermine sur la couronne du macrocycle par interaction ion-dipôle (figure 35).<sup>75</sup> Kim et al. ont obtenu la plus haute constante décrite pour la complexation de la spermine, s'élevant à  $3,4 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$  avec un cyclohexanocucurbit[6]uril. De façon contre-intuitive, les groupements cyclohexane sur la partie équatoriale du motif glycoluril rendent le cyclohexanocucurbit[6]uril plus soluble dans l'eau pure. Ce récepteur se lie également avec la spermidine et la putrescine avec des constantes d'association très élevées, de  $4,8 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  et  $2,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$  respectivement, indiquant une sélectivité pour la spermine.<sup>75</sup>

### C) Utilisation de principes actifs : chimiothérapie supramoléculaire

Zhang et coll. ont décrit plusieurs exemples de chimiothérapie supramoléculaire, où ils ont été capables de mettre évidence un effet thérapeutique par utilisation de cucurbituril ou de pillararène en synergie avec des principes actifs.<sup>76</sup> La chimiothérapie présente de nombreuses limites : faible solubilité des principes actifs ou mauvaise stabilité. L'apport de la chimie supramoléculaire peut donc permettre d'améliorer la chimiothérapie traditionnelle pour s'affranchir de ces limitations. La complexation d'agents hydrophobes dans des cavités apolaires d'hôtes hydrosolubles peut être un bon moyen d'améliorer leur transport.<sup>71</sup>

La stratégie générale est présentée en figure 36 : l'objectif est d'utiliser un agent pharmacologiquement actif complexé par un macrocycle. L'encapsulation du principe actif par un macrocycle permet de masquer sa cytotoxicité vis-à-vis des cellules saines. Le cavitant utilisé doit être alors un bon complexant du principe actif et de la spermine, en étant sélectif pour la spermine. La spermine agit donc comme un biomarqueur de la tumeur qu'il faudrait cibler, comme interrupteur de relargage du principe actif dans les cellules cancéreuses.

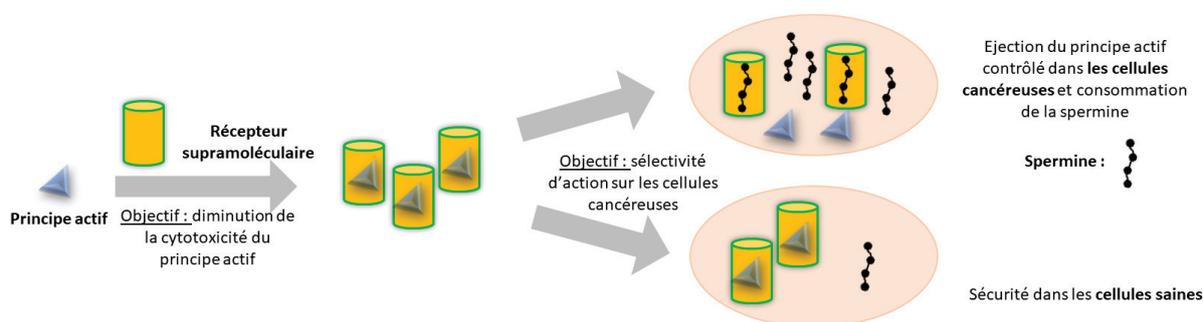


Figure 36 : principe de la chimiothérapie supramoléculaire

Dans la littérature, le système cellulaire cancéreux colorectal a été étudié en utilisant soit CB[7]<sup>72</sup> soit le pillar[6]arène dodecacarboxylate<sup>74</sup> comme complexants de l'oxaliplatine. Avec chacun de ces cavitants, l'oxaliplatine est complexé avec des constantes d'association plus faibles que la spermine, ce qui permet une substitution dans les cellules. La toxicité du principe actif s'avère être

abaissée par l'utilisation de récepteurs moléculaires comme le montre la figure 37 : la toxicité du complexe est similaire à la toxicité du macrocycle seul, qui est biocompatible. Les cellules cancéreuses sont ainsi tuées par libération de l'oxaliplatine et simultanément la spermine se complexe au récepteur. Ainsi, le remplacement de l'oxaliplatine par la spermine dans la cavité du macrocycle est thermodynamiquement favorisé au vu des écarts entre les constantes dans le cas du pillararène, mais est aussi observé dans le cas du cucurbituril malgré des constantes proches (figure 37). Les auteurs ont par la suite montré que ces récepteurs supramoléculaires précomplexé avaient un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses plus élevées de 20% par rapport à l'oxaliplatine seule alors que ces récepteurs seuls ne possèdent aucune bioactivité cytotoxique. De plus, il semblerait qu'il y ait un effet coopératif entre l'activité de l'oxaliplatine libre sur le système cellulaire et la séquestration de la spermine par le macrocycle, car le complexe macrocycle-oxaliplatine a une activité antitumorale plus importante que l'oxaliplatine seul. On a une preuve de concept d'un effet antitumoral sur les cellules cancéreuses avec une amélioration de la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Les auteurs ont de plus relevé une suractivité de la spermine synthase lorsque l'hôte supramoléculaire complexe la spermine, prouvant la capacité du système cellulaire à autoréguler la quantité de spermine séquestrée par le récepteur.

Ka (M <sup>-1</sup> )	CB[7]	Pillar[6]arène
Oxaliplatine	2.89 10 <sup>6</sup>	1.66 10 <sup>4</sup>
Spermine	1.19 10 <sup>6</sup>	2.58 10 <sup>7</sup>

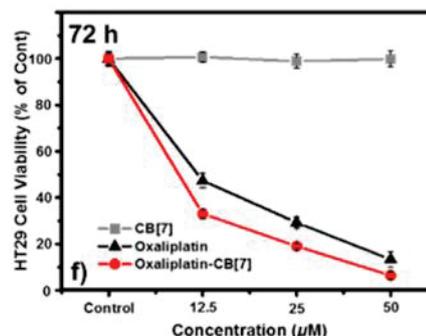


Figure 37 : A gauche : constantes d'association. A droite : profil in vitro entre CB[7] oxaliplatine et le complexe résultant sur des cellules tumorales après 72 heures d'incubation.

Ces études ne reflètent cependant pas le lieu d'action du macrocycle au sein des cellules : sont-ils capables de franchir les barrières cellulaires ?

#### D) Preuve d'internalisation dans les cellules

De manière à prouver l'internalisation au sein des cellules, des fluorophores ligands des macrocycles d'études sont fréquemment utilisés. Selon la concentration de travail, une forte affinité entre hôte et invité peut se traduire par un faible pourcentage d'espèce libre en solution et ainsi, après injection dans un milieu de culture cellulaire, une observation en microscopie de fluorescence peut être effectuée pour analyser la présence du macrocycle dans le cytoplasme ou les noyaux des cellules.

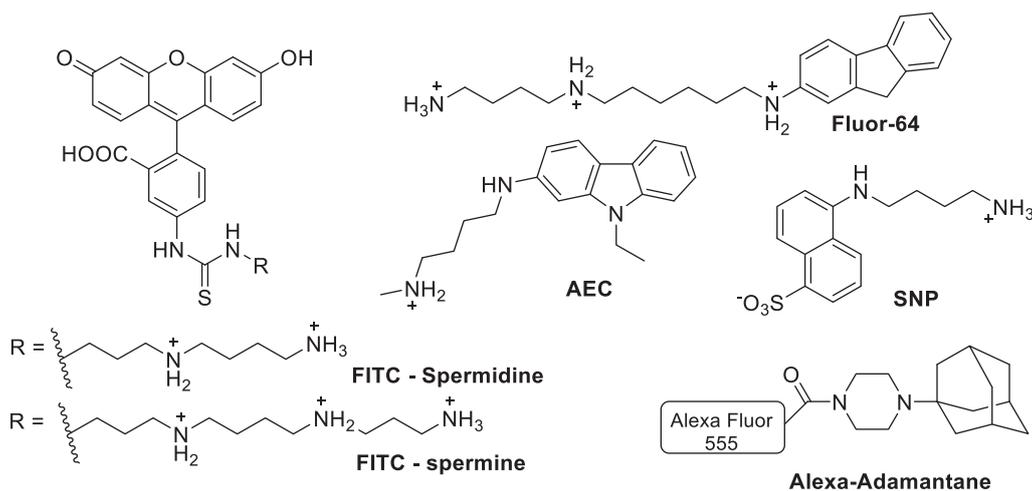


Figure 38 : fluorophores décrits dans des associations supramoléculaires

Les fluorophores classiquement utilisées avec les cucurbiturils sont recensés en figure 38.<sup>77</sup> Des distinctions sont à mentionner lors de l'utilisation de fluorophore :

- Certains fluorophores, comme **FITC-Spm**, expriment la même fluorescence sous forme liée au cucurbituril ou sous forme libre.
- D'autres fluorophores comme **AEC** et **SNP**, présentent une modification de la fluorescence sous forme lié et sous forme libre ce qui facilite la détection de chacune des deux formes.

Montes-Navajas et al ont montré de fortes associations avec d'autres fluorophores pour les cucurbiturils.<sup>78</sup> Notamment, CB[8] est capable de reconnaître le fluorophore acridine orange (**AO**) avec une constante d'association de l'ordre de  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  et une stœchiométrie 1:2. Une constante aussi élevée permet, à la concentration de travail ( $10 \mu\text{M}$ ) de conclure sur une quantité de ligand sous forme libre inférieure à 1%. Ainsi, les clichés de microscopie analysés font apparaître uniquement la forme complexée du ligand. Les fluorophores d'études sont connus pour être amphiphiles et donc capables de franchir les barrières cellulaires puis absorbés par le cytosol, mais ils sont phototoxiques pour la cellule. Les auteurs montrent ainsi que le complexe est aussi capable d'être internalisé (figure 39).

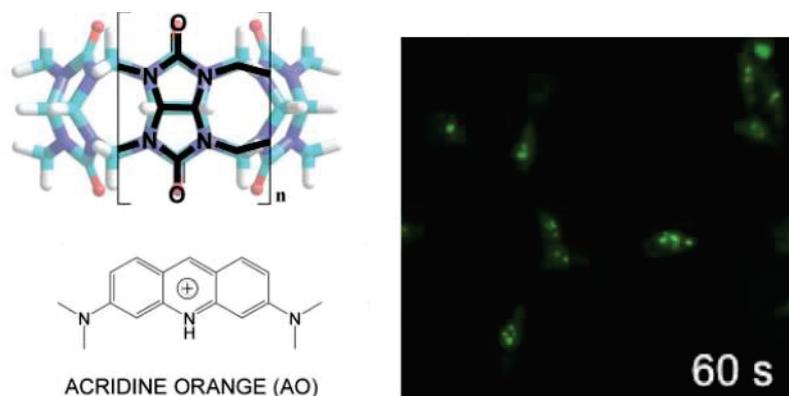


Figure 39 : Structure du fluorophore cationique AO et cliché de microscopie prouvant l'internalisation dans les cellules 3T3 ( $\lambda(\text{ex}) = 440 \text{ nm}$ ,  $\lambda(\text{em}) = 470 \text{ nm}$ ) pour le complexe CB[8]-AO après 60 s d'injection. (les vésicules vertes correspondent au complexe macrocycle-fluorophore internalisé au sein des cellules).

D'autres systèmes, tels que le complexe dérivé d'un cucurbituril fonctionnalisé par 12 groupements carbohydrates I-E (figure 40) complexant FITC-spm a été utilisé dans des expériences de microscopie pour prouver l'internalisation au sein des cellules.<sup>79</sup> L'utilisation de systèmes supramoléculaires avec des fluorophores est aussi exploitée pour la détection de processus biologiques. On peut citer des calixarènes capables de reconnaître et de suivre des réactions enzymatiques par éjection d'un fluorophore hors de sa cavité lors de la complexation d'un analyte issue de l'enzyme étudiée.<sup>80-81</sup>

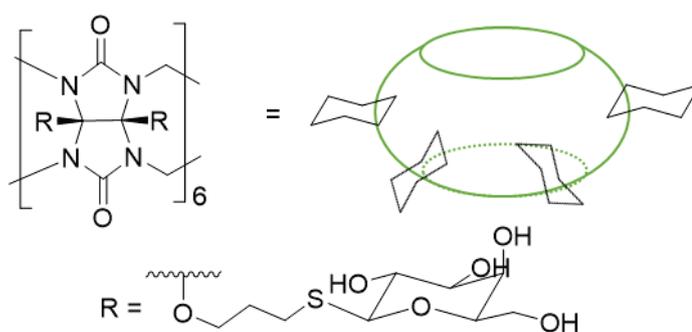


Figure 40 : Structure du cucurbituril I-E

Nous avons donc répertorié les hôtes supramoléculaires hydrosolubles capables d'effectuer de la reconnaissance en solution aqueuse ou au sein des cellules. Nous avons développé une nouvelle famille de récepteurs macrocycliques apparentés aux récepteurs hydrosolubles capables d'effectuer de la chimie hôte invité en solution aqueuse à pH physiologique.

## Partie B : Synthèse de dyn[n]arène à l'aide de la chimie combinatoire dynamique et application à la complexation de cation en solution aqueuse

L'objectif de cette partie sera de mettre en évidence de nouveaux récepteurs pour molécules d'intérêt biologique. Par comparaison aux récepteurs décrits précédemment, ces nouveaux récepteurs doivent présenter une synthèse simple, avec des purifications peu fastidieuses. Il est nécessaire d'avoir un hôte hydrosoluble pour effectuer de la reconnaissance à pH physiologique, pour pouvoir envisager des applications *in cellulo*. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement à la synthèse de nouveaux hôtes et à la description en solution aqueuse.

### I) Une nouvelle famille de récepteur : les dyn[n]arènes

#### 1) Présentation générale des divers dynarènes

Une nouvelle famille de récepteurs de type paracyclophane a été synthétisée à partir de briques 1,4-dithiophénol fonctionnalisées par une approche combinatoire dynamique. Ces objets sont appelés dyn[n]arènes où n définit le nombre d'unités aromatiques présentes sur la structure : sur la figure 41,  $n = 4$ . Le nom donné à ces objets moléculaires tient du caractère dynamique de la structure, lié à la nature réversible des ponts disulfures.

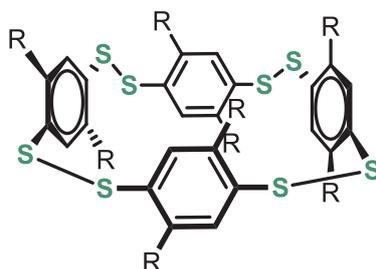


Figure 41 : Structure générique d'un dyn[4]arène.

Plusieurs dyn[n]arènes ont été isolés et caractérisés à ce jour dans le laboratoire (figure 42).<sup>82</sup> Ces récepteurs diffèrent par la nature des substituants portés par les noyaux aromatiques : il est donc possible d'obtenir à façon des objets fonctionnalisés et d'effectuer de la reconnaissance moléculaire sur mesure pour des invités divers.

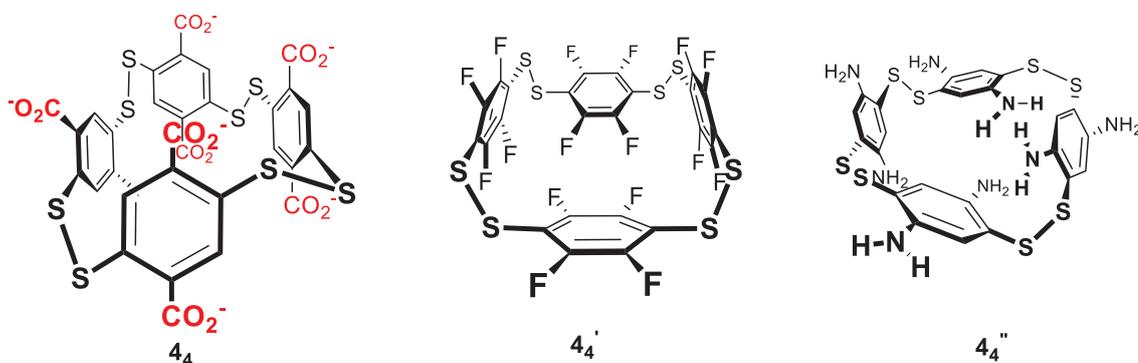


Figure 42 : présentation des trois récepteurs isolés dans le laboratoire : le dyn[4]arène octacarboxylate  $4_4$ , le dyn[4]arène fluoré  $4_4'$  et le dyn[4]arène octa-ammonium  $4_4''$ .

**4<sub>4</sub>'** est formé à l'aide de briques 1,4-dithiophénol tetra-substituées par des atomes de fluor sur les positions aromatiques. Dans une chimiothèque, cette brique conduit exclusivement à la formation du tétramère, avec ou sans template, qui est isolé avec un rendement de 71%.<sup>82</sup> Il a été montré par modélisation à l'aide de calcul *ab initio* que les moteurs de l'assemblage sont des interactions moléculaires qui induisent également le repliement particulier de la structure. Les nombreux atomes de fluors présents sur la molécule exercent un effet inductif attracteur important et appauvrissent la densité électronique des cycles aromatiques. Ainsi, le récepteur étudié s'est avéré être un bon hôte moléculaire pour des anions tels que des halogénures grâce aux interactions  $\pi$ -anion : une sélectivité avec une constante d'association de l'ordre de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  a été montrée pour les ions iodures ainsi qu'une stœchiométrie 1:1.

Le macrocycle azoté **4<sub>4</sub>''**, résultant de l'auto-assemblage de la brique moléculaire 2,5-diamino-1,4-dithiophénol, est formé exclusivement dans les chimiothèques et isolé avec un rendement de 96%. En effet, en l'absence ou présence de template, le tétramère précipite en milieu aqueux ou organique à l'exception du DMSO. Les liaisons hydrogène intramoléculaires sont responsables de la formation d'agrégats et sont à l'origine de l'empilement particulier de la structure, guidant l'auto-assemblage. Cet hôte est capable de reconnaître des composés zwitterioniques. Une sélectivité avec une constante d'association de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  a été mesurée pour la reconnaissance de la  $\beta$ -alanine ainsi qu'une stœchiométrie 1:1.<sup>82</sup>

Le dernier macrocycle **4<sub>4</sub>**, présentant des groupements carboxylates fera l'objet des travaux de thèse suivants et sera détaillé par la suite comme récepteur à cation en solution aqueuse.

## 2) Synthèses et caractérisations des dyn[n]arènes polycarboxylates

### A) Etude autour de la brique 4

#### a) Synthèse de la brique 4

La brique utilisée pour synthétiser ces récepteurs anioniques est la brique 1,4-dithiophénol-2,5-dicarboxylate **4**. Nous avons repris sa synthèse qui a d'abord été décrite en 1970<sup>83</sup> puis reprise en 2006 par Vial et al.<sup>84</sup> en intégrant la procédure classique de conversion de phénols en thiophols.

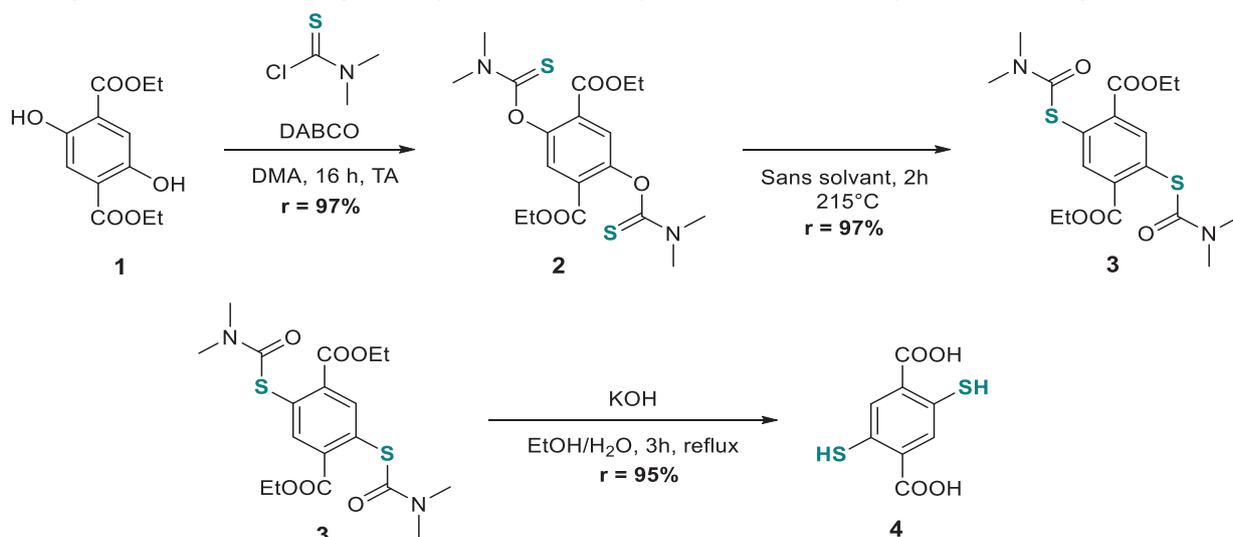


Figure 43 : Synthèse de la brique 1,4-dithiophénol-2,5-dicarboxylate **4** à partir de **1**

Cette synthèse est décrite en figure 43. En partant du 2,5-diethylterephthalate **1**, une première étape de thiocarbamatation dans le DMA à l'aide du DABCO permet la formation de **2** avec un rendement de 97%. Ensuite, la fonction O-thiocarbamate est transformée en groupement S-thiocarbamate à l'aide d'un réarrangement de Newmann-Kwart. Cette réaction s'effectue sans solvant à 230°C sous atmosphère inerte. La présence des groupements esters électroattracteurs facilite le réarrangement en condition thermique. Le produit **3** est obtenu avec un rendement de 97%. Enfin, la dernière étape réactionnelle consiste à effectuer une déprotection des groupements esters en acide carboxylique ainsi qu'à générer les thiophénols en hydrolysant les groupements S-thiocarbamate. On isole ainsi à l'issue de cette réaction la brique moléculaire **4** avec un rendement de 95%. On obtient donc un excellent rendement global de 89% pour cette synthèse. On souligne de plus que chaque étape fait appel à des purifications par précipitation : aucune technique de purification par chromatographie n'est employée ici. Par ces nombreux avantages, la synthèse de la brique moléculaire est effectuée en routine dans le laboratoire à grande échelle.

### b) Synthèse des macrocycles

#### i) Identification par chimie dynamique combinatoire

Une chimiothèque a été créée en utilisant la brique **4** à 4 mM dans différents tampons dont un tampon TRIS à 200 mM et à pH = 7,4 dans le but de synthétiser des macrocycles par formation de ponts disulfures.

Premièrement, un suivi de la bibliothèque sans template a été effectué par LC-MS, mettant en évidence la formation de trois macrocycles à l'équilibre (48 heures) : le trimère **4<sub>3</sub>**, le tétramère **4<sub>4</sub>** et le pentamère **4<sub>5</sub>** dans les proportions respectives de 23%, 74% et 3%. Leurs structures sont présentées en figure 44.<sup>82</sup> Contrairement aux briques fluorées et azotés, il est possible d'observer la formation de macrocycle de différentes tailles. Le tétramère est le plus stable dans ces conditions.

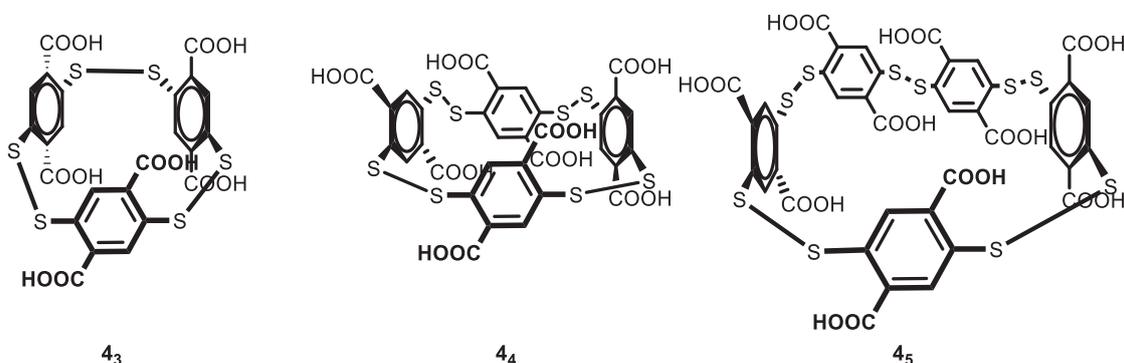


Figure 44 : Structures des dyna[n]arènes polycarboxyles.

Deuxièmement, des chimiothèques en présence de templates ont été générées. L'objectif est d'observer une modification possible des proportions des espèces **4<sub>3</sub>**, **4<sub>4</sub>** et **4<sub>5</sub>** dans l'optique de les isoler en cas d'amplification quantitative. Les templates choisis sont porteurs de groupements ammoniums à pH = 7,4, capables d'effectuer des ponts salins avec les carboxylates de la brique **4**. Une sélection des formes neutres de quelques templates parmi les dizaines testées sont présentées en figure 45. Les chimiothèques ont été analysées par HPLC et les proportions des macrocycles sont résumées en figure 45.

Mis à part le cas sans template, trois scénarios sont identifiés : le template  $T_0$  est capable d'amplifier uniquement le dyn[3]arène  $4_3$ , les templates  $T_1$ ,  $T_2$  et  $T_3$  amplifient exclusivement le dyn[4]arène  $4_4$  et enfin les templates  $T_4$ ,  $T_5$  et  $T_6$  ne permettent pas d'amplification exclusive, mais augmentent fortement les proportions du dyn[5]arène  $4_5$ .

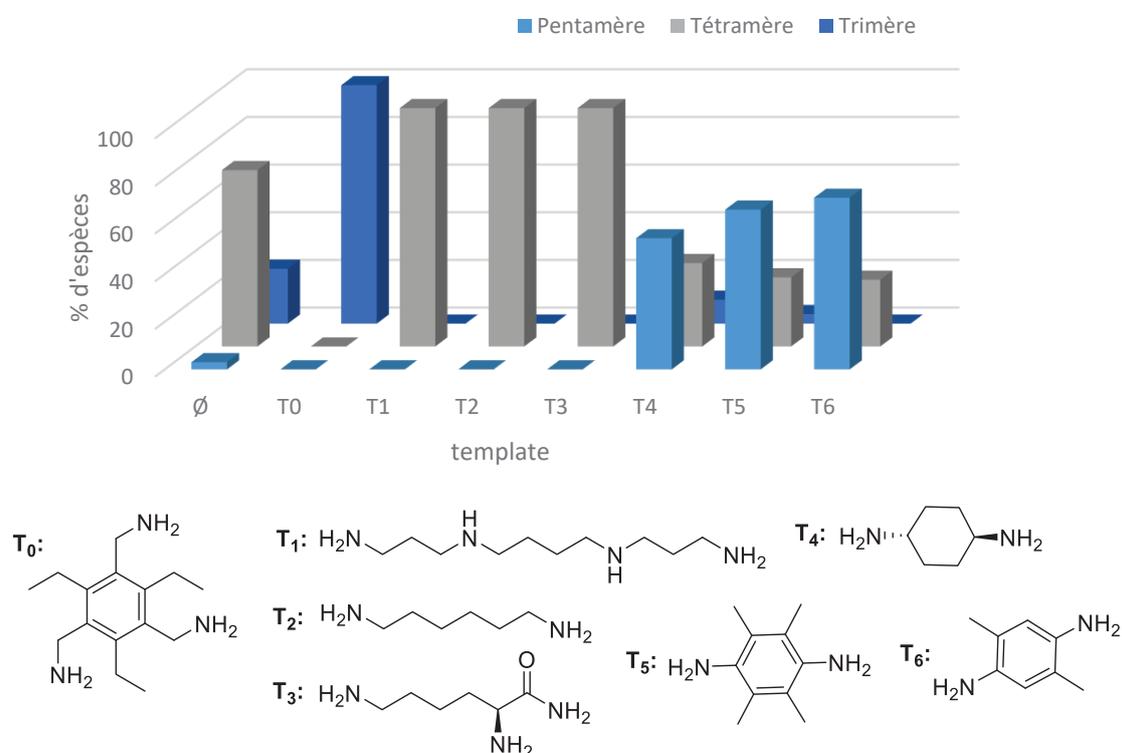


Figure 45 : Compilation des pourcentages de dyn[n]arènes obtenus dans les chimiothèques avec ou sans template et structures des templates utilisés dans les chimiothèques avec la brique  $4$ .

Ainsi dans le but d'isoler les macrocycles  $4_3$  et  $4_4$ , ces bibliothèques sont reproduites à l'échelle de la centaine de milligrammes et des procédures de purification sont alors mises au point. Ces développements sont présentés dans la partie suivante. On notera que des tentatives d'isolation de  $4_5$  ont été effectuées par le Dr. Donnier-Maréchal dans le laboratoire, sans succès.

## ii) Synthèse du dyn[4]arène

La synthèse du dyn[4]arène octacarboxylate  $4_4$  a été premièrement décrite en 2006 par Vial et al. Il avait été isolé par HPLC préparative sur une chimiothèque à 10 mM en  $4$  avec la spermine  $T_1$  comme template.<sup>84</sup>

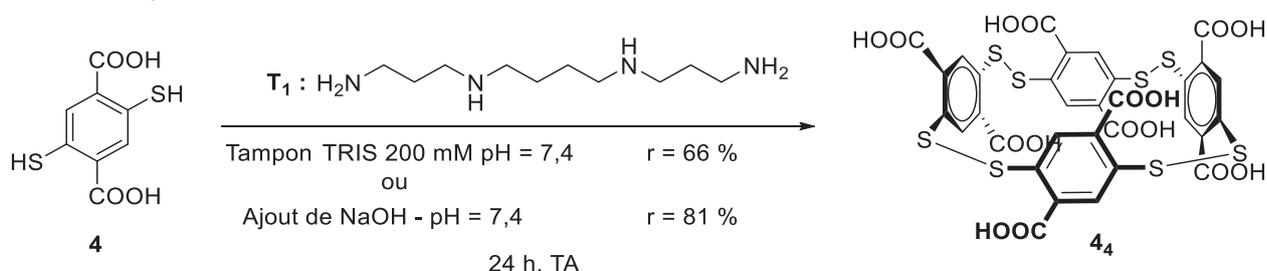


Figure 46 : synthèse du dyn[4]arène octacarboxyle

Nous avons plus récemment développé et optimisé une procédure basée sur une précipitation suivie de lavages pour isoler **4<sub>4</sub>** (figure 46). Une première voie consiste à faire précipiter **4<sub>4</sub>** par ajout d'acide trifluoroacétique. Le complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane entre la spermine et le dynarène n'est plus stable, car la protonation des acides carboxyliques entraîne une rupture des ponts salins avec les ammoniums de la spermine. L'analyse du solide, possédant un seul signal en RMN <sup>1</sup>H, correspond au dynarène **4<sub>4</sub>** avec un rendement de 66%.<sup>82</sup> On souligne à nouveau qu'aucune purification par chromatographie n'a été requise ici. Une seconde procédure consiste à simplifier les lavages. En effet, le tampon TRIS restant est difficile à éliminer, nécessitant de nombreux lavages et conduisant à des pertes du produit d'intérêt. En reproduisant la manipulation en travaillant à pH fixé à 7,4 par ajout de soude, les lavages sont simplifiés et le rendement de la synthèse est amélioré jusqu'à atteindre 81%.

### iii) Synthèse du dyn[3]arène

Le template **T<sub>0</sub>** a été utilisé pour amplifier quantitativement le macrocycle **4<sub>3</sub>** dans la chimiothèque étudiée.<sup>85</sup> La synthèse est décrite à la figure 47.

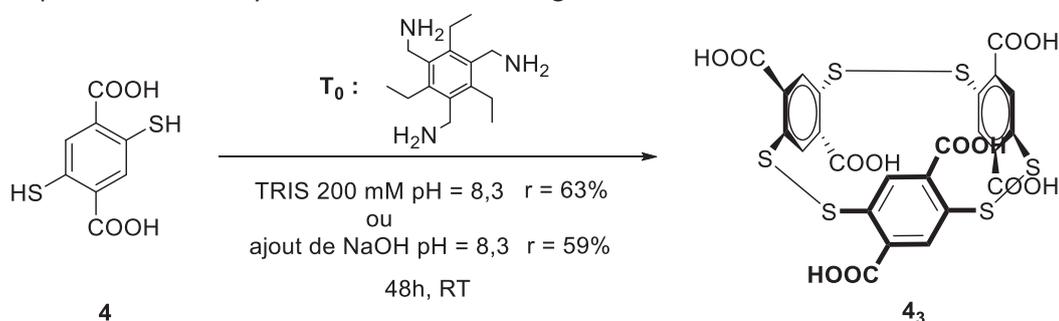


Figure 47 : synthèse du dyn[3]arène hexacarboxyles

Un précipité est isolé après 48 heures d'agitation : la formation d'un complexe entre deux équivalents du template **T<sub>0</sub>** et trois équivalents de template de la brique **4** est analysée en RMN du carbone en phase solide, à la figure 48.<sup>85</sup> La symétrie **C<sub>3</sub>** du template permet, lors de la formation des ponts salins, de réorganiser le système favorisant la formation exclusive du dynarène **4<sub>3</sub>**.

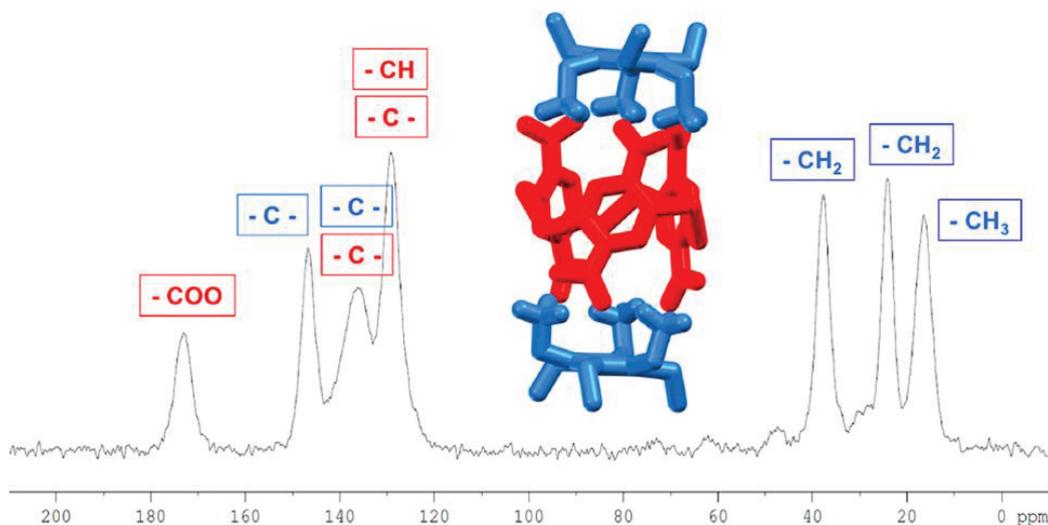


Figure 48 : spectre <sup>13</sup>C RMN du précipité issu de la chimiothèque entre **4** et **T<sub>0</sub>** ainsi que la structure modélisée sur Spartan (PM3, Spartan 14)

De la même manière que précédemment, l'ajout d'acide trifluoroacétique permet de protoner les groupements carboxylates. **4**<sub>3</sub> précipite alors que **T**<sub>0</sub> reste en solution. Une série de filtrations et lavages permettent de récolter **4**<sub>3</sub> avec un rendement de 63%. L'utilisation de NaOH au lieu du tampon TRIS diminue le nombre de lavages, mais également le rendement en produit isolé.

### c) Caractérisations structurelles des macrocycles

#### i) Sources de chiralité

L'analyse détaillée de la structure des macrocycles permet d'observer la présence d'éléments stéréogènes sur les macrocycles formés : configurationnelle et conformationnelle.

#### Chiralité configurationnelle :

Premièrement, différents stéréoisomères sont observés due à la position des groupements fonctionnels (notés R ici pour plus de clarté) sur chacune des briques : il s'agit de chiralité configurationnelle.<sup>82</sup> En effet, la rotation autour de l'axe soufre-soufre d'un cycle aromatique est bloquée dans la structure des dynarènes. Par conséquent, il est possible d'attribuer un stéréodescripteur (*pR*) ou (*pS*) pour chacune des unités de l'hôte supramoléculaire, d'après les règles de Cahn Ingold et Prélog. Cette chiralité de type planaire est décrite sur la figure 49.

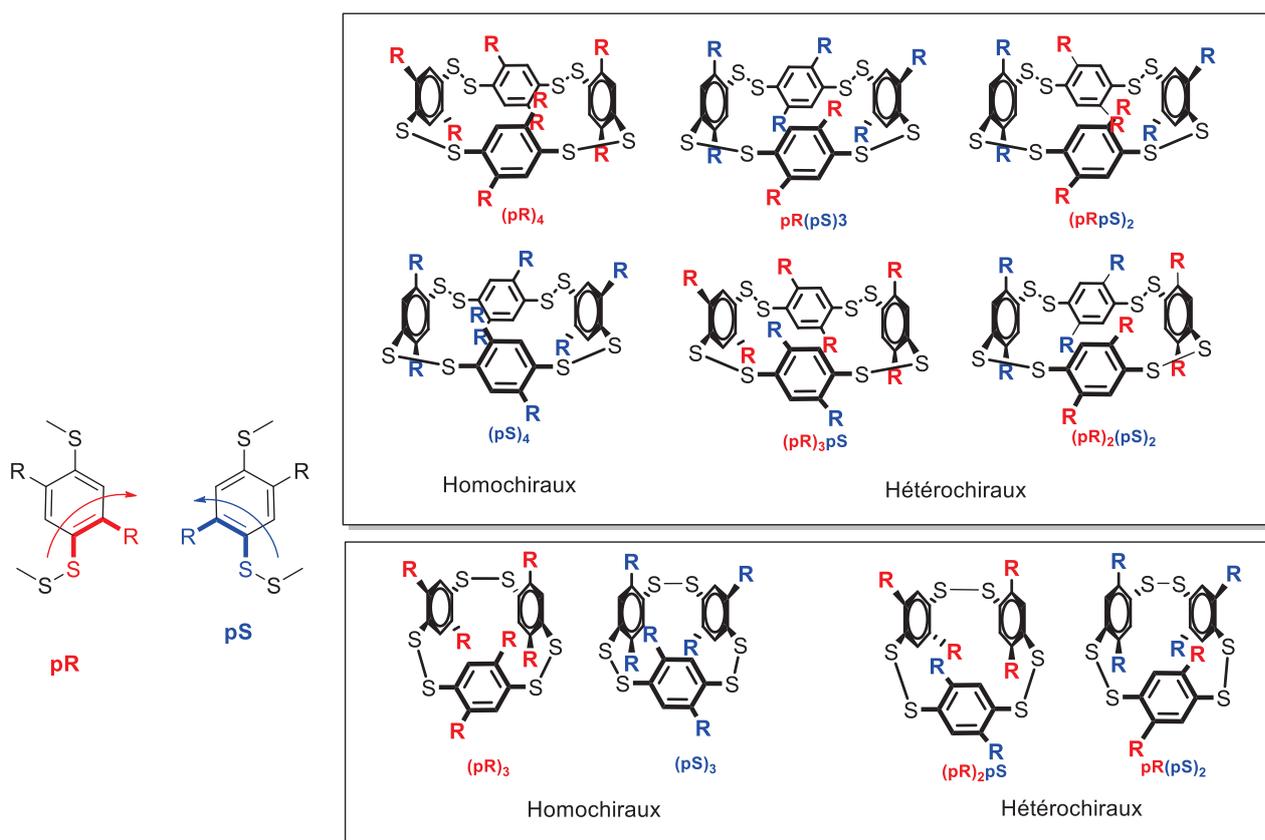


Figure 49 : stéréodescripteurs de chiralité configurationnelle pour les dynarènes. Par soucis de clarté, les acides carboxyliques ont été remplacés par des groupements R.

Ainsi, pour le trimère et pour le tétramère, il est possible de distinguer respectivement 4 et 6 stéréoisomères de configuration décrits à la figure 49. On distinguera les stéréoisomères homochiraux

((*pR*)<sub>3</sub> et (*pS*)<sub>3</sub> pour le trimère, (*pR*)<sub>4</sub> et (*pS*)<sub>4</sub> pour le tétramère) des autres stéréoisomères hétérochiraux. Ces informations permettent d'expliquer la présence de plusieurs pics en RMN. Il est donc capital de connaître ces informations stéréochimiques pour les dynarènes. Pour les dynarènes synthétisés précédemment par effet template, on obtient tous les objets homochiraux racémiques. **4**<sub>3</sub> et **4**<sub>4</sub> homochiraux étant de symétrie C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> respectivement, les spectres RMN <sup>1</sup>H de **4**<sub>3</sub> et **4**<sub>4</sub> présentent un unique pic à 8,01 et 7,99 ppm dans le D<sub>2</sub>O à pD = 8,3 et 7,4 respectivement.

### Chiralité conformationnelle :

La deuxième source de chiralité est la chiralité conformationnelle : la présence des ponts disulfures confère aux macrocycles résultants des stéréoisomères de conformation.<sup>82</sup> Il est possible d'attribuer un stéréodescripteur *M* ou *P* pour chacun des ponts disulfures de l'hôte supramoléculaire selon le signe de l'angle dièdre du pont disulfure (figure 50) : l'état stable pour cet angle étant de 90°. <sup>86</sup> Ainsi, pour le trimère et pour le tétramère, il est possible de distinguer respectivement 4 et 6 stéréoisomères de conformation selon la chiralité de chaque pont disulfure. En solution, il y a néanmoins un équilibre entre les différents stéréoisomères de chiralité de conformation.

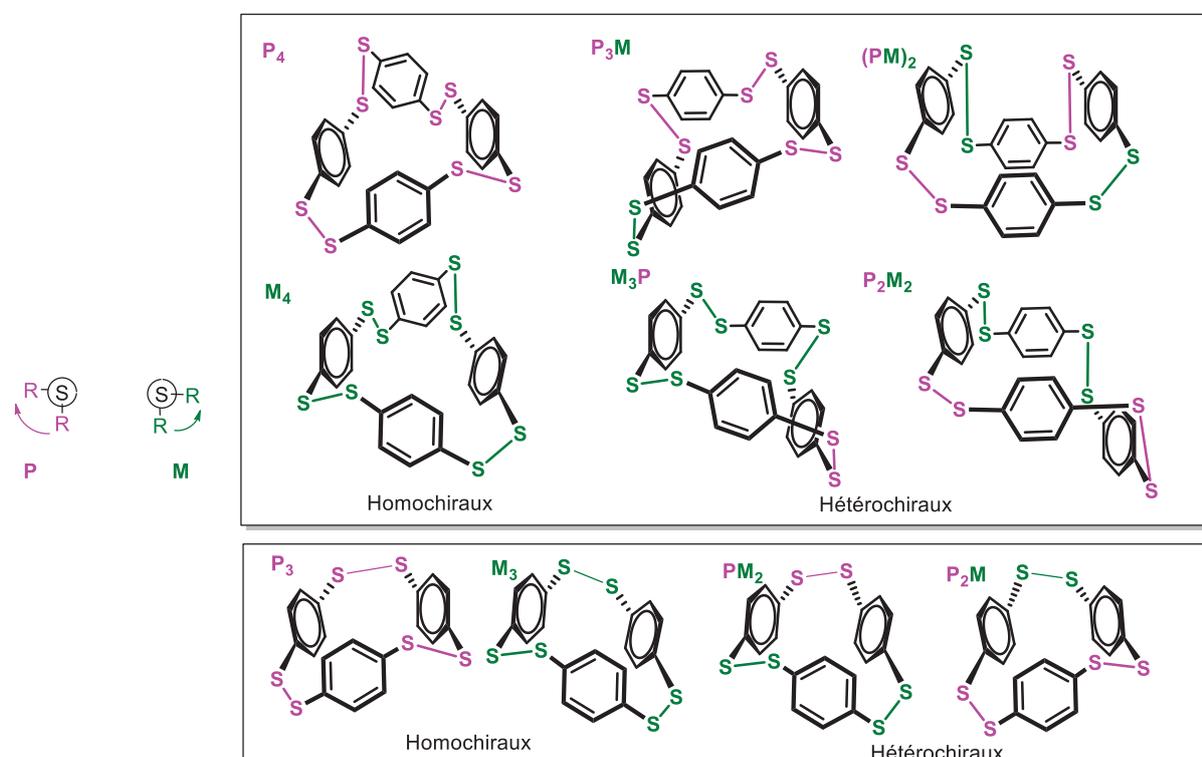


Figure 50 : Description des stéréodescripteurs de chiralité conformationnelle. Les acides carboxyliques ont été supprimés pour plus de clarté.

### ii) Analyse de l'état de charge en solution aqueuse

Le degré de protonation en fonction du pH a été déterminé par le Dr. Françoia à Montpellier. Pour cela, des titrations pH-métriques ont été effectuées. Les données obtenues indiquent que les dyn[n]arènes homochiraux isolés possèdent un état de protonation inférieur à 5% à pH = 7.4 (figure 51).<sup>85,87</sup> Dans ces mêmes conditions, on les considérera ainsi totalement déprotonés par la suite.

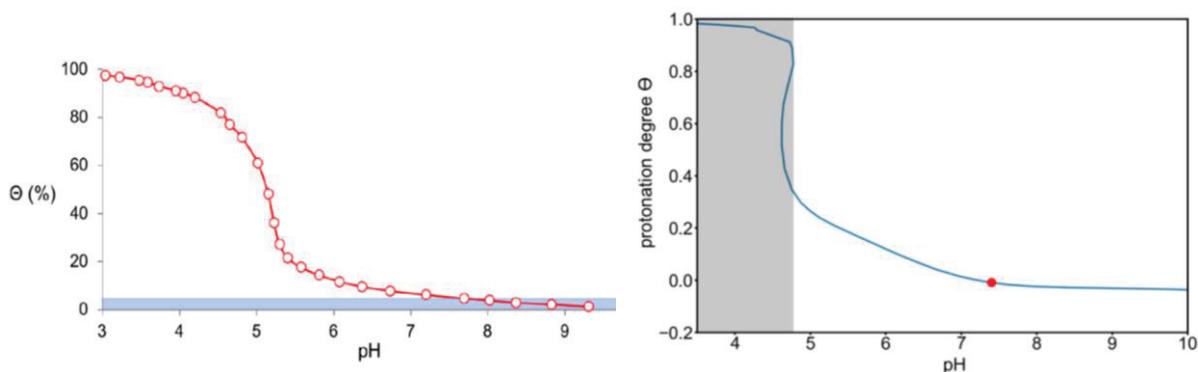


Figure 51 : Courbes de titration potentiométrique représentant le pourcentage d'espèce protonée en fonction du pH. A gauche : titration de **4<sub>3</sub>**. A droite : titration de **4<sub>4</sub>**.

### iii) Identification du volume de la cavité des dynarènes en solution par dynamique moléculaire

Des modélisations en dynamique moléculaire ainsi que des considérations géométriques, entreprises par le Dr. Jeamet dans l'équipe, ont permis d'apporter des informations structurales complémentaires sur le trimère **4<sub>3</sub>** et le tétramère **4<sub>4</sub>**. L'information capitale obtenue par analyse géométrique est le diamètre effectif maximal de la cavité : celle du trimère **4<sub>3</sub>** mesure 2,0 Å et celle du tétramère **4<sub>4</sub>** mesure 6,0 Å.<sup>82,85</sup> Ces distances sont à comparer avec le rayon atomique de l'atome de carbone mesurant 1,2 Å.<sup>88</sup> On conclut que le trimère **4<sub>3</sub>** possède une cavité de diamètre trop faible pour accueillir des composés organiques, car le diamètre est plus faible que celui du diamètre atomique du carbone. Le tétramère **4<sub>4</sub>**, quant à lui, possède un diamètre satisfaisant pour effectuer des complexes d'inclusion avec des composés organiques.

### iv) Analyse à l'état solide

Des campagnes de cristallisation des macrocycles ont été effectuées en collaboration avec le Pr. Huc, à partir de solutions concentrées (10 mM) de **4<sub>3</sub>** et **4<sub>4</sub>** avec des kits de cristallisation commerciaux en appliquant la méthode de la goutte pendante. Pour le trimère, les tentatives de cristallisation n'ont pas été concluantes : lorsque des cristaux ont été observés, ils ont été identifiés comme étant des résidus de **4<sub>4</sub>**. Pour le tétramère, les tentatives de cristallisation ont été concluantes. La structure cristallographique obtenue est présentée en figure 52.

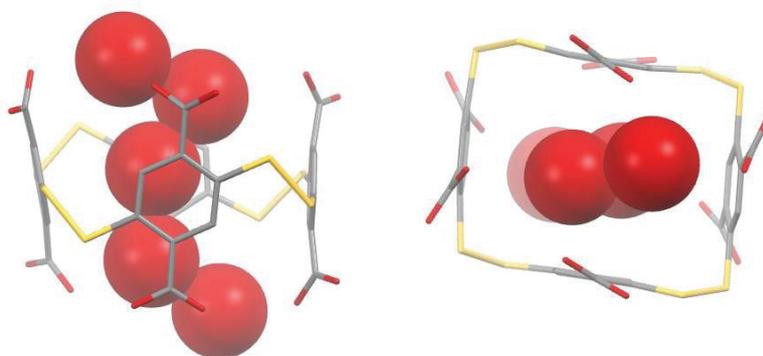


Figure 52 : Structure cristallographique de **4<sub>4</sub>**. Les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clartés. Les sphères rouges représentent les molécules d'eau présente dans la cavité.

Le tétramère cristallise dans un réseau monoclinique avec un groupe d'espace  $P2_1$ . Cette structure confirme la présence d'une cavité capable d'accueillir des molécules d'eau. On observe au sein de cette structure à l'état solide 5 molécules d'eau. On suppose que seule la molécule d'eau centrale est suffisamment éloignée de la sphère de solvatation et des acides carboxyliques pour être considérée « de haute énergie ». Des modélisations théoriques sont en cours au sein de l'équipe pour valider cette hypothèse. Au niveau de la maille cristalline, plusieurs informations structurales ont permis de comprendre la cohésion de la matière au sein du solide :

- L'analyse des faibles distances soufre-soufre intermoléculaire, entre acides carboxyliques ou encore entre systèmes  $\pi$  montrent la présence des interactions de Van Der Waals, liaisons hydrogène ou encore de  $\pi$ -stacking au sein de la maille cristalline.
- Les angles dièdres C-S-S-C sont relativement proches de  $90^\circ$  (figure 53). Ils sont proches de distance classique relevée sur les ponts disulfures, d'où un macrocycle peu contraint stériquement.<sup>89</sup> La conformation de chaque stéréoisomère en phase solide est  $P_4$  ou  $M_4$ . La position des acides carboxyliques décrit le stéréoisomère de configuration  $(pR)_4$ . On observe ainsi des macrocycles homochiraux dans la structure.
- On observe une cavité en forme de parallélépipède (figure 53) et non en forme de cube, comme supposé lors de dynamique moléculaire. On note une longueur de 8,8 Å et une largeur de 6,9 Å. Le diamètre maximal effectif de la cavité est utilisé par la méthode décrite par Han et al.<sup>90</sup> Cette valeur en obtenue en soustrayant au diamètre du cercle inscrit bleu deux fois le rayon d'un atome de carbone. Il en résulte une cavité de diamètre plus faible que trouvé initialement, de 4,5 Å. La valeur est légèrement inférieure à celle des macrocycles hydrosolubles décrits dans la partie bibliographique, mais est toujours suffisamment grande pour accueillir un invité de type organique.

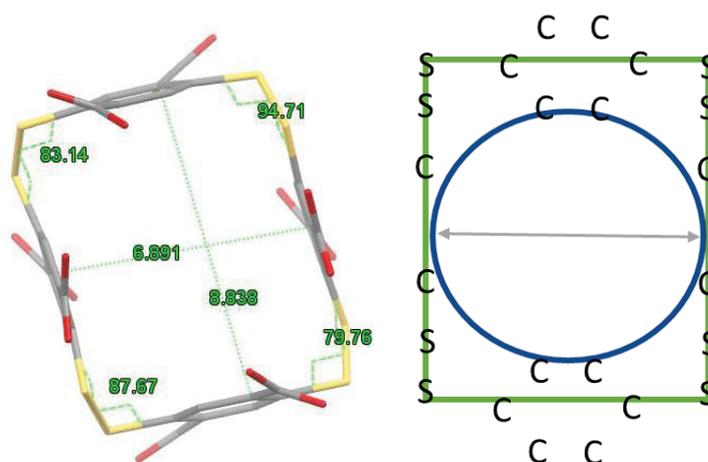


Figure 53 : A gauche, cliché cristallographique indiquant les distances et angles caractéristiques de  $4_4$  (les molécules d'eau sont omises). A droite, représentation schématique de la cavité pour la détermination du diamètre maximal effectif. Rectangle vert : forme de la cavité, cercle : cercle inscrit, axe gris : distance séparant les centroïdes aromatiques égaux à 6,9 Å.

## B) Etude autour de la brique 5

### a) Description de brique 5

L'acide 2,5-dimercaptobenzoïque **5** a été synthétisée pour obtenir de nouveaux macrocycles à l'aide de la chimie combinatoire dynamique. Il s'agit de la brique moléculaire en figure 54.

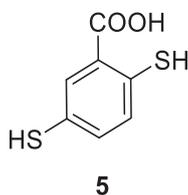


Figure 54 : formule topologique de l'acide 2,5-dimercaptobenzoïque **5**

Cette brique, comme la précédente, présente deux fonctions thiophénols en position para de manière à former des paracyclophanes analogues aux dyn[n]arènes précédemment isolés. La molécule **5** possède cependant un unique acide carboxylique sur le cycle aromatique. Ceci permettra de réduire la charge effective des dyn[n]arènes en espérant préserver la solubilité en milieu aqueux. Cette brique est déjà décrite dans la littérature pour des applications dans la régulation du taux d'agrégation de nanoparticules d'or colloïdal tout en contrôlant le pH du système.<sup>83,91</sup> La stratégie de synthèse est identique à celle de la brique **4**. La formation des S-thiocarbamate est décrite avec un rendement de 90%. Le réarrangement de Newman-Kwart, effectué dans le diphenyléther à 240°C par activation thermique est réalisé avec un rendement de 70%. La formation des thiols en milieu basique est effectuée avec un rendement de 74%. Le rendement global de cette synthèse s'élève à 46%. La brique nous a été fournie après synthèse par le Dr. Yoann Pascal.

### b) Identifications des macrocycles $5_n$ – étude sans template

Une chimiothèque a été générée à l'aide de la brique **5** dissoute à 4 mM dans un milieu aqueux à pH = 7.4, à température ambiante et sans *template*. La figure 55 suivante présente le suivi cinétique en HPLC de la chimiothèque, après identification des espèces en LC-MS.

Après disparition de la brique initiale **5**, on observe formation des espèces intermédiaires linéaires  $5_{2-L}$  et  $5_{3-L}$  ainsi que les macrocycles  $5_3$  et  $5_4$ . Après 6 heures de réaction, le système atteint l'état d'équilibre puisque les intégrations sont similaires après 24 heures et que les thiols ont totalement réagi. Le macrocycle  $5_3$  est formé à 10% dans la bibliothèque, tandis que la macrocycle  $5_4$  est formé à 90%, comme montré par les figures 55 et 56.

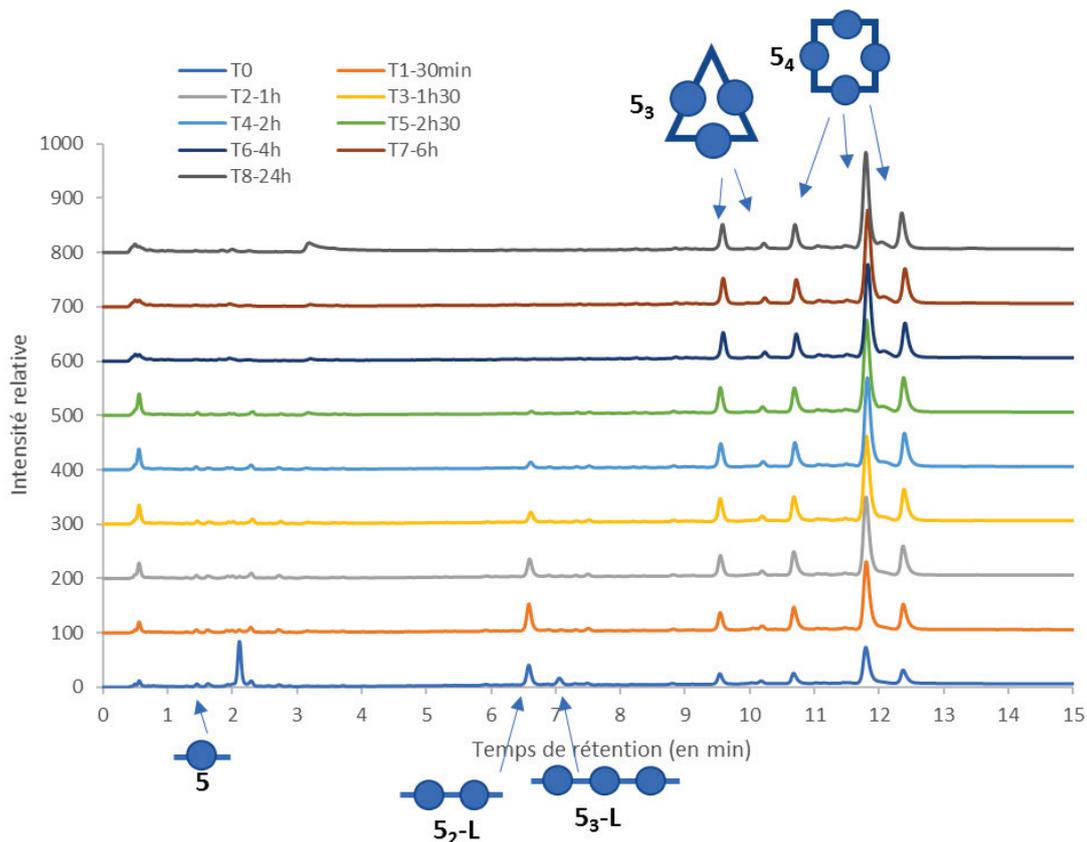


Figure 55 : suivi cinétique HPLC de la chimiothèque obtenue à partir de la brique 5 en absence de template

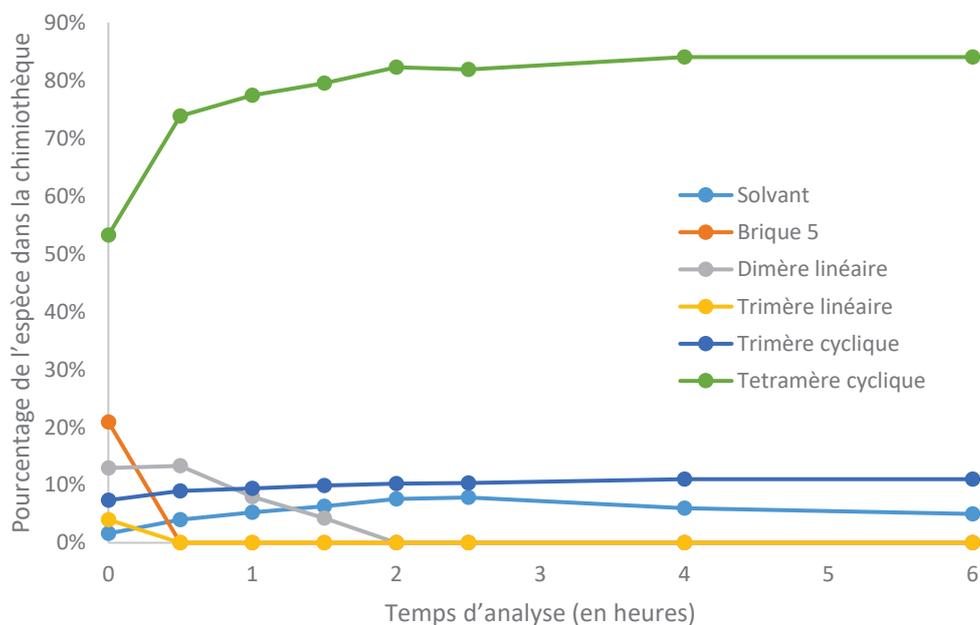


Figure 56 : Proportion des espèces dans la chimiothèque de la brique 5 sans template étudiée en fonction du temps

En effet, après analyse en LC-MS, différents pics sont attribués à des espèces isomasses. On obtient donc sur le chromatogramme différents pics correspondant à différents stéréoisomères d'une même espèce : le trimère  $5_3$  est observé sous deux stéréoisomères (dont un seul en proportion significative). Structuellement, nous avons dénombré la présence de 10 stéréoisomères présentés sur la figure 57 dans le cas où la libre rotation est impossible (figure 57). Pour cette libre rotation, deux cas sont possibles : une libre rotation CH vers CR ou CR vers CH (figure 58). La rotation CR vers CH semble impossible, mais la rotation CH vers CR peut être possible : dans ce cas, les structures du groupe 1 de la figure 57 sont un seul stéréoisomère (homochiral) et les structures du groupe 2 de la figure 57 sont aussi un seul stéréoisomère (hétérochiral). Pour le tétramère  $5_4$ , le chromatogramme montre la présence de 3 stéréoisomères dont un très préférentiel (plus de 50% de la proportion de la chimiothèque). La cavité de  $5_4$  étant de plus grande taille, la libre rotation CH vers CR est supposée possible et on dénombre 4 stéréoisomères : un homochiral et trois hétérochiraux.

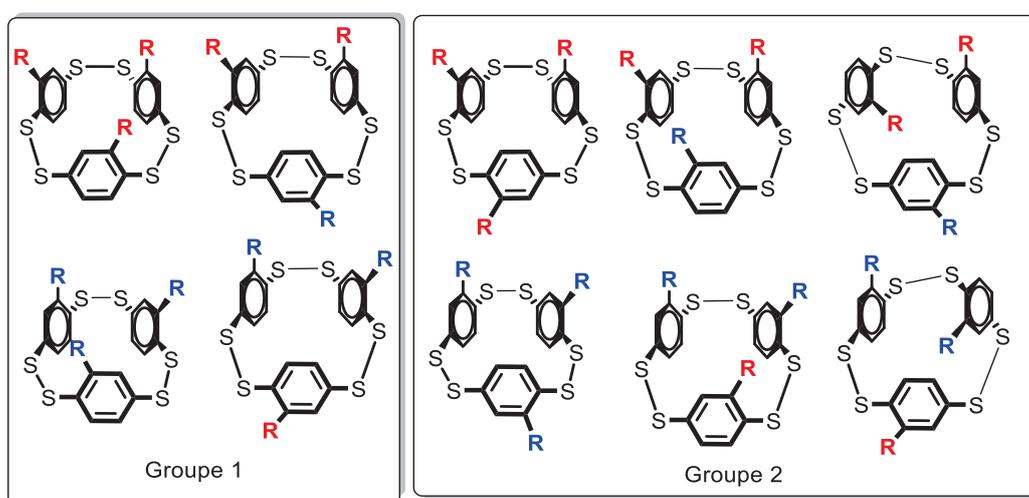


Figure 57 : différents stéréoisomères de  $5_3$

Rotation CR vers CH

Rotation CH vers CR

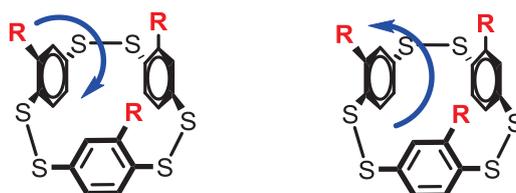


Figure 58 : analyse des modes de rotation dans le macrocycle  $5_3$  et analyse des distances par considérations géométriques.

La bibliothèque exploite le dioxygène de l'air pour oxyder les thiols en ponts disulfures sous contrôle thermodynamique puisque l'équilibre des réactions réversibles (oxydation des thiols et échange des disulfures) est identifié. Dans la littérature, on recense des bibliothèques utilisant le diiode comme oxydant.<sup>92</sup> Le produit final obtenu à l'issue de ces chimiothèques peut être différent du produit obtenu à l'issue d'une oxydation au dioxygène. Ainsi, une oxydation au diiode a été conduite pour tester cette voie synthétique alternative. La quantification des espèces révèle une légère modification des proportions des macrocycles au sein de la nouvelle chimiothèque (tableau 4).

Oxydant	5 <sub>3</sub> (%)	5 <sub>4</sub> (%) t <sub>r</sub> = 10,6 min	5 <sub>4</sub> (%) t <sub>r</sub> = 11,8 min	5 <sub>4</sub> (%) t <sub>r</sub> = 12,3 min
O <sub>2</sub>	10	9	56	19
I <sub>2</sub>	0	27	55	18

Tableau 4 : proportion des stéréoisomères 5<sub>3</sub> et 5<sub>4</sub> dans des chimiothèques avec différents oxydants. La grandeur t<sub>r</sub> indique le temps de rétention du stéréoisomères sur le chromatogramme HPLC.

Dans le cas du diiode, le trimère 5<sub>3</sub> n'est observé, car on forme exclusivement trois des stéréoisomères du macrocycle 5<sub>4</sub>. La principale modification des proportions vient de l'espèce tétramérique qui élue la plus vite et qui croît de 9% à 27%. On peut ainsi modifier les proportions par changement d'oxydant.

### c) Identifications des macrocycles 5<sub>n</sub> – étude avec template

L'objectif suivant a été de réaliser des chimiothèques en présence de template. 24 templates ont été testés de manière à essayer de modifier les proportions des macrocycles 5<sub>n</sub> dans les chimiothèques. Leurs structures sont présentées en figure 59.

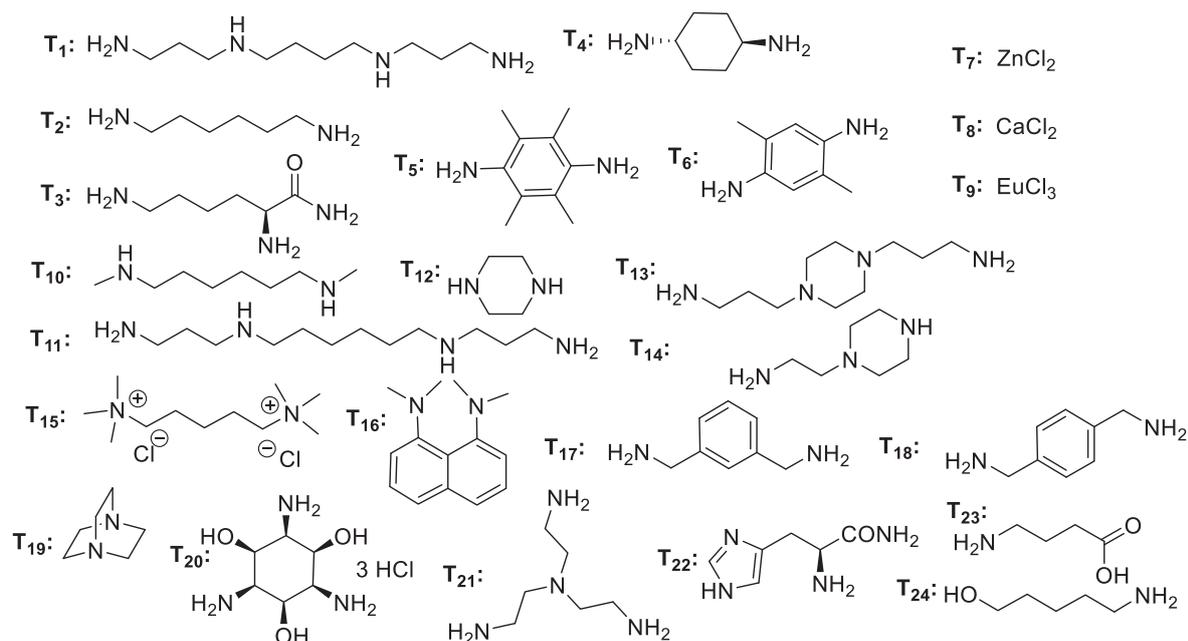


Figure 59 : Structure des templates utilisés

Chaque bibliothèque est produite à partir de la brique 5 à 4 mM et d'un *template* T à 1 mM dans l'eau à pH = 7.4. Les proportions en macrocycles obtenus à l'état d'équilibre dans chacun des cas ont été mesurées par analyse HPLC et sont résumées en annexe A. Le tableau 5 rappelle la distribution sans *template*, ainsi que les variations les plus fortes observées pour les ratios 5<sub>3</sub>/5<sub>4</sub> en présence de templates. Ce ratio reste proche de 0,12 dans chaque cas, ne témoignant d'aucune modification significative du système. Ainsi, parmi les 24 templates testés, il n'a pas été possible d'amplifier un stéréoisomère de l'un ou l'autre des macrocycles produits.

Template	5 <sub>3</sub> (%)	5 <sub>4</sub> (%)	5 <sub>3</sub> /5 <sub>4</sub>
Sans template	10	84	0.12
T <sub>11</sub>	4	80	0.05
T <sub>20</sub>	12	86	0.14

Tableau 5 : Modifications des proportions de macrocycles 5<sub>3</sub> et 5<sub>4</sub> sous l'influence d'un template.

On observe donc que pour deux briques sensiblement proches structurellement (5 et 4), leur comportement face aux mêmes templates est considérablement différent.

### C) Etude des bibliothèques mixtes avec les briques 4 et 5

#### a) Identifications des macrocycles 4<sub>m</sub>5<sub>n</sub>

Nous avons utilisé les briques 4 et 5 dans une nouvelle bibliothèque. L'idée est d'observer si les deux systèmes réagissent de façon indépendante (« self-sorting » : on forme uniquement des homomacrocycles 4<sub>m</sub> et 5<sub>n</sub> sans interactions entre les deux briques) ou alors, observer la formation d'hétéro-oligomères issus de la réaction entre la brique 4 et la brique 5. Une première campagne, à 2 mM en chacune des briques, a été effectuée sans template. Lors de la mise en solution de ces deux briques, on observe un état d'équilibre au bout de 5 heures 30, correspondant au chromatogramme HPLC suivant (figure 60).

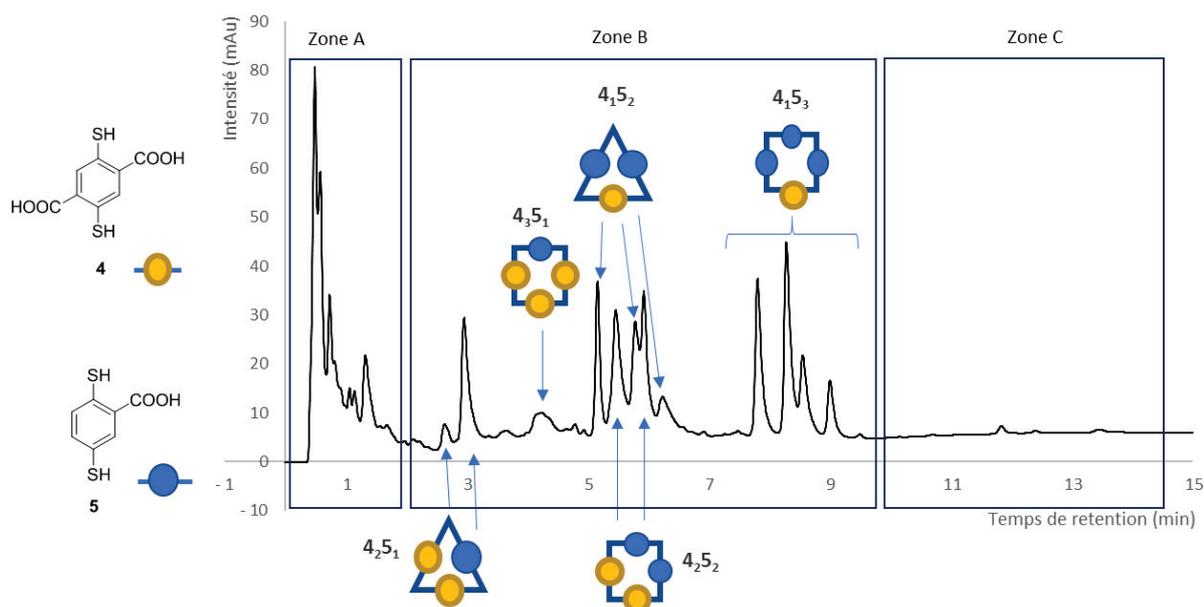


Figure 60 : Analyse HPLC de la bibliothèque mixte entre 5 et 4 à l'état d'équilibre

Ce chromatogramme est décomposé en trois zones : la zone A, aux temps de rétention compris entre 0 et 2 minutes, présente le pic d'injection et les homo-oligomères de type 4<sub>n</sub>. La zone B, au temps de rétention compris entre 2 et 9,5 minutes, regroupe les hétéro-oligomères de type 4<sub>m</sub>5<sub>n</sub>. La zone C, pour des temps de rétention compris entre 9,5 minutes et 15 minutes, regroupe les espèces 5<sub>n</sub>. Cette méthode HPLC est satisfaisante pour l'analyse souhaitée de la zone B. Pour quantifier, nous avons postulé que les coefficients de réponse sont similaires pour chacune des espèces. Ainsi, l'aire sous la courbe reflète directement les proportions de chaque espèce.

Il n'y a pas de phénomène de « self-sorting », car on observe la formation de nouvelles espèces macrocycliques. Les différentes séquences de macrocycles de taille 3 et 4 de type  $4_m5_n$  qu'il est possible de former ont pu toutes être identifiées dans différentes proportions et sous différents stéréoisomères. L'élution appliquée retient les espèces les moins hydrophiles : les macrocycles les plus riches en brique **4** sont présents à des temps de rétention faible due à leur fort caractère hydrophile, et les macrocycles les plus riches en brique **5** sont présents à des temps de rétention plus élevée due à leur faible caractère hydrophile. Le tableau 6 présente les pourcentages de chacun de ces macrocycles. Pour simplifier l'étude, les données sont résumées sans distinguer les différents stéréoisomères observés et les stéréoisomères  $4_15_2$  et  $4_25_2$  ont été regroupés les pics observés pour ces espèces se superposent. On note 65% de la population correspondant à ces espèces mixtes.

Etude sans template	$4_25_1$ (%)	$4_35_1$ (%)	$4_25_2 + 4_15_2$ (%)	$4_15_3$ (%)
Oxydation au dioxygène	8	15	14	28

Tableau 6 : Proportions des espèces  $4_m5_n$  dans la chimiothèque sans template

### b) Utilisation de template

L'objectif suivant a été d'identifier à nouveau, avec le même panel de template ( $T_1$  à  $T_{24}$ ) s'il était possible d'amplifier une espèce mixte. De nouvelles bibliothèques ont donc été préparées à 2mM en brique **4**, 2 mM en brique **5** et 1 mM en template **T**. Contrairement aux chimiothèques basées sur la brique **5** seule, différentes amplifications sont observées selon les templates. Nous allons détailler quelques-uns de ces cas particuliers dans le tableau 7, tous les autres cas sont décrits en annexe A.

Template	$4_25_1$	$4_35_1$	$4_25_2 + 4_15_2$	$4_15_3$	$5_n$	Espèces en zone A dont $4_n$
Sans template	8	15	14	28	1	34
$T_9$	3	8	18	5	<b>22</b>	<b>45</b>
$T_1$	<b>17</b>	19	26	16	1	20
$T_{15}$	0	17	<b>59</b>	7	0	16

Tableau 7 : proportions des macrocycles  $4_m5_n$  dans différentes chimiothèques.

$T_9$ ,  $T_7$  et  $T_{20}$  sont capables d'amplifier de l'espèce  $5_4$ , alors que sans template l'espèce  $5_4$  était présente à l'état de trace. En particulier,  $T_9$  ( $\text{EuCl}_3$ ) est capable d'amplifier  $5_4$  à 20% dans la bibliothèque au détriment de l'espèce  $4_15_3$  qui décroît drastiquement. Certains templates ( $T_{11}$  et  $T_{22}$ ) sont capables de réduire fortement la proportion d'espèces de type  $4_n$  en amplifiant les espèces  $4_35_1$ ,  $4_25_2$  et  $4_15_2$  alors que  $T_6$  les amplifient considérablement au détriment de chacune des autres espèces. Ensuite, les templates  $T_1$  et  $T_{23}$  augmentent considérablement la proportion du macrocycle  $4_25_1$  au sein de la bibliothèque par rapport au cas sans template. Enfin, la majorité des templates exalte fortement la proportion des deux macrocycles  $4_25_2 + 4_15_2$  au détriment des autres : les templates  $T_{24}$  et  $T_{15}$  sont capables d'amplifier à près de 60% ces macrocycles, ce qui multiplie leur proportion d'un facteur 4 par rapport au cas sans template. Néanmoins, aucun template n'a été capable d'amplifier une seule et unique forme.

En conclusion, nous avons mis en évidence une différence de comportement lors de la mise en solution des briques **4** et **5** en présence de templates, structurellement proches, dans les chimiothèques. Les différentes chimiothèques présentées dans cette première partie ont permis d'observer la formation de divers dyn[n]arènes avec n compris entre 3 et 5. Cependant, seuls deux macrocycles ont été isolés : le dyn[3]arène hexacarboxyle **4<sub>3</sub>** et le dyn[4]arène octacarboxyle **4<sub>4</sub>**.

## II) Interactions des dynarènes polycarboxylates avec des diamines d'intérêt biologique

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons évoqué la reconnaissance de polyammoniums d'intérêt biologique pour de potentielles applications thérapeutiques. Nous allons dans un premier temps analyser les interactions des dynarènes avec une série d' $\alpha,\omega$ -alkyldiammonium **6<sub>x</sub>** où x représente le nombre d'unités  $-\text{CH}_2-$ , puis ensuite étudier le cas des polyamines spermine et spermidine.

### 1) Cas des diamines

#### A) Présentation de l'étude

Dans cette partie, nous étudierons la complexation d'une série de diamines **6<sub>x</sub>**, où x représente le nombre d'atomes de la chaîne carbonée (de l'éthanediamine **6<sub>2</sub>** à l'octanediamine **6<sub>8</sub>**) par les macrocycles **4<sub>3</sub>** et **4<sub>4</sub>**. Les études seront effectuées à pH = 7,4 : les récepteurs seront anioniques totalement déprotonés sous forme de carboxylates, les diamines seront totalement protonées sous forme de diammonium.

D'après le modèle « clé-serrure », les cas de la putrescine **6<sub>4</sub>** (ou butanediamine) ou cadaverine **6<sub>5</sub>** (ou pentanediamine) seraient les plus favorables à la complexation d'un point de vue purement électrostatique d'après la figure 61 : la distance entre les carboxylates de la brique **4** est de 7,2 Å alors que de la distance entre les ammoniums de la butanediamine **6<sub>4</sub>** est de 6,3 Å et pour la pentanediamine **6<sub>5</sub>** de 7,5 Å.

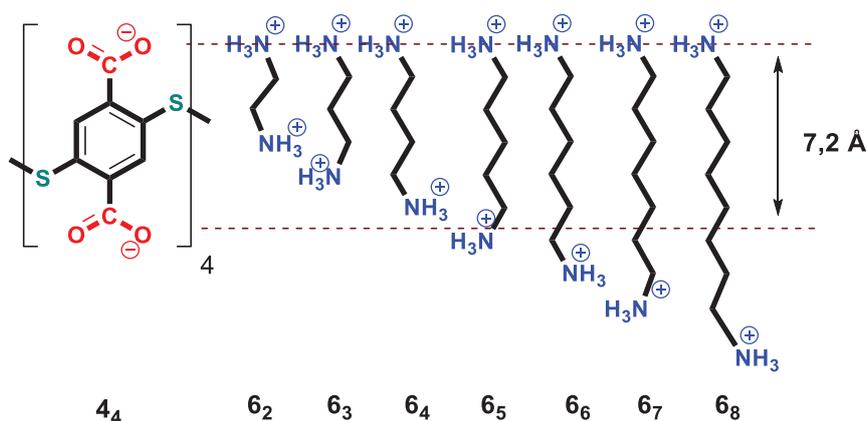


Figure 61 : analyse de distances sur la brique **4** et les diamines **6<sub>x</sub>**

## B) Cas du trimère $4_3$

Nous allons nous intéresser à la complexation des  $\alpha,\omega$ -alkyldiammonium par le trimère  $4_3$ . Le résumé de ces réactions est présenté à la figure 62, supposant la formation d'un appariement hors cavité.

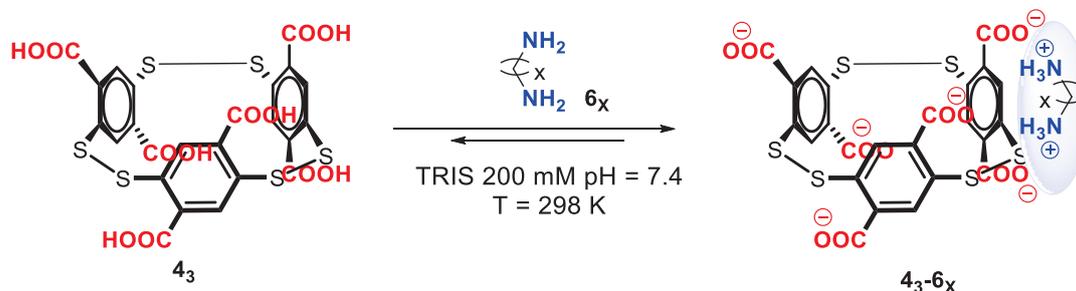


Figure 62 : réaction de complexation entre  $4_3$  et les polyamines  $6_x$

Une première série d'expériences, à 1 mM en hôte dans le  $D_2O$  à pD ajusté à 8.3, a consisté à comparer les spectres RMN  $^1H$  entre les différents partenaires du système isolés et en mélange. Le cas de la propanediamine  $6_3$  est présenté en figure 63. On observe un blindage du proton, par une diminution du déplacement chimique correspondant aux systèmes de protons a et b par passage de la forme libre à la forme liée, témoignant d'une association. Il semblerait que ces protons soient affectés par les interactions électrostatiques entre les ammoniums et les carboxylates, ainsi que la présence des protons dans le cône de blindage des aromatiques du récepteur. Cette indication indique a priori une complexation hôte-invité. Les variations de déplacement chimique pour la complexation de deux autres diamines sont présentées dans le tableau 8.

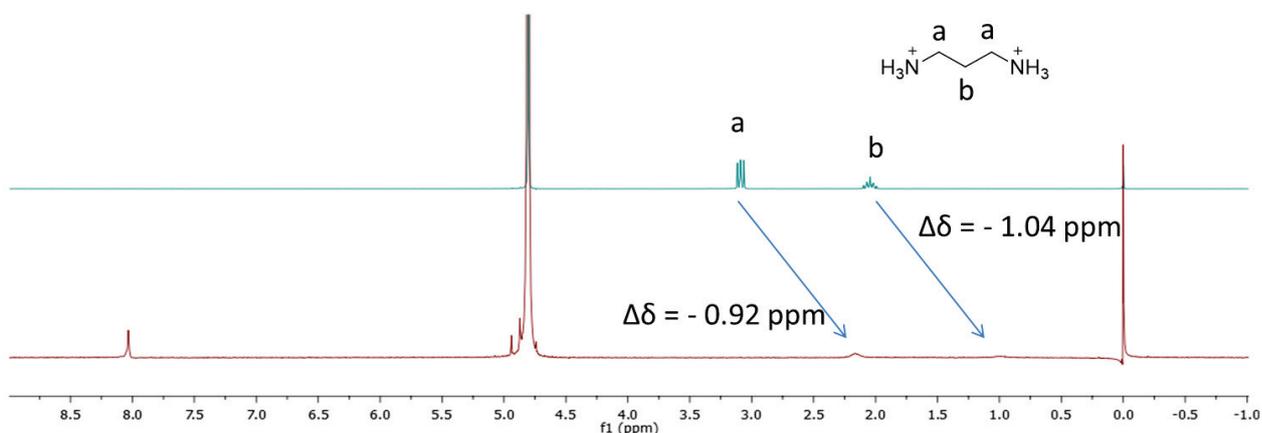


Figure 63 : spectre RMN  $^1H$  de la forme libre de la propanediamine 1 mM (en haut) et de la forme complexée dans lors de l'association  $4_3$  – propanediamine  $6_3$  (en bas) à 1 mM dans le  $D_2O$  à pD = 8,3.

Diamines	$6_3$	$6_6$	$6_8$
$\Delta\delta$ (ppm)	-0,92	-0.58	-0.39
	-1,04	-0.80	-0.64
		-1.05	-0.96
			-1.40

Tableau 8 : variation de déplacement chimique des protons portés par les carbones des diamines lors de l'association du trimère  $4_3$  avec la propanediamine  $6_3$ , l'hexanediamine  $6_6$  et l'octanediamine  $6_8$ .

Des expériences de titrations ITC ont ensuite été effectuées dans le TRIS 200 mM à pH 7,4 (annexe C). Pour la majorité des thermogrammes obtenus avec les diamines (excepté l'heptanediamine **67**), l'intégration des pics correspondant aux dégagements de chaleur ne témoigne pas d'une association avec **43** : les dégagements de chaleur mesurés correspondent à l'énergie de la dilution du ligand (figure 64). Ces associations ne semblent pas mesurable par ITC, mais par RMN uniquement. Ainsi on suppose des constantes d'association inférieures à  $10^2 \text{ M}^{-1}$  qui est la limite de détection de l'ITC.

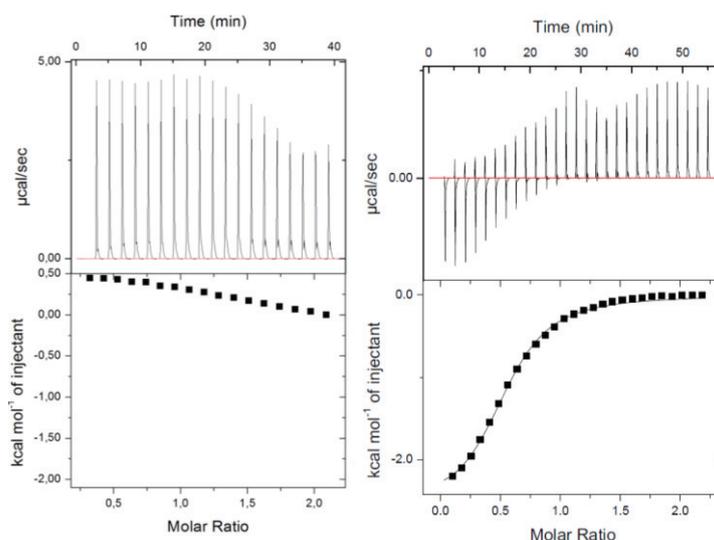


Figure 64 : comparaison des thermogrammes obtenus avec le trimère **43** : à gauche cas de l'éthylenediamine **62**, à droite cas de l'heptanediamine **67**

Dans le cas de l'heptanediamine **67**, un profil de type sigmoïde est obtenu lors de la titration avec le macrocycle **43**. Les données obtenues sur un triplicat de mesures sont :

- Une valeur de  $n = 0,5$ , soit une association 2 macrocycles pour 1 ligand.
- Une constante d'association moyenne  $K = 1,61 \cdot 10^4 \pm 0,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-2}$ .
- Une enthalpie de complexation  $\Delta H = -9,17 \pm 1,54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
- Un terme entropique de complexation  $-T\Delta S = -14,79 \pm 0,18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

La complexation est ainsi favorisée à la fois entropiquement et enthalpiquement, avec une domination du premier terme. Les contributions entropiques majeures que l'on peut supposer intervenir ici sont l'effet hydrophobe classique, ainsi que la formation de ponts salins. Il est difficile d'expliquer pourquoi seule l'heptanediamine est complexée par **43**, mais nous proposons un mode de complexation où les couronnes polaires de deux **43** sont capables de complexer chacune des extrémités de l'heptanediamine.

Les modes de complexation de la propanediamine **63** avec le dyn[3]arène **43** ont été modélisés par dynamique moléculaire par Dr. Jeamet (figure 65). Ces résultats indiquent une complexation hors selon différents modes. Ces complexations sont en accord avec les blindages observés en RMN. Il montre que la propanediamine se comporte comme un ligand monodentate ou bidentate selon les complexes observés.

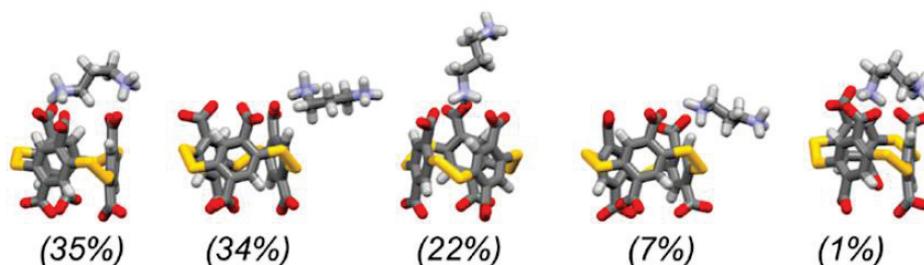


Figure 65 : structures 3D des complexes formés à partir du cavitand  $4_3$  de configuration  $(pS)_3$  avec la propanediamine  $6_3$  obtenus par simulation en Dynamique Moléculaire de 100 ns à 300 K et à pression constante. Le pourcentage quantifie la durée d'observation d'un complexe sur la trajectoire.

### C) Cas du tétramère $4_4$

#### a) Résultats expérimentaux

Nous allons maintenant étudier de façon analogue les complexations entre le tétramère  $4_4$  et les diamines  $6_x$ . Le schéma de la complexation est présenté en figure 66.

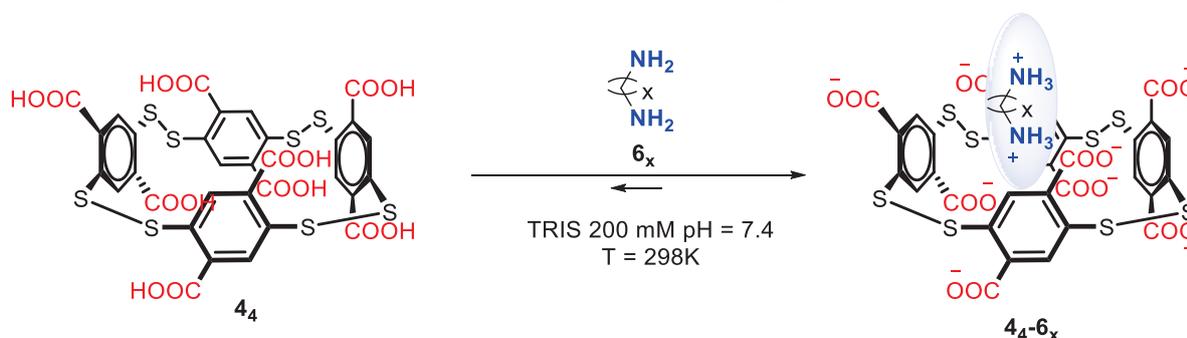


Figure 66 : Schématisation de la complexation entre  $4_4$  et les polyamines  $6_x$  en solution aqueuse

Les comparaisons qualitatives entre les spectres RMN  $^1H$  des constituants seuls et en mélange ont d'abord été effectuées. Le cas de la propanediamine  $6_3$  est présenté en figure 67. Les signaux correspondant aux protons aliphatiques de  $6_3$  sont fortement blindés en présence de cavitand jusqu'à atteindre des valeurs négatives. Ce blindage est observé pour chacune des diamines étudiées allant de -0,57 ppm à -3,05 ppm en valeur absolue. (Cf. tableau 9). Ces blindages sont plus importants que dans le cas de  $4_3$  et corrèle avec la formation d'un complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane : l'origine de ce blindage, plus important pour les protons centraux de la diamine due à leur présence au centre des cônes de blindages des aromatiques du cavitand.

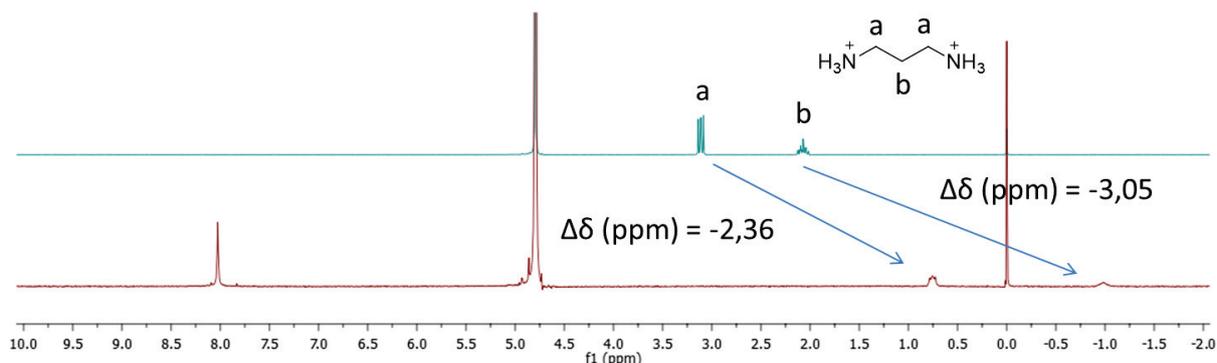


Figure 67 : spectre RMN  $^1H$  de la propanediamine  $6_3$  et du complexe  $4_4-6_3$ .

Diamines	<b>6<sub>2</sub></b>	<b>6<sub>3</sub></b>	<b>6<sub>4</sub></b>	<b>6<sub>5</sub></b>	<b>6<sub>6</sub></b>	<b>6<sub>7</sub></b>	<b>6<sub>8</sub></b>
$\Delta\delta$ (ppm)	-1,65	-2,36	-1,38	-1,52	-1,12	-0,87	-0,57
		-3,05	-1,81	-2,43	-1,91	-1,52	-1,20
				-2,71	-2,58	-2,14	-1,78
						-2,83	-2,38

Tableau 9 : variation de déplacement chimique des protons portés par les carbones des diamines lors de l'association du tétramère **4<sub>4</sub>** avec les diamines.

Ensuite, une étude en ITC a été effectuée dans le tampon TRIS 200 mM à pH = 7,4 et à 298 K (thermogramme annexe C). Pour chaque diamine, des mesures ont été effectuées en triplicat. Une sigmoïde a été obtenue dans chaque cas avec des données validées par les critères de validité des ITC (analyse de  $\Delta K/K$  et du facteur de sigmoïde « c »). Les grandeurs thermodynamiques sont présentées sur la figure 68.

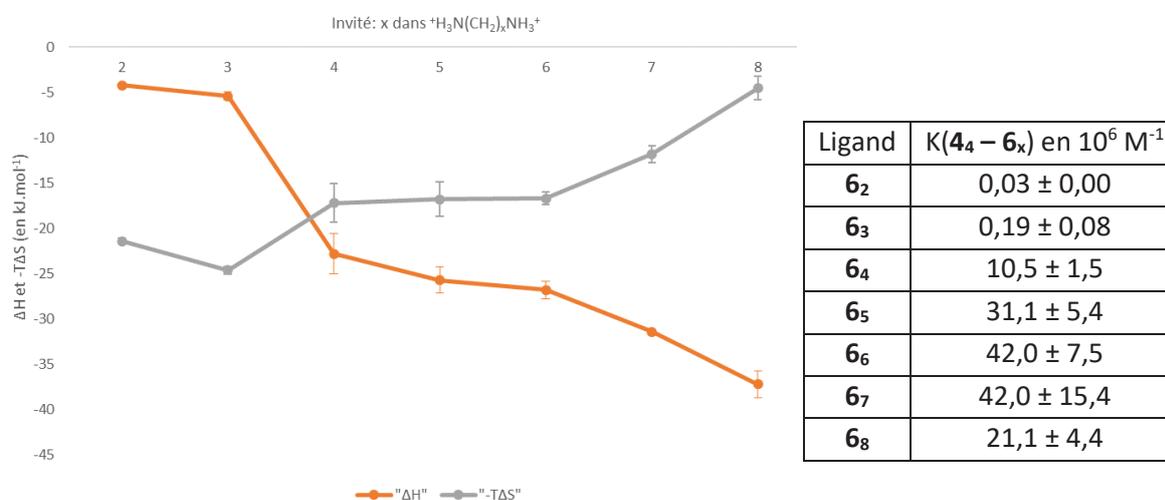


Figure 68 : Evolution des entropies et enthalpies de complexation avec la longueur de la chaîne carbonée des diamines **6<sub>x</sub>** lors de la formation de supramolécule avec **4<sub>4</sub>**. Tableau résumant les constantes d'association entre **4<sub>4</sub>** et **6<sub>x</sub>**.

Les stœchiométries obtenues sont systématiquement de 1 :1 avec un complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane. Les constantes d'association augmentent globalement avec la longueur de la chaîne. On obtient un maximum pour l'hexanediamine **6<sub>6</sub>** et l'heptanediamine **6<sub>7</sub>** avec des constantes d'association de  $4,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Ceci est en désaccord le modèle clé-serrure et montre à nouveau ses limites de ce modèle. A nouveau, la complexation est à la fois favorisée enthalpiquement et entropiquement. On observe en outre, une compensation enthalpie-entropie sauf pour les petites diamines ( $n=2$  et  $n = 3$ ). On observe une enthalpie de complexation qui diminue et un terme énergétique lié à l'entropie ( $-T\Delta S$ ) qui augmente avec la longueur de la chaîne. Ces tendances seront interprétées à l'aide des résultats obtenus en chimie théorique par le Dr. Jeamet.

#### b) Comparaison des données expérimentales et théoriques

Il faut noter que les modélisations ont été effectuées à l'aide de deux approximations majeures sur la thermodynamique du système. En effet, elles ne prennent pas en compte l'entropie des molécules d'eau, ni l'adaptation conformationnelle des dynarènes lors du phénomène de complexation. Les valeurs relatives sont ainsi plus précises : nous nous intéresserons à des variations

d'entropie ( $\Delta\Delta H$ ) et d'enthalpie ( $-T\Delta\Delta S$ ) entre les différents complexes en prenant la pentanediamine  $\mathbf{6}_5$  comme référence. Les résultats théoriques suivent la même tendance que les résultats expérimentaux (figure 69) : ceci permet de valider l'hypothèse selon laquelle la contribution entropique des molécules d'eau et l'adaptation conformationnelle n'a pas d'impact sur les sélectivités observées. Les résultats théoriques pourront donc apporter les informations structurelles complémentaires sur la complexation.

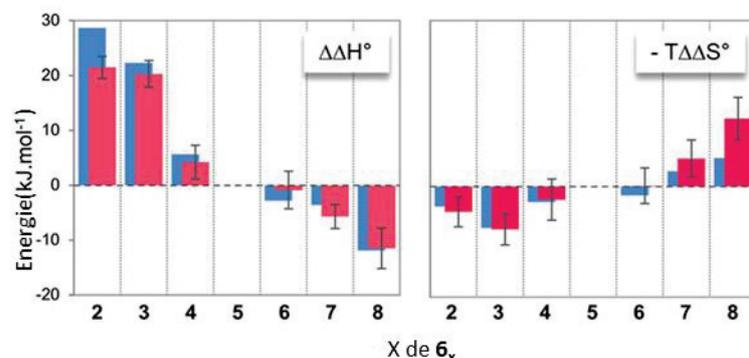


Figure 69 : Variations d'entropie et d'enthalpie entre  $\mathbf{4}_a$  et les diamines  $\mathbf{6}_x$ . La pentanediamine  $\mathbf{6}_5$  est utilisée comme référence. En rouge, les résultats expérimentaux et en bleu les résultats issus des modélisations.

### c) Retour sur le modèle clé-serrure

Comme mentionné précédemment, le modèle clé-serrure repose sur une complémentarité électronique et géométrique entre les partenaires de complexation. La figure 70 présente l'évolution de la somme de l'inverse des distances moyennes entre les charges ponctuelles au sein du complexe hôte-invité selon la longueur de chaîne du ligand et l'évolution de la surface accessible au solvant (SASA), données extraites des trajectoires de dynamique moléculaire.<sup>87</sup>

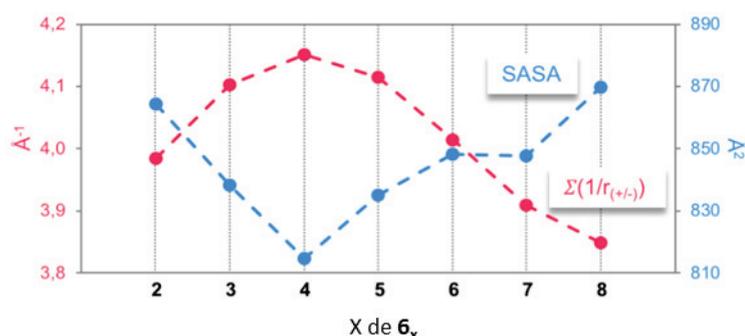


Figure 70 : Evolution des grandeurs mises en jeu dans le modèle clé-serrure en fonction de la taille de la diamine  $\mathbf{6}_x$ .

L'analyse de la SASA montre une minimisation de surface pour la butanediamine  $\mathbf{6}_4$ , prouvant une complémentarité géométrique au sein de l'édifice hôte-invité. L'analyse des distances entre les charges souligne une maximisation de la complémentarité électronique pour le cas de la butanediamine  $\mathbf{6}_4$ . Ce résultat va à l'encontre des résultats expérimentaux, où l'hexanediamine  $\mathbf{6}_6$  et

l'heptanediamine **6**<sub>7</sub> sont les cas optimaux. Il semblerait que la solvatation et la désolvatation jouent un rôle dans les sélectivités étudiées.

#### d) Considération des effets de solvant

Nous allons reprendre la démarche présentée en partie bibliographique (figure 25) pour analyser les entropies et enthalpies liées à la solvatation/désolvatation.

Analyse entropique : Expérimentalement, nous avons vu que la réaction était entropiquement favorisée. Ce phénomène est principalement associé à la perte de degrés de liberté translationnel et rotationnel par passage de la forme libre du diammonium à la forme liée. On observe cependant que plus la diamine est longue, plus l'énergie associée à l'entropie augmente. Les évolutions de la variation d'entropie globale ( $-T\Delta\Delta S^\circ$ ) et la variation d'entropie de l'association en phase gaz ( $-T\Delta\Delta S^\circ_{\text{assoc.}}$ ) présentées à la figure 71 ont une forte correspondance. Ceci confirme que les termes  $-T\Delta S^\circ_{\text{resolv}}$  et  $-T\Delta S^\circ_{\text{desolv}}$  qui englobent l'effet hydrophobe classique et ainsi que l'énergie liée à la libération des molécules d'eau des parties polaires se compensent en première approximation le long de la série d'invités.

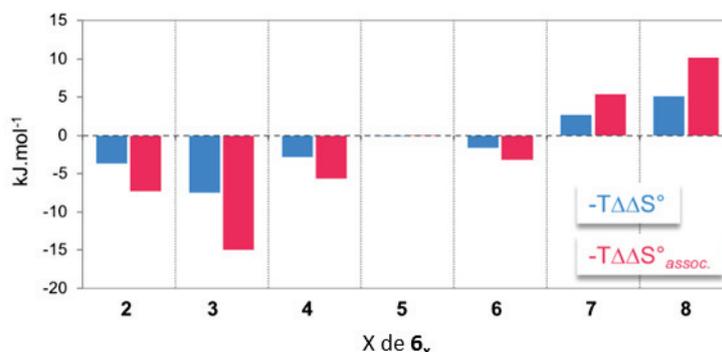


Figure 71 : Variation du terme entropique de la réaction de complexation en solution aqueuse  $-T\Delta\Delta S^\circ$  (bleu) et variation du terme entropique de la réaction d'association en phase gazeuse  $-T\Delta\Delta S^\circ_{\text{assoc.}}$ . La pentanediamine **6**<sub>5</sub> est prise comme référence.

Analyse enthalpique : Expérimentalement, l'enthalpie globale de la réaction était négative et décroissante avec la taille de la diamine.

- L'enthalpie de l'association en phase gaz ( $\Delta H^\circ_{\text{assoc}}$ ) augmente avec la longueur de la chaîne de l'invité x (figure 72). Elle est principalement de nature électrostatique, mais cette contribution électrostatique est de moins en moins marquée avec la longueur de la chaîne carbonée x (gris clair, figure 72). Cette tendance s'explique par la croissance de l'effet inductif de la chaîne carbonée sur les groupements ammoniums terminaux, ce qui atténue progressivement les interactions carboxylates-ammoniums. Cependant, des interactions de Van Der Waals (dispersion) et des interactions de type CH- $\pi$  entre l'axe aliphatique de la diamine et les noyaux aromatiques des macrocycles ont un effet compensateur au sein de la structure pseudo-rotaxane (gris foncé, figure 72). Ces contributions sont néanmoins trop faibles par rapport aux contributions électrostatiques. L'enthalpie globale étant du même signe que  $\Delta H^\circ_{\text{assoc}}$ , ce terme gouverne donc l'affinité au sein du complexe, mais pas les sélectivités entre diamines : l'enthalpie globale de réaction est décroissante alors que l'enthalpie d'association en phase gaz est croissante présentée ici est de moins en moins favorable à la formation du complexe.

Il y a donc un terme de solvation parmi  $\Delta H^{\circ}_{\text{resolv}}$  et  $\Delta H^{\circ}_{\text{désolv}}$  qui est responsable de la tendance observée et des sélectivités observées.

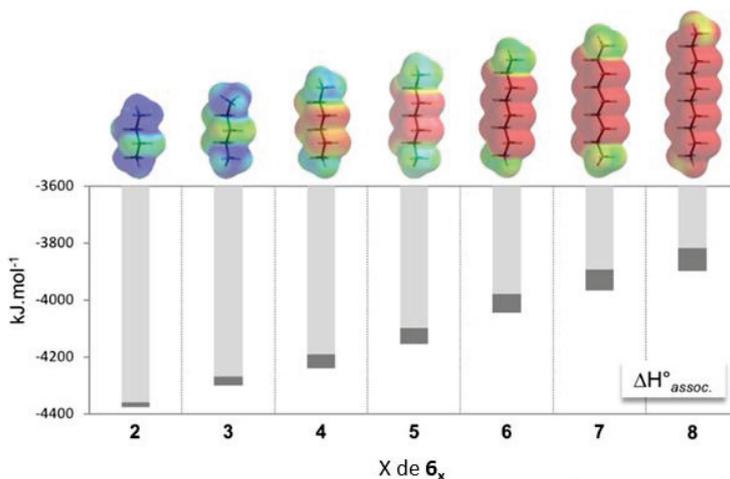


Figure 72 : Enthalpie d'association en phase gaz  $\Delta H^{\circ}_{\text{assoc}}$  extraite des trajectoires de dynamique moléculaire. Les contributions coulombiennes sont représentées en gris clair, les contributions de Van Der Waals en gris foncé. Chaque ligand est représenté avec la surface d'énergie potentielle calculée sur Spartan14. L'échelle de couleur est définie de 720 (rouge) à 980 (bleu) kJ.mol<sup>-1</sup>.

- La somme des termes  $\Delta H^{\circ}_{\text{resolv}}$  et  $\Delta H^{\circ}_{\text{désolv}}$  est positive et décroissante avec l'augmentation de la chaîne carbonée. Ces termes obtenus à l'issue de modélisation en Dynamique Moléculaire, ont montré une forte contribution correspondant à la solvation et désolvation des ammoniums et des carboxylates polaires. Pour  $\Delta H^{\circ}_{\text{désolv}}$ , la désolvation de l'hôte étant la même pour chaque diamine, seule la désolvation de l'invité contribue à ce terme. La figure 73 montre le tracé de la somme des contributions à la désolvation  $\Delta H^{\circ}_{\text{resolv}} + \Delta H^{\circ}_{\text{désolv}}$  ainsi que la  $\Delta H^{\circ}_{\text{désolv}}$  du ligand.  $\Delta H^{\circ}_{\text{resolv}}$  est traduit par l'écart énergétique entre les points bleu et rouge sur la figure 73. L'enthalpie de désolvation décroît avec la longueur de la chaîne x alors que l'enthalpie de solvation augmente. Il semble donc y avoir une enthalpie de resolvation des parties polaires de la diamine, comme évoquée dans la partie bibliographique avec les travaux de Kim et coll.<sup>55</sup>

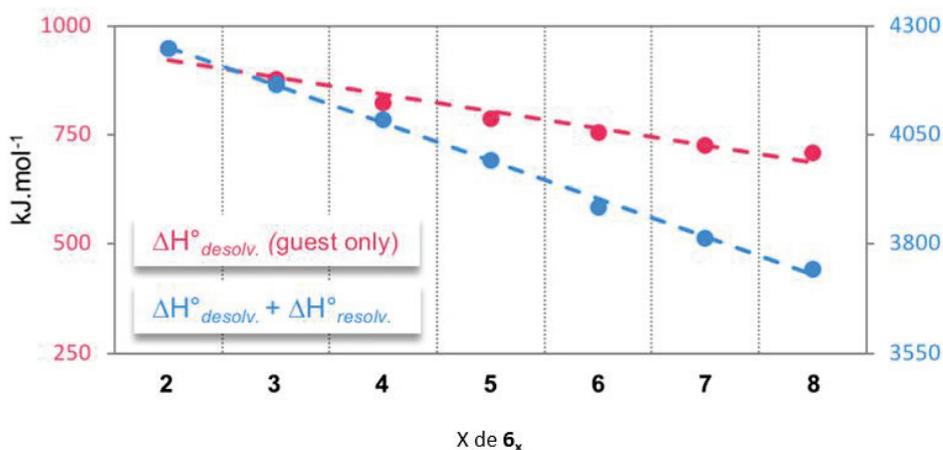


Figure 73 : Evolution de l'enthalpie de désolvation des diammoniums libres  $6_x$  (en rouge) et enthalpie relative de solvation entre les états liés ( $4_4-6_x$ ) et libre( $6_x$ ) (en bleu).

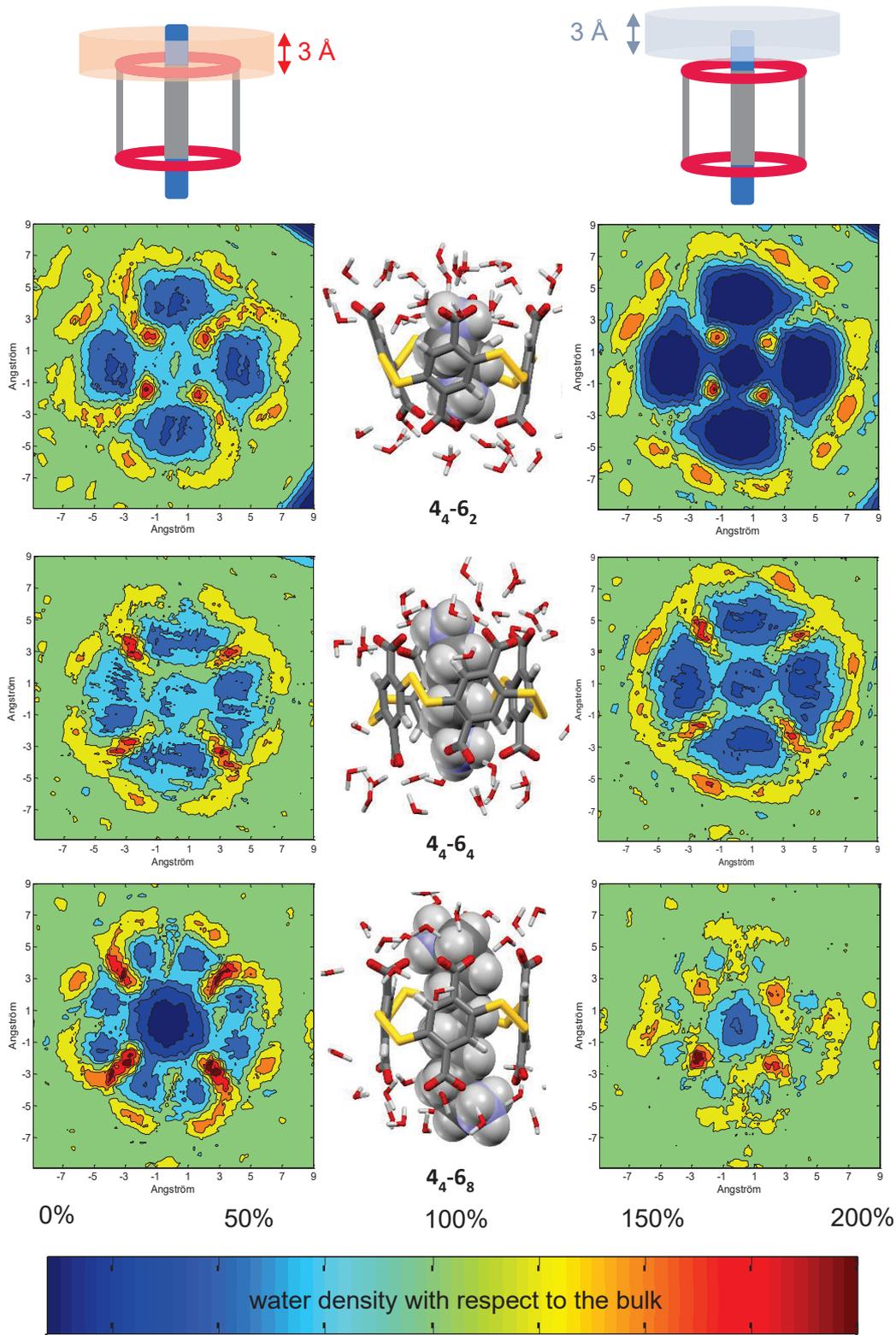


Figure 74 : cartographie des molécules d'eau solvatant les complexes dyna[4]arènes éthylènediamine  $4_4-6_2$ , butanediamine  $4_4-6_4$  et octanediamine  $4_4-6_8$ . Les cartes à gauche et à droite correspondent respectivement aux premières couches de solvatation des carboxylates et des ammoniums. Les clichés des complexes obtenus en dynamique moléculaire sont présentés au milieu.

Pour prouver une contribution particulière du solvant lors de la resolvatation, nous avons pu extraire de la dynamique moléculaire une cartographie de la densité de molécule d'eau dans la première couche de solvation autour du complexe. Cette couche correspond à une épaisseur d 3 Å autour des ammoniums et des carboxylates, ce qui permet d'englober les molécules d'eau interagissant par liaisons hydrogène avec ces groupements. La figure 74 à la page précédente compare les cas de l'éthylènediamine **4<sub>4</sub>-6<sub>2</sub>**, de la butanediamine **4<sub>4</sub>-6<sub>4</sub>** et de l'octanediamine **4<sub>4</sub>-6<sub>8</sub>**. Ces cartographies montrent que la densité de molécule d'eau est plus importante autour des groupements polaires au fur et à mesure où la chaîne carbonée croît : le cas de l'octanediamine **6<sub>8</sub>** fait apparaître de vastes zones avec une densité de molécule d'eau deux fois plus importante (200% figure 74) par rapport au solvant seul (100%). Cette forte hydratation est correspond à une augmentation des interactions ion-solvant et des interactions solvant-solvant. Il en résulte ainsi une stabilisation due à l'enthalpie de resolvatation, permettant d'interpréter les sélectivités décrites à l'aide des résultats expérimentaux.

En conclusion, le modèle clef-serrure n'est pas le modèle le plus approprié pour décrire l'association étudiée avec **4<sub>4</sub>** et les diamines **6<sub>x</sub>** à pH physiologique dans l'eau : les effets de solvants avec l'augmentation de la longueur de la chaîne, notamment une enthalpie de désolvatation des ligands qui est défavorable et une enthalpie de solvation du complexe qui est favorable. Il est donc nécessaire, en solution aqueuse de prendre en compte l'apport du solvant comme un troisième partenaire de complexation pour décrire l'association. D'autres amines d'intérêt biologiques ont alors été étudiées.

## 2) Cas de la spermine et de la spermidine

### A) Cas du dyn[3]arène

Une nouvelle étude a été menée avec le trimère **4<sub>3</sub>** vis-à-vis des différentes polyamines d'intérêt biologique : la spermine **7** et la spermidine **8**. Nous avons effectué les expériences ITC dans le tampon TRIS à 200 mM, à pH = 7,4 et à 298 K. Comme cela a été décrit au paragraphe III.1.B.a, la putrescine présente un cas de complexation non détectable par ITC. En revanche, la spermine **7** et la spermidine **8** présentent quant à eux des profils très différents, présentés à la figure 75.<sup>85</sup>

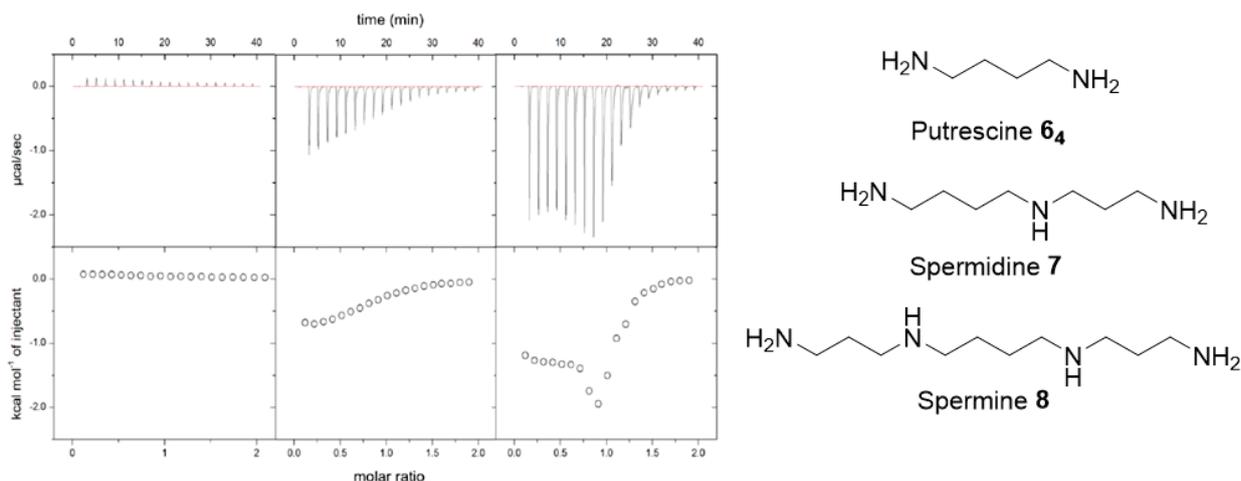


Figure 75 : Profil ITC entre le dyn[3]arène **4<sub>3</sub>** et la putrescine **6<sub>4</sub>** (à droite), la spermidine **7** (au centre) et la spermine **8** (à droite) dans le tampon TRIS 200 mM à pH = 7,4 et à 298 K.

Dans le cas de la spermidine **7**, une sigmoïde est obtenue avec les caractéristiques suivantes :

- Une stœchiométrie 1:1 avec le dynarène **4**<sub>3</sub>
- Une constante d'association de  $8,70 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$
- Une enthalpie de réaction  $\Delta H = - 3,39 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Une entropie de réaction  $\Delta S = 6,40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  donc associé à une énergie  $-T\Delta S = - 1,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

On note ici que la complexation est favorisée à la fois entropiquement et enthalpiquement, le second terme dominant sur le premier. A la différence des diamines étudiées précédemment, les dynamiques moléculaires montrent que la spermidine **7** peut se comporter comme un ligand multidentate. Les structures des supramolécules **4**<sub>3</sub>-**7** sont présentées sur la figure 76. Elles témoignent à nouveau d'une association hors cavité et montrent principalement un ligand spermidine **7** bidentate malgré 3 sites de coordinations possibles.

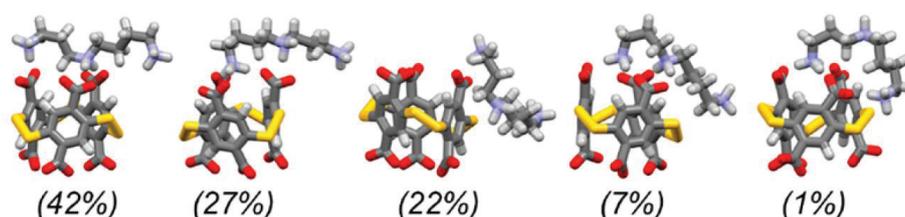


Figure 76 : Structures des complexes **4**<sub>3</sub> de configuration (pS)<sub>3</sub> avec la spermidine **7** par simulation de Dynamique Moléculaire de 100 ns à 300 K et pression constante. Le pourcentage représente la présence de cette molécule sur la trajectoire. L'eau a été supprimée pour plus de clarté.

Dans le cas de la spermine **8**, on obtient un profil original en ITC qui révèle un mode d'association plus complexe (annexe C). Les dynamiques moléculaires suggèrent effectivement une association de type 2:1 à faible concentration de spermine et une association 1:1 à forte concentration en spermine. Les structures des complexes correspondants sont présentées à la figure 77. Il s'agit à nouveau d'association hors cavité. Cependant, contrairement à la spermidine, elles présentent la spermine **8** comme un ligand doublement bi-dentate, ce qui explique la possibilité de former un système ternaire avec deux molécules **4**<sub>3</sub>, ou encore d'agir comme pince par interaction avec les amines extrémales.

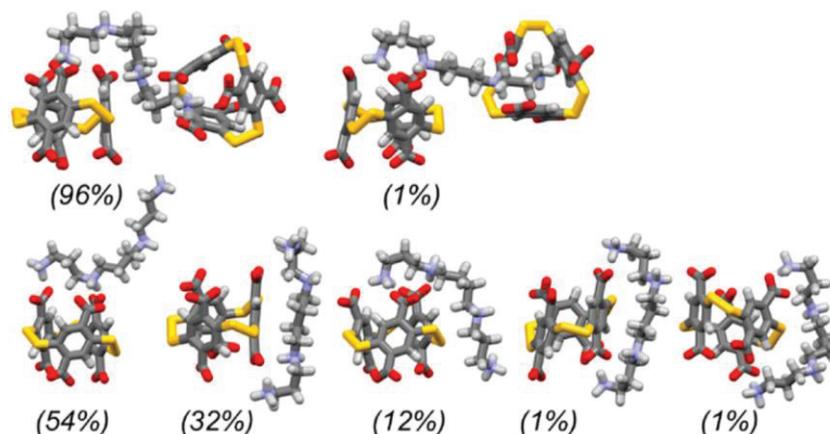


Figure 77 : Structures des complexes issus de l'association du cavitand  $4_3$  de configuration  $(pS)_3$  avec la spermine  $8$  par simulation en Dynamique Moléculaire de 100 ns à 300 K et pression constante. Les structures de la première ligne correspondent à des complexes 2:1 et les structures de la seconde ligne les associations 1:1. Le pourcentage représente la présence de cette molécule sur la trajectoire. L'eau a été supprimée pour plus de clarté.

Nous avons été amenées à effectuer la titration directe de  $4_3$  par  $8$ , mais aussi la titration inverse, c'est-à-dire la titration de  $8$  par  $4_3$ . Les informations recueillies pour chaque expérience ont été exploitées de façon à reconstituer la proportion de chacune des espèces au cours de la titration au cours de l'avancement de la réaction (appelé spéciation). Le tracé des spéciations est représenté à la figure 78.

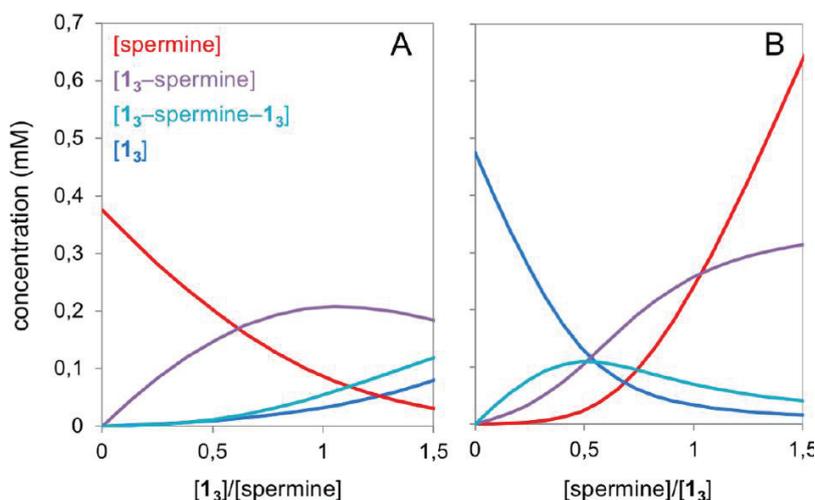


Figure 78 : Distribution des espèces présentes au cours des titrations. A) Titration de 0,375 mM de spermine  $8$  par  $4_3$  et B) Titration de 0,475 mM de  $4_3$  par  $8$ .

La titration inverse a permis de mesurer l'association 1 :1. La connaissance de ces paramètres thermodynamiques pour la formation du complexe binaire a été exploitée dans la titration indirecte pour analyser le complexe ternaire 2:1. Les spéciations obtenues confirment que la formation du complexe ternaire est favorisée lors de la titration directe et est défavorisée dans la titration inverse. Ces distributions montrent de plus la coexistence des complexes 1:1 et 1:2 au cours de la titration, responsable de l'allure particulière du thermogramme ITC obtenu expérimentalement pour la titration directe.

	Association 1:1	Association 2:1
<b>K</b>	$7,40 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	$8,10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$
<b><math>\Delta H</math></b>	$-8,87 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-3,14 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b><math>-\Delta S</math></b>	$-18,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-19,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Tableau 10 : Grandeurs thermodynamiques extraites de l'association **4<sub>3</sub>** avec la spermine **8**

Les grandeurs énergétiques des associations sont présentées dans le tableau 10. On observe les deux complexes (1:1 et 2:1) ont des entropies de formations similaires, ce qui indique que un phénomène de compensation. Nous pouvons alors conclure que le macrocycle **4<sub>3</sub>**, bien que de faible volume de cavité, est capable de reconnaître des molécules multidentates avec des modes de complexations variés hors cavité.

### B) Cas du macrocycle de taille 4

Nous avons effectué une nouvelle étude avec le tétramère **4<sub>4</sub>** vis-à-vis des différentes polyamines d'intérêt biologique : la spermine **7** et la spermidine **8**.

Les spectres RMN des formes libres et liées, précédemment effectuées dans le laboratoire<sup>82</sup>, ont montré de fortes variations de déplacement chimique pour les protons des ligands, dont certains atteignant des valeurs négatives. Ces observations sont à nouveau en faveur de la formation d'un complexe d'inclusion entre **4<sub>4</sub>** et **7**, et entre **4<sub>4</sub>** et **8**. Les chromatogrammes ITC obtenus à l'issue d'expérience dans le tampon TRIS à 200 mM, à pH = 7,4 et à 298 K ont été effectués par précédemment par l'équipe et sont présentés en figure 79.<sup>84,82</sup>

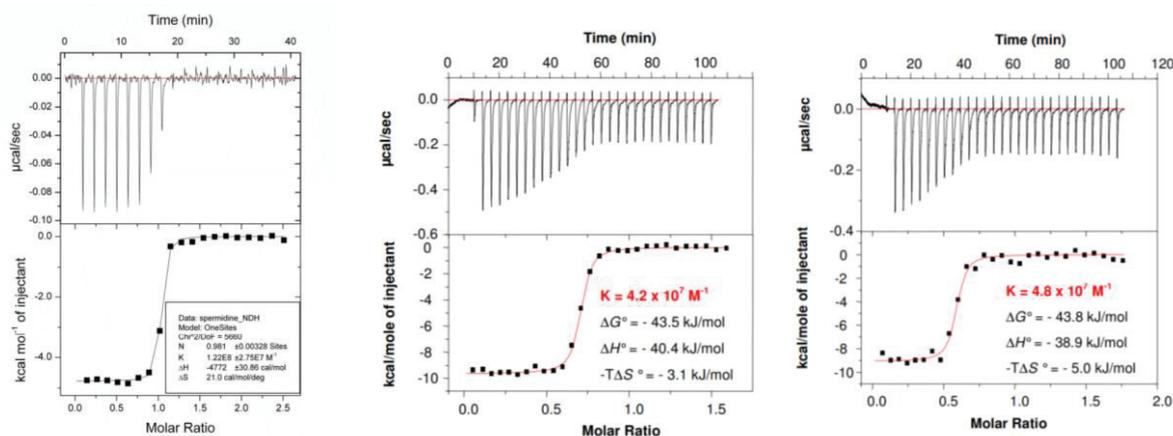


Figure 79 : Thermogrammes ITC de la titration directe de **4<sub>4</sub>** par la spermine **8**. A gauche, 0,1 mM en **4<sub>4</sub>**.<sup>82</sup> Au centre, 0,0156 mM en **4<sub>4</sub>** et à droite 0,0098 mM en **4<sub>4</sub>**.<sup>84</sup>

Un critique de ces thermogrammes peut être effectué. Pour rappel, les principaux critères de qualité et de robustesse d'une sigmoïde obtenue en ITC sont d'avoir un nombre satisfaisant de point dans la pente, une incertitude faible sur la valeur de la constante d'association et un facteur de sigmoïde  $c$  compris entre 10 et 1000. Pour le premier thermogramme de la figure 79, seul un seul point dans sa pente, le facteur de sigmoïde calculé est trop élevé ( $c = 11000$ ) et le rapport  $\Delta K/K$  sur la constante d'association est supérieur à la limite de validité fixée à 0,2 ( $\Delta K/K = 0,22$ ). Les deux autres études correspondant aux thermogrammes suivants ont été menées avec des concentrations plus

faibles. On observe la présence de plusieurs points dans la pente de la sigmoïde, des facteurs de sigmoïde sont ainsi plus faibles et sont compris dans l'intervalle de confiance ( $c = 397$  et  $282$ ). Cependant, aucune donnée sur les incertitudes liées à la constante d'association a été mesurée. Les pics observés sur le thermogramme présentent des retours positifs : ces artéfacts peuvent impacter sur l'intégration. Enfin, les stœchiométries sont variables sur ces trois graphiques allant de 0,6 à 0,98. La reproduction de ces expériences ont conduit à l'obtention de thermogrammes similaires au premier de la figure 79. Des expériences similaires ont été engagées pour la spermidine, les mêmes conclusions ont été tirées. Nous avons choisi de revoir la méthode pour consolider la validation de ces données.

Comme évoqué en introduction, les constantes d'association mesurables par titration ITC sont au maximum de l'ordre de  $10^8$ - $10^9$ . Ainsi, lorsque les constantes à mesurer sont trop élevées il est nécessaire de procéder à des expériences de mesure indirecte : au lieu de mesurer la chaleur dégagée lors d'une association, on mesure celle dégagée lors d'une substitution d'un ligand par un autre plus affiné. Le substrat de ce processus de substitution est le complexe formé entre le tétramère  $4_3$  et l'éthylènediamine  $6_2$  précédemment caractérisé et analysé. Le principe de la mesure est expliqué en figure 80a : la constante obtenue avec l'éthylènediamine  $6_2$  est  $K_1 = 3,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . On mesure expérimentalement une constante  $K_2$  par substitution de l'éthylènediamine par la spermine. La constante recherchée  $K_3$  est obtenue par le produit des constantes  $K_1$  et  $K_2$ .

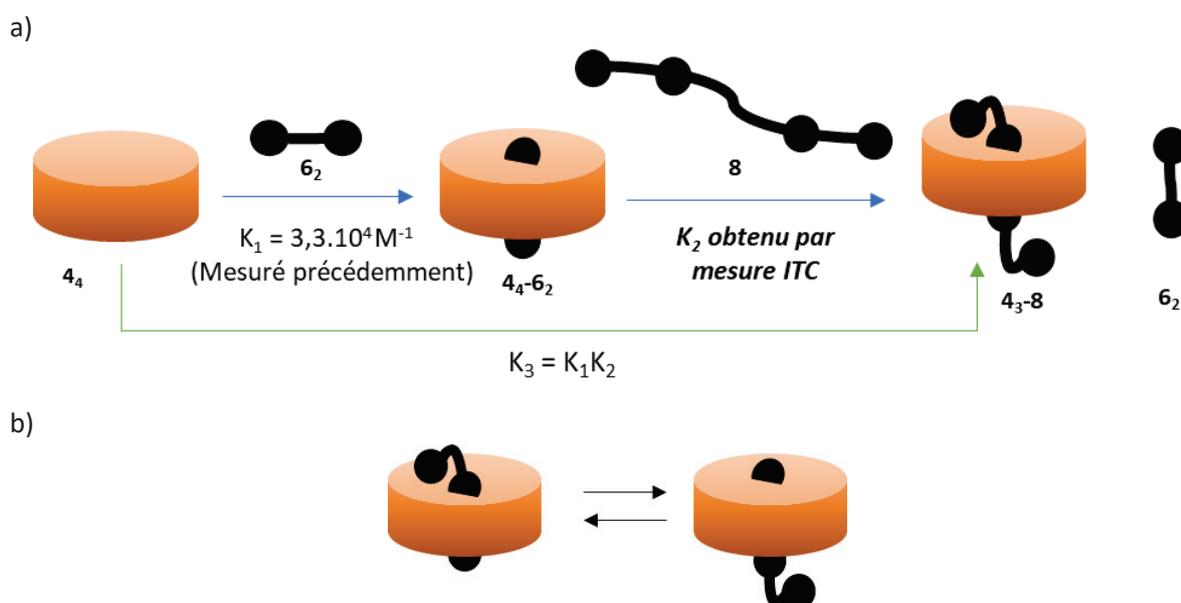


Figure 80 : a) Principe de la détermination de la constante  $K_3$  après mesure par remplacement en ITC. b) Équilibre entre les différents modes de complexation de la spermidine.

Les expériences de substitution ont donc été effectuées en ITC dans le TRIS 200 mM à pH = 7.4 et à 298 K. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau 11.

Ligand précomplexé par $4_4$	Compétiteur	$K_2$ mesuré	$\Delta H_2$ mesuré	$-T\Delta S_2$ mesuré
Ethylènediamine $6_2$	Spermine <b>8</b>	$2,16 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	$-18,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$	$-17,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$
Ethylènediamine $6_2$	Spermidine <b>7</b>	$7,36 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	$-18,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$	$-20,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$

Tableau 11 : Résumé des grandeurs thermodynamiques obtenues lors des expériences ITC par remplacement sur le récepteur  $4_4$

On observe des constantes d'association du même ordre de grandeur, légèrement plus élevées dans le cas de la spermidine **8**. Les enthalpies sont similaires alors que le terme entropique est plus faible dans le cas de la spermidine **7** par rapport à la spermine **8**. Ce gain a été interprété par un échange rapide des différents modes de complexation de la spermidine **7** au sein du complexe comme présenté en figure 80b, identifié par RMN, apportant un gain entropique par rapport au cas de la spermine qui ne possède pas une telle mobilité.<sup>82</sup> Les grandeurs thermodynamiques globales obtenues pour ces associations sont ainsi résumées dans le tableau 12. Ces constantes d'association sont parmi les plus élevées sur ces ligands. Cependant, ces données ITC sont à nouveau à consolider d'un point de vue de la stoechiométrie (thermogramme en annexe C) : les valeurs de n obtenues sont comprises entre 0,65 et 0,77 dans ces différentes expériences.

Association	Constante $K_3$	$\Delta H_3$	$-T\Delta S_3$
<b>4<sub>4</sub> - 8</b>	$7,12 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$	$-22,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-37,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b>4<sub>4</sub> - 7</b>	$2,43 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$	$-22,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$-41,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Tableau 12 : Résumé des grandeurs thermodynamiques globales obtenues entre le dynarène **4<sub>4</sub>** et les polyamines **7** et **8**.

Dans la partie C de ce chapitre, nous utiliserons les dynarènes pour effectuer de la reconnaissance de polyamines en milieu cellulaire. Dans la suite de ce chapitre, la complexation d'autres cations ont été étudiés notamment les métaux.

### III) Interactions des dynarènes polycarboxylates avec des métaux

#### 1) Contextualisation

Lors de la recherche d'autres invités capables d'être complexés par le macrocycle **4<sub>4</sub>**, nous nous sommes aussi intéressés aux éléments métalliques. Les templates cationiques **T<sub>7</sub>** ( $\text{CaCl}_2$ ) **T<sub>8</sub>** ( $\text{ZnCl}_2$ ) et **T<sub>9</sub>** ( $\text{EuCl}_3$ ) avaient été capables d'apporter des modifications des proportions dans la bibliothèque mixte entre **4** et **5**. Ils peuvent donc être de potentiels ligands des dynarènes. La reconnaissance de métaux peut aussi permettre potentiellement d'envisager des applications, par exemple en catalyse supramoléculaire<sup>93</sup>, pour former des complexes ternaires<sup>94</sup> ou encore pour la conception de complexe luminescent avec des lanthanides.<sup>95</sup>

#### 2) Etude de la formation de complexe dynarène-métaux par ITC

Chacune des études ITC ont été menées dans le tampon TRIS 200 mM à pH = 7,4 à 298 K. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 81. Nous avons étudié trois métaux alcalino-terreux (les chlorures de magnésium  $\text{MgCl}_2$ , de calcium  $\text{CaCl}_2$  et de baryum  $\text{BaCl}_2$ ), six métaux de transition (les chlorures de manganèse  $\text{MnCl}_2$ , de fer  $\text{FeCl}_3$ , de cobalt  $\text{CoCl}_2$ , de nickel  $\text{NiCl}_2$ , de cuivre  $\text{CuCl}_2$  et de zinc  $\text{ZnCl}_2$ ) et enfin quatre lanthanides (les chlorures de lanthane  $\text{LaCl}_3$ , néodyme  $\text{NdCl}_3$ , samarium  $\text{SmCl}_3$  et europium  $\text{EuCl}_3$ ).

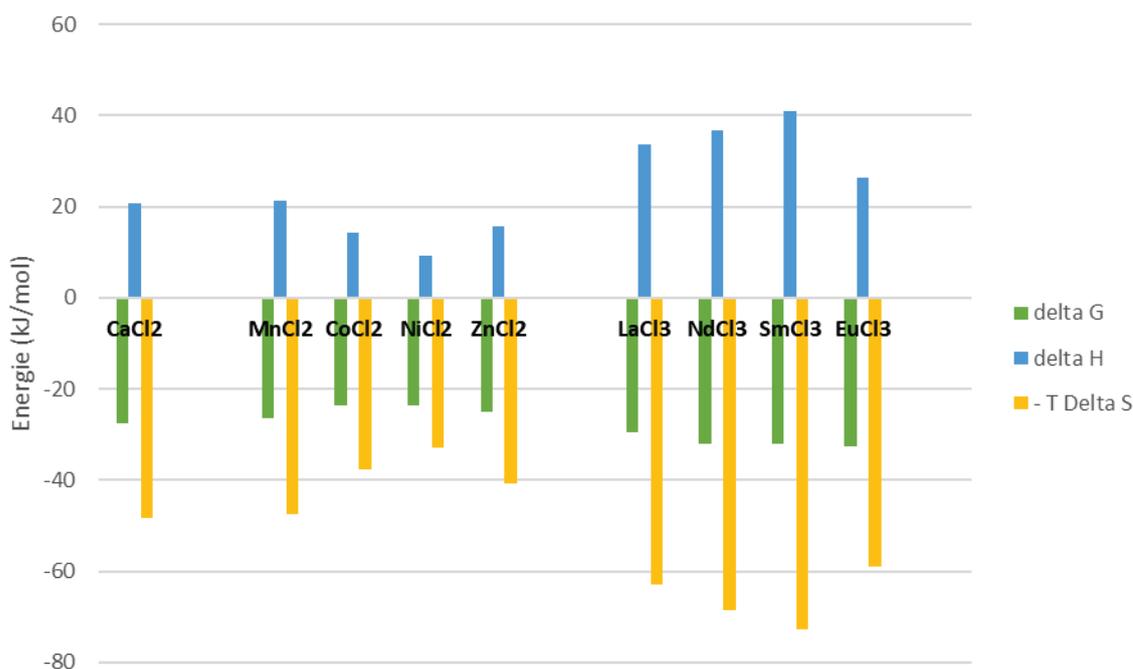


Figure 81 : Grandeurs thermodynamiques obtenues en ITC pour l'association **4<sub>4</sub>** avec les métaux

On notera que les stœchiométries mesurées des complexes fluctuent entre 0,7 et 1,3 (voir annexe C). Ce paramètre, correspondant au point d'inflexion du thermogramme, peut être faussé selon le taux d'hydratation variable du métal lors de la préparation des échantillons. Ceci provoque des variations faibles sur les concentrations entrées dans le logiciel dans le logiciel. Ceci a pour conséquence de translater les sigmoïdes et ainsi d'abaisser (resp. d'augmenter) les stœchiométries selon une surestimation du taux d'hydratation (resp. une sous-estimation du taux d'hydratation).

Parmi les métaux testés, la formation de complexe dynarène-métaux a été détectée par ITC sauf pour les chlorures de magnésium, baryum, fer et cuivre. Les cas du baryum et du magnésium ont donné des thermogrammes correspondant au phénomène de dilution. Le fer(III) n'a pas pu être utilisé puisqu'il précipite à pH = 7,4 dans les concentrations de travail à 1 mM. Enfin, le cas du cuivre(II) n'a pas mis en évidence une complexation puisqu'il est reporté dans la littérature pour rompre les ponts disulfures en les oxydant entre autres en sulfonates.<sup>96</sup>

On obtient ainsi une constante de l'ordre de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  pour le calcium et les métaux d, tandis que l'on obtient des constantes de l'ordre de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  (cf. partie expérimentale). Pour chacun des métaux, les complexations avec le dyn[4]arène polycarboxylates sont entropiquement favorisées et enthalpiquement défavorisées.

La complexation est favorisée entropiquement principalement due au relargage des molécules d'eau (figure 82). Plus le nombre de molécules d'eau de la première sphère de solvation du métal est élevé et plus l'association est favorisée entropique : il est décrit une coordination de 6 molécules d'eau pour les métaux de transition, et 8 molécules d'eau pour le calcium et de 9 molécules d'eau pour les lanthanides.<sup>97</sup>

D'un point de vue enthalpique, on compare les liaisons rompues et les liaisons créées. Le schéma à la figure 82 schématise ces différences : l'enthalpie d'association résulte de la rupture des liaisons eau-métal et dans une moindre mesure eau-carboxylate et de la formation des liaisons

carboxylate-métal. Les carboxylates étant faiblement désolvatés lors du processus, l'enthalpie d'association reflète la différence de basicité au sens de Lewis entre les molécules d'eau et les fonctions carboxylates.

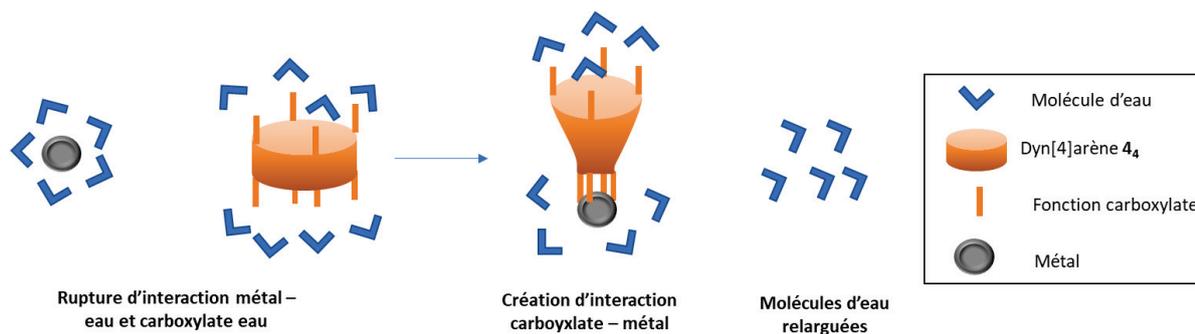


Figure 82 : Schématisation de la complexation du dynarène  $4_4$  avec les métaux.

Ainsi, l'utilisation des métaux d avec  $4_4$  pourrait permettre de former des catalyseurs et l'utilisation de lanthanides pourrait permettre de former des sondes phosphorescentes. Nous allons cependant développer l'application à l'utilisation de certains métaux comme rôle effecteur dans la complexation.

### 3) Mise en évidence du rôle effecteur des métaux pour la complexation de molécules organiques avec les dyn[4]rènes

#### A) Retour sur les travaux effectués avec les acides aminés

Le dynarène  $4_4$  est un récepteur pour les alkylammonium aliphatiques et notamment de certains acides aminés basiques.<sup>98</sup> Précédemment, des travaux ont été conduits sur des dérivés de la lysine, qui sont des analogues chiraux de la cadaverine  $6_5$ . Dr. Dumartin a montré que l'affinité du macrocycle  $4_4$  pour la LysNH<sub>2</sub> par rapport à d'autres dérivés de la lysine est plus importante de deux ordres de grandeur : la constante d'association mesurée avec la LysNH<sub>2</sub> est de l'ordre de  $10^6 \text{ M}^{-1}$ .

La formation de complexe entre  $4_4$  racémique et la lysNH<sub>2</sub> racémique induit un ajustement de conformation asymétrique au niveau du macrocycle. Il en résulte un signal de dichroïsme circulaire proportionnel à la quantité d'invité énantiopur (ou à son excès énantiomérique si en mélange) (figure 83). Plus récemment, une campagne de cristallogénèse et d'analyse par diffraction des rayons X a été initiée lors d'un séjour à Bordeaux, puis développée par le Pr. Huc de manière à analyser les structures des complexes dynarène-lysNH<sub>2</sub> racémiques en phase solide. Elles sont présentées avec les spectres de dichroïsme circulaire correspondant en figure 83. Les complexes énantiomères ont été identifiés : la complexation de la L-lysine-NH<sub>2</sub> avec les dynarènes de disulfures de conformation *P* ainsi que des complexes D-Lysine-NH<sub>2</sub> avec des dynarènes présentant des ponts disulfures de conformation *M*. De plus, une déformation du macrocycle a été identifiée : la géométrie du macrocycle passe d'une géométrie parallélépipédique non complexée à une géométrie rhomboédrique par complexation de la lysine.

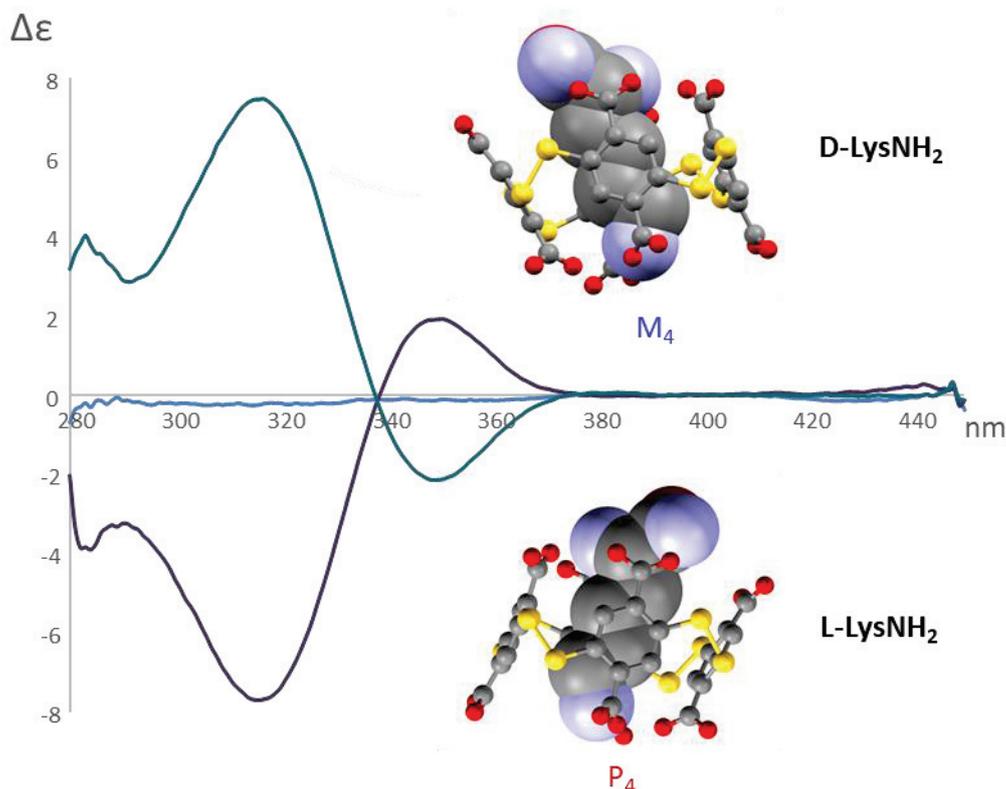


Figure 83 : Spectre de dichroïsme circulaire et structure cristallographique des complexes énantiomères de la L-lysNH<sub>2</sub> et de la D-lysNH<sub>2</sub> avec le dyn[4]arène **4<sub>4</sub>**.

Ainsi, la déformation observée lors de cette complexation peut aussi être exploitée lors des interactions avec les métaux. On suppose ainsi lors de l'association évoquée en figure 82, une géométrie pyramide à base tronquée pour la cavité du complexe dynarène-métal.

### B) Complexation de l'histidine à l'aide du calcium

Nous nous sommes intéressés à la reconnaissance moléculaire d'un autre acide aminé : l'histidine **9**. Comme mentionné précédemment, le tétramère **4<sub>4</sub>** s'associe préférentiellement avec les acides aminés basiques possédant une chaîne latérale de type alkylamine. Le volume de la cavité du macrocycle dans sa conformation stable est a priori trop petit pour accueillir le groupement imidazole de l'histidine. Nous avons donc envisagé d'utiliser un métal effecteur, qui, en se liant à l'une des couronnes tétracarboxylates du cavitand induit une modification conformationnelle favorable à l'association de l'histidine.

La complexation de l'histidine **9** et de l'un de ces dérivés, l'histidine-NH<sub>2</sub> **10** par le macrocycle **4<sub>4</sub>** a tout d'abord été étudiée. La constante d'association avec l'histidine a été mesurée par titration RMN, tandis que celle avec l'histidine-NH<sub>2</sub> a été mesurée par ITC (voir annexe C). Nous avons mis en évidence une stœchiométrie d'association 1:1 dans chacun des cas, avec une constante d'un ordre de grandeur plus faible pour l'histidine **9** par rapport à l'histidine-NH<sub>2</sub> **10**. Il est raisonnable de postuler que le groupement amide interagit avec le macrocycle plus favorablement qu'un groupement carboxylate, par son caractère donneur de liaison hydrogène.

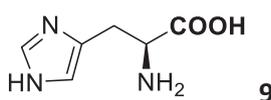
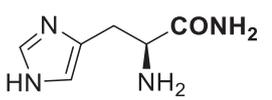
Constante d'association : <b>4<sub>4</sub></b> – histidine <b>9</b>	Constante d'association : <b>4<sub>4</sub></b> - histidine-NH <sub>2</sub> <b>10</b>
 <p style="text-align: right;"><b>9</b></p>	 <p style="text-align: right;"><b>10</b></p>
$K = 8,50 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$	$K = 6,83 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$

Tableau 13 : mesure de constante d'association entre **4<sub>4</sub>** et les ligands **9** et **10**.

La stratégie proposée pour moduler l'affinité et la sélectivité entre **4<sub>4</sub>** et les acides aminés basiques consiste à induire une déformation de la cavité du macrocycle **4<sub>4</sub>** en utilisant un métal pré-complexant une des couronnes. On passe a priori d'un objet de géométrie parallélépipédique à rhomboédrique plus apte à accueillir un partenaire à chaîne latérale hétérocyclique. Il s'agit d'une forme d'ajustement induit. On peut ainsi espérer observer une interaction de  $\pi$ -stacking entre unités aromatiques du récepteur riches avec l'hétérocycle pauvre de l'acide aminé.

A la vue des faibles constantes mesurées en l'absence d'inducteur, nous avons donc conduit une série de titration par RMN <sup>1</sup>H entre les différents partenaires potentiels.

- Une titration entre l'histidine **9** et **CaCl<sub>2</sub>**
- Une série de titration entre **4<sub>4</sub>** pré-complexé par **CaCl<sub>2</sub>** et par l'histidine **9** : dans un cas le complexe **4<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup>** a été titré par **9**, dans un autre cas **9** a été titré par **4<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup>**.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant et les modélisations associées sont présentées en annexe D avec les critères témoignant de leur validité.

Système	Hôte <b>4<sub>4</sub></b> / Invité <b>Ca<sup>2+</sup></b>	Hôte histidine <b>9</b> / invité <b>Ca<sup>2+</sup></b>	Hôte Histidine <b>9</b> / invité <b>4<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup></b>
Données extraites des modélisations	Association 1 hôte pour 1 invité. $K_a(\text{ITC}) = 6,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	Association 2 hôtes pour 1 invité $K_{a1}(\text{RMN}) = 1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ $K_{a2}(\text{RMN}) = 4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-2}$	Association 1 hôte pour 2 invités $K_{a1}(\text{RMN}) = 9,8 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}$ $K_{a2}(\text{RMN}) = 2,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$

Tableau 14 : résumée des constantes obtenues par RMN et ITC entre les différentes partenaires considérés (Dynarène **4<sub>4</sub>**, histidine **9** et calcium **Ca<sup>2+</sup>**).

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- La titration entre l'histidine **9** et le calcium **Ca<sup>2+</sup>** révèle une association de type 2:1 (deux histidines pour un calcium) avec un produit des constantes d'association  $K' = 6,88 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ .
- Enfin, nous avons titré l'histidine **9** par une solution de **4<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup>**. Une modélisation des variations de déplacements chimiques des protons aromatiques de l'histidine au cours du titrage permet de conclure à une association 1:2 (une histidine pour deux complexes dynarène-calcium), où le produit des constantes successives obtenues vaut  $K'' = 2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Cette constante est ainsi plus élevée que l'association directe entre **4<sub>4</sub>** et l'histidine **9**, valant  $8,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ , ce qui prouve le rôle d'effecteur du calcium dans ce cas.

Nous suggérons ainsi un modèle structural qui explique cette association. Ce modèle est présenté à la figure 84 et schématise l'association 2:1 mesurée entre le complexe **4<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup>** et l'histidine **9**.

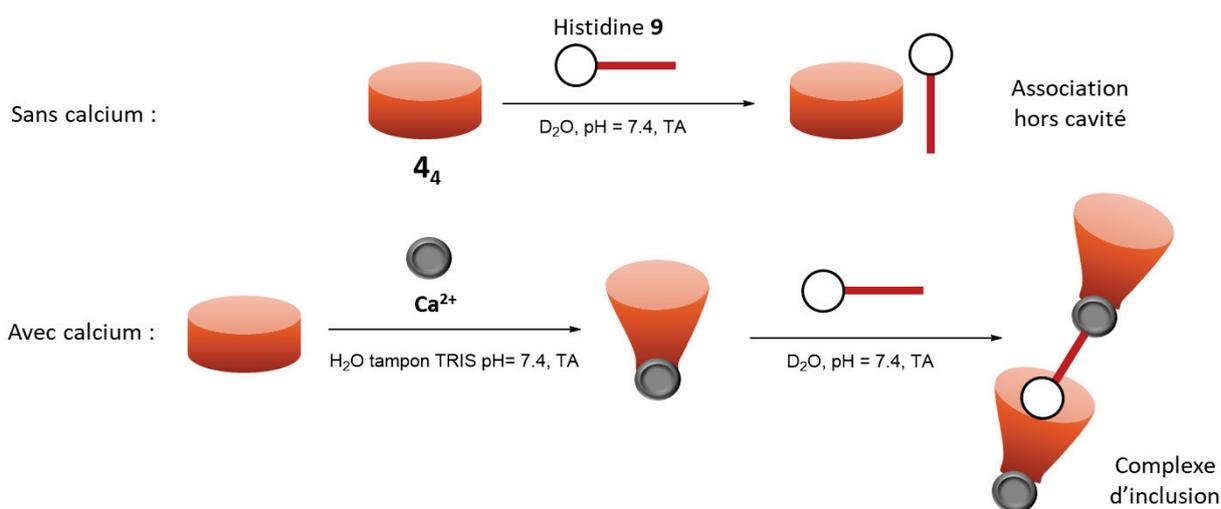


Figure 84 : Interprétations structurales lors de la complexation de **4<sub>4</sub>** avec le calcium **Ca<sup>2+</sup>** et l'histidine **9**.

L'utilisation du calcium **Ca<sup>2+</sup>** permet de renforcer l'affinité entre le macrocycle **4<sub>4</sub>** et l'histidine **9**. Nous allons alors tester le rôle effecteur du calcium avec d'autres ligands organiques.

### C) Extension de la stratégie à d'autres ligands organiques

La même stratégie a été déployée pour complexer l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique **11** et le 4-aminopropanol **12**, présenté en figure 85.



Figure 85 : structure des ligands étudiés pour la complexation avec **4<sub>4</sub>**

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H du ligand **11** seul et du ligand **11** en présence d'un équivalent d'hôte **4<sub>4</sub>** ne révèle à priori pas de complexation, car aucune variation de déplacement chimique des protons du ligand n'est observée, comme l'indique la figure 86. La titration ITC équivalente, présentée en annexe C, ne montre pas de dégagement de chaleur associé à une complexation, mais uniquement de la dilution du ligand. L'ajout du calcium **Ca<sup>2+</sup>** dans le milieu n'a pas permis d'observer de modification : il ne semble pas y avoir d'effet effecteur du calcium **Ca<sup>2+</sup>** avec **11**.

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H du ligand **12** seul et du ligand **12** en présence d'un équivalent d'hôte **4<sub>4</sub>** semble indiquer une complexation, car les déplacements chimiques des protons du ligand présentent des valeurs plus faibles sous forme libre que sous forme liée (figure 87). On note une valeur moyenne de blindage de -1,37 ppm. Cependant, l'ajout de calcium dans le milieu présente une réaugmentation des valeurs des déplacements chimiques des protons du ligand. On note une valeur moyenne de déblindage de 0,49 ppm. Il semble donc y avoir un phénomène de compétition entre les deux ligands.

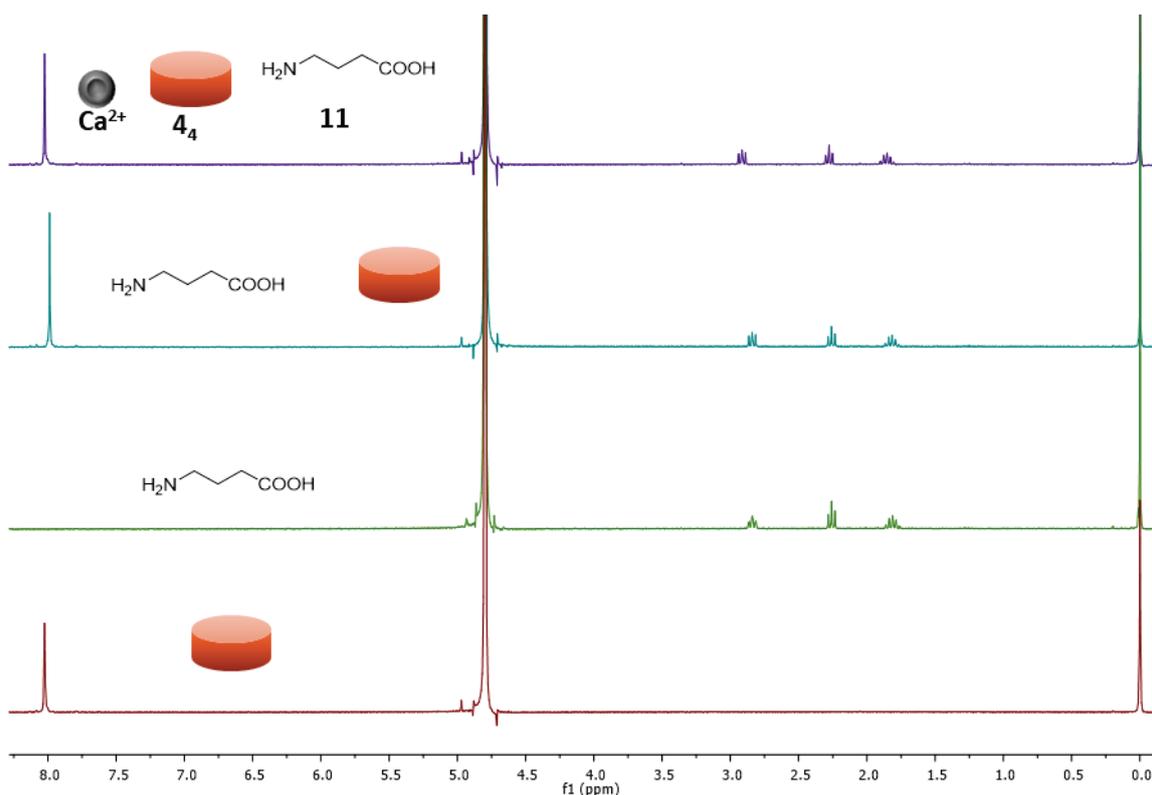


Figure 86 : Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  entre le ligand **11** sous forme libre et liée à **4<sub>4</sub>** en présence ou non de calcium.

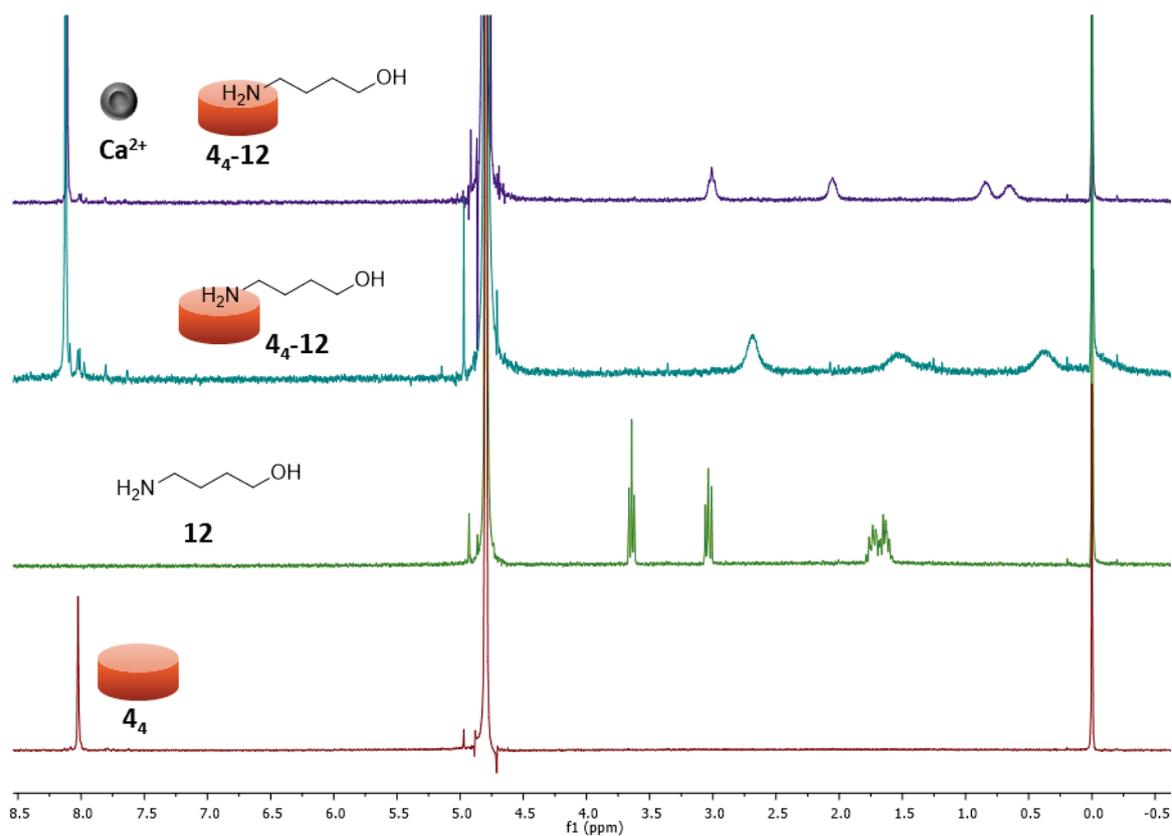


Figure 87 : Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  entre le ligand **12** sous forme libre et liée à **4<sub>4</sub>** en présence ou non de calcium.

Des expériences de titration RMN et des ITC ont été effectués pour déterminer les constantes d'associations entre le macrocycle **4<sub>4</sub>** et le 4-aminopropanol **12**. Nous avons obtenu la constante par mesure ITC dans l'eau à pH 7,4,  $K(\mathbf{4}_4\text{-}\mathbf{12}) = 2,23 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . L'influence de l'apport du calcium a été étudiée : par RMN, une titration a été effectuée, permettant l'obtention d'une constante  $K_{\text{RMN}}(\mathbf{4}_4\text{-}\mathbf{12}\text{-}\mathbf{Ca}) = 2,08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  et par ITC  $K_{\text{ITC}}(\mathbf{4}_4\text{-}\mathbf{12}\text{-}\mathbf{Ca}) = 5,47 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  (voir annexe D pour les modélisations). Ces constantes d'associations sont inférieures à celle obtenue pour l'association sans calcium : aucun rôle effecteur du calcium n'est noté dans ce cas. Les constantes d'association entre **4<sub>4</sub>** et le calcium et entre **4<sub>4</sub>** et l'aminobutanol **12** sont du même ordre de grandeur. Il y a donc compétition : soit l'un ou l'autre des ligands est complexé, ce qui explique le déblindage observé sur les spectres RMN de la figure 87 lors de l'ajout de calcium.

Ainsi, nous avons parfois des cas où l'apport d'un troisième partenaire peut pénaliser une interaction. Enfin, nous allons étudier un cas où le comportement à l'état solide semble différer du comportement en solution.

#### D) Complexation de diols à l'aide de métaux alcalins à l'état solide

Lors des tentatives de cristallisation de **4<sub>4</sub>** avec les kits commerciaux, des cristaux ont été obtenus avec un agent de cristallisation contenant de l'hexane-1,6-diol **13**. La structure cristallographique, présentée à la figure 88, révèle la formation d'un complexe d'inclusion entre le dynarène **4<sub>4</sub>** et l'hexane-1,6-diol **13** à l'état solide. On observe que des atomes de sodium, représentés en violet, viennent organiser la structure pour renforcer l'association.

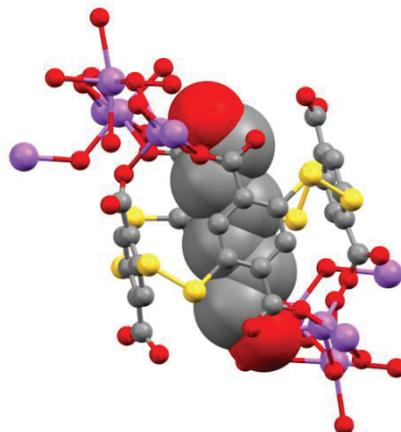


Figure 88 : Structure cristallographique entre l'hexanediol **13** et le dynarène **4<sub>4</sub>**, en présence de chlorure de sodium

Nous avons souhaité quantifier l'affinité associée. Nous avons analysé en RMN  $^1\text{H}$  les espèces libres et les espèces liées de l'hexane-1,6-diol **13** avec et sans ions sodium en excès. Les spectres RMN associés ne présentent aucun déplacement chimique modifié pour les protons de l'hexane-1,6-diol **13** dans chacun des cas. En présence d'excès de chlorure du magnésium ou de lithium, aucune modification des déplacements chimiques n'est observée. On peut ainsi conclure ici que l'on a été capable de montrer une différence de comportement entre l'état solide et l'état en solution pour cette complexation.

## IV) Conclusion sur la complexation des dynarènes en solution aqueuse

Dans cette partie, nous avons donc exploré les propriétés de complexation des dynarènes **4<sub>3</sub>** et **4<sub>4</sub>** en solution. Ces hôtes supramoléculaires viennent enrichir la famille restreinte des récepteurs moléculaires capable de reconnaître des ligands d'intérêt biologique en milieu quasi physiologique avec des affinités subnanomolaires. Pour le macrocycle **4<sub>3</sub>**, nous avons mis en évidence un hôte capable de reconnaître des polyamines avec des modes de complexation variés en sa surface. Pour le macrocycle **4<sub>4</sub>**, nous avons obtenu des constantes d'association allant jusqu'à  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  avec les polyamines, allant jusqu'à  $10^5 \text{ M}^{-1}$  avec les métaux ou encore jusqu'à  $10^6 \text{ M}^{-1}$  avec des acides aminés. Une étude fondamentale centrée sur le solvant a permis d'analyser les contributions énergétiques et structurales gouvernant la formation de complexe d'inclusion entre le dyn[4]arène et les cations  $\alpha,\omega$ -alkyldiammonium. La dissection des différents paramètres thermodynamiques a permis d'expliquer les sélectivités pour les diammoniums de plus grandes tailles. L'augmentation de la taille du diammonium entraîne pour le complexe résultant une diminution due la pénalité enthalpique de la désolvatation du ligand et une augmentation du gain enthalpique de la solvataion du complexe résultant, qui était inattendue. Les résultats remarquables sur les composés d'intérêt biologique laissent la possibilité d'entreprendre des applications au sein de cellules dans le but de détecter des effets thérapeutiques.

## Partie C : Utilisation des dyn[n]arènes polycarboxylates en système cellulaire

### I) Cadre de l'étude

#### 1) Système HeLa et hypothèses d'étude

Dans cette partie, nous avons souhaité déterminer si le macrocycle **4<sub>4</sub>** pouvant interagir avec les polyamines biogéniques en milieu cellulaire. L'effet biologique du macrocycle **4<sub>4</sub>** a été exploré sur des cellules cancéreuses de type HeLa lors d'un séjour à l'université de Debrecen en Hongrie en collaboration avec le Dr. Fenyvesi. Snyder et al décrit la concentration en polyamines dans les cellules HeLa, résumé dans le tableau suivant.<sup>99</sup> La quantité de spermine est plus importante que les autres polyamines.

Polyamine	Putrescine <b>6<sub>4</sub></b>	Spermidine <b>7</b>	Spermine <b>8</b>
Quantité pour 10 <sup>6</sup> cellules	155 pmol	1614 pmol	2700 pmol

Tableau 15 : Quantité de polyamine dans les cellules HeLa

Sur les cellules HeLa, il a été démontré que des inhibiteurs de l'ornithine décarboxylase (enzyme responsable de la synthèse des polyamines) provoque une diminution considérable des quantités de putrescine et de spermidine sans modifier les concentrations de spermine. Dans le cas de notre étude, nous utiliserons directement un récepteur de ces polyamines biogéniques introduit dans le milieu de culture de lignées cellulaires cancéreuses.

#### 2) Principe de la méthode RTCA

Dans le but de suivre l'évolution du nombre de cellule, nous avons utilisé une méthode d'indexation cellulaire en temps réel appelée RTCA (real time cell analysis).



Figure 89 : Appareillage pour la méthode RTCA (De gauche à droite : appareillage électronique, plaque contenant les micro-puits, et observation d'un puits et de ses électrodes.

Le principe de cet appareil repose sur la détection du nombre de cellule à l'aide de microélectrode située au fond d'un micro-puits (figure 89). Le but de cette expérience est d'effectuer un suivi cinétique de la prolifération cellulaire. Ces électrodes sont capables de mesurer l'impédance du milieu, en présence ou non de cellule. Sans cellule, l'impédance mesurée correspond à la différence

de potentiel induite par les électrolytes du milieu de culture cellulaire. Les cellules se comportent comme des petites résistances dont l'impédance globale est proportionnelle à leur nombre (figure 90).

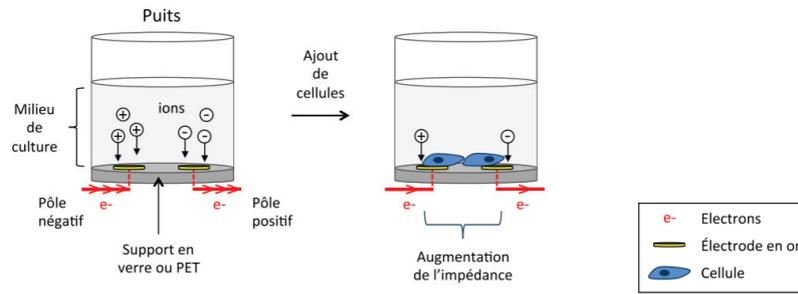


Figure 90 : Description de la mesure d'impédance dans les micro-puits en présence ou non de cellule

L'indexation cellulaire mesurée (notée CI) est ainsi reliée à l'impédance mesurée par la formule présentée à l'équation 6.

$$CI = \frac{Z_{cell}(t)}{Z_0} - 1 \quad (6)$$

Où  $Z_{cell}(t)$  représente l'impédance mesurée dans la cellule au temps  $t$  et  $Z_0$  l'impédance de la solution au temps  $t_0$ . L'objectif sera ainsi de tracer les courbes  $CI = f(t)$  de manière à observer l'évolution du nombre de cellule après injection de macrocycle dans le milieu de culture cellulaire.

## II) Mise en évidence d'un effet cytostatique

La première expérience consiste à injecter le macrocycle **4<sub>4</sub>** seul dans le milieu de culture cellulaire et de suivre la prolifération cellulaire par la méthode RTCA.

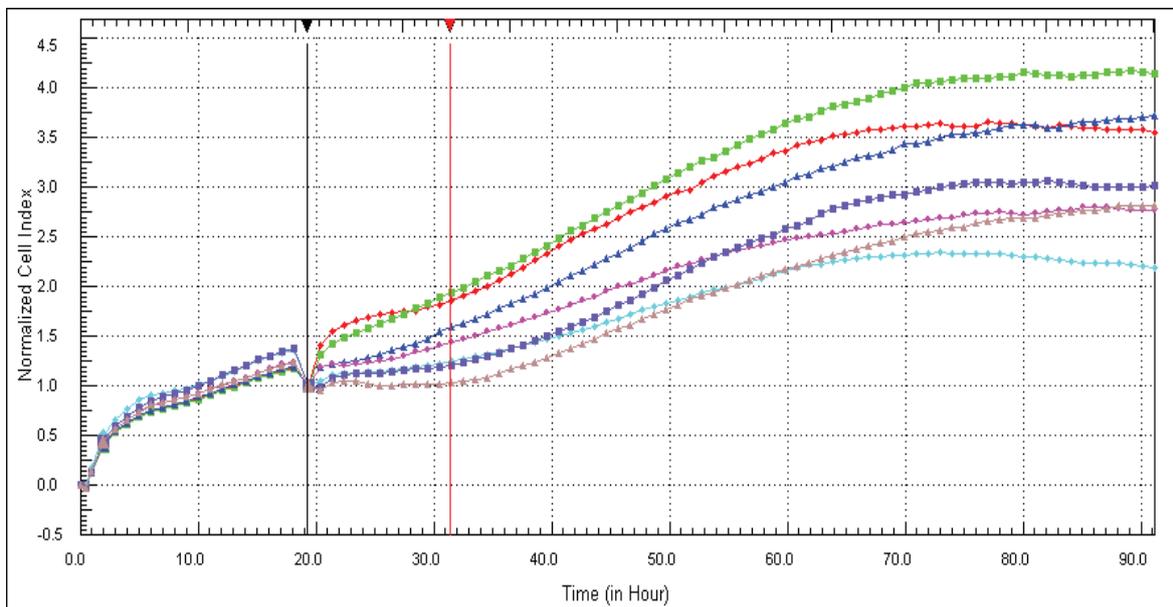


Figure 91 : Evolution du nombre de cellules en fonction du temps et de la quantité de **4<sub>4</sub>**. Rouge : contrôle, verte : 1  $\mu$ M, bleu foncé : 10  $\mu$ M, rose : 100  $\mu$ M, violet : 500  $\mu$ M, bleu clair : 1 mM et marron : 2 mM.

Le graphique de la figure 91 représente l'indexation cellulaire en fonction du temps. A  $t = 0$ , les cellules sont placées dans le milieu de culture puis incubées pendant environ 20 heures. La ligne

verticale noire matérialise l'injection du macrocycle **4<sub>4</sub>** dans le milieu de culture cellulaire. L'indexation cellulaire est normalisée à 1 au moment de l'injection et les cellules sont alors incubées pour 72 heures supplémentaires. Des courbes dose réponse ont été tracées à 12 heures après injection (ligne rouge verticale). Le but de cette analyse est d'obtenir un indice IC<sub>50</sub> appelé concentration inhibitrice médiane qui mesure la dose requise pour induire 50 % d'un effet biologique ou thérapeutique (ici l'arrêt de la prolifération cellulaire).

Sur la figure 91, on constate que plus la concentration en macrocycle augmente, plus la prolifération cellulaire est ralentie : il y a donc bien un effet dose réponse. A la concentration maximale en dyn[4]arène **4<sub>4</sub>** on observe pendant au moins 12 heures un pallier à CI = 1. Cet effet cytostatique antiprolifératif n'est pas assorti de cytotoxicité puisque la valeur CI n'est pas inférieure à la valeur avant injection (pas de diminution du nombre de cellules). On observe cependant que cet effet est transitoire : à la concentration de 2 mM en macrocycle dans le milieu de culture cellulaire, le pallier correspond à une durée de 13 heures. La figure 92 présente le tracé de l'indexation cellulaire en fonction du logarithme de la concentration en macrocycle injecté. Cette courbe dose réponse, effectuée 12 heures après injection (ligne rouge verticale de la figure 91), permet l'extraction de l'IC<sub>50</sub> : en effet, après modélisation de la sigmoïde, cette valeur correspond à la concentration au point d'inflexion. Un triplicat de données a permis l'extraction d'une valeur moyenne : IC<sub>50</sub>(**4<sub>4</sub>**) = 78,3 ± 5,0 μM. Le dyn[4]arène polycarboxylate **4<sub>4</sub>** a donc un effet temporaire de ralentissement de la croissance cellulaire qui doit a priori être élucidé à l'échelle moléculaire.

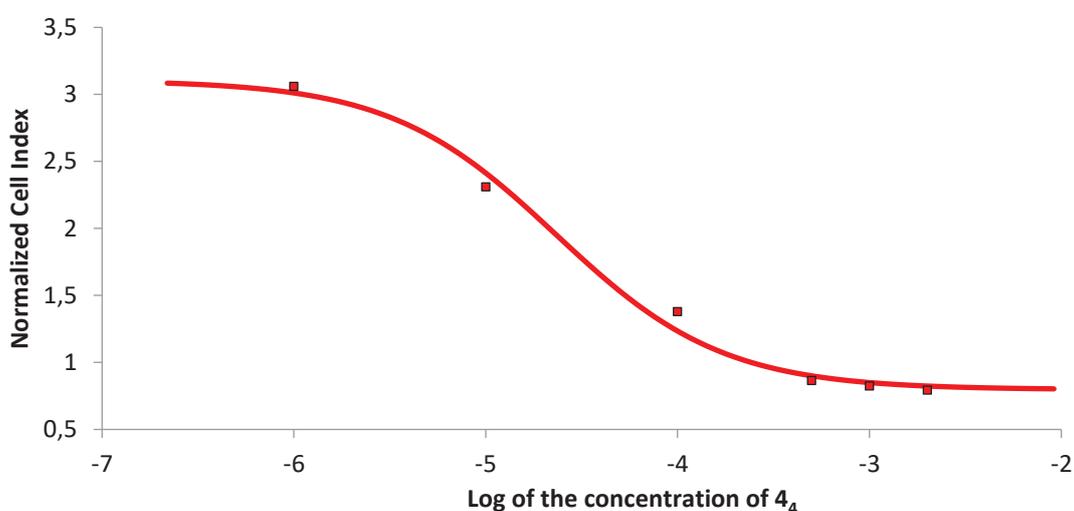


Figure 92 : Courbe dose-réponse représentant l'indexation cellulaire en fonction du logarithme de la concentration pour l'obtention de la concentration inhibitrice médiane pour **4<sub>4</sub>**

### III) Identification de l'origine du phénomène antiprolifératif

#### 1) Spectre des hypothèses

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si cet effet antiprolifératif était corrélé à l'affinité du macrocycle pour les amines biogéniques. Nous avons également tenté de déterminer si le macrocycle était internalisé. De nouvelles expériences d'indexation cellulaire ont été conduites en

présence de polyamines et un ligand fluorophore a été synthétisé dans le but de suivre le complexe formé avec le macrocycle par microscopie de fluorescence.

## 2) Suivi cinétique en présence de différents agents chimiques

### A) Comparaison avec les briques élémentaires

#### a) Avec la brique 4

En milieu aqueux aérobie à pH physiologique, la présence de spermine **8** en concentration millimolaire induit la conversion quantitative de la brique **4** (à même concentration) en **4<sub>4</sub>**. Nous avons donc cherché à déterminer si l'effet cytostatique antiprolifératif pouvait directement être observé à partir de la prodrogue **4**. Les expériences de suivi cinétique ont été effectuées par incubation de la brique **4** dans le milieu de culture et les résultats obtenus sont présentés à la figure 93. Deux types de régimes ont été mis en évidence avec les mêmes gammes de concentrations que celles utilisées lors de l'expérience avec **4<sub>4</sub>**.

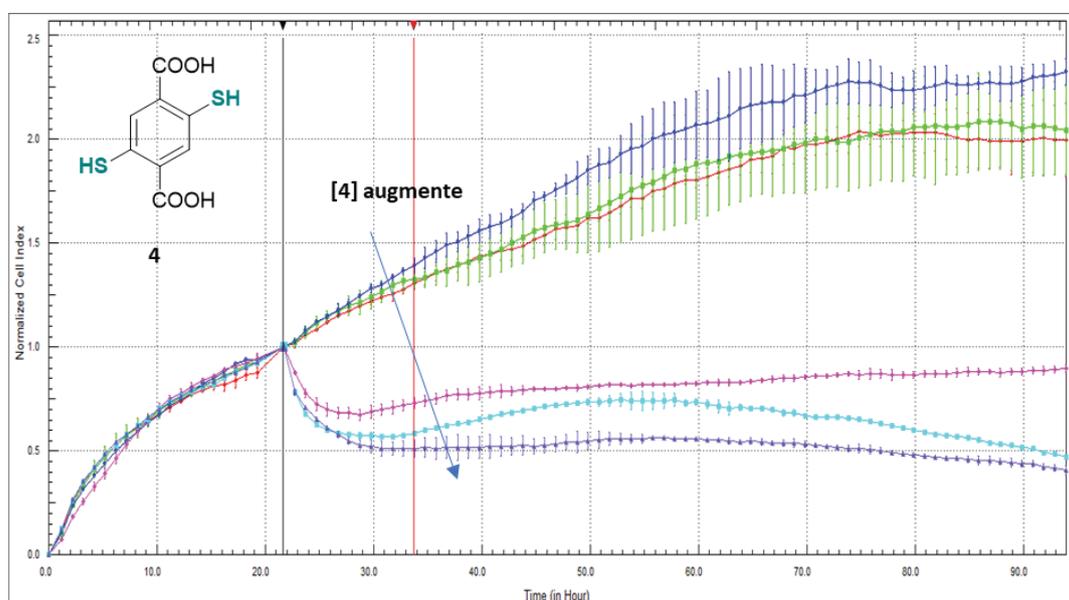


Figure 93 : profil du suivi cinétique de la prolifération des cellules cancéreuses avec différentes concentrations de brique **4** injectée. Rouge : 1 µM, vert : 10 µM, bleu : 100 µM, courbe rose : 500 µM, courbe violette : 1 mM, courbe bleu clair : 2 mM.

- A faible concentration, aucun effet antiprolifératif n'est visible.
- A forte concentration, on observe une diminution du nombre de cellules cancéreuses pendant plusieurs heures puis un pallier. Il semble donc y avoir un effet cytotoxique de la brique **4** sur les cellules puis un effet cytostatique.

L'interprétation de cet effet cytotoxique est le suivant : les fonctions thiols, ayant une forte nucléophilie, sont capables de réagir avec de nombreux électrophiles du milieu de culture cellulaire (sous réserve de leur internalisation), pouvant causer une dégradation des cellules. Cette réactivité semble s'exprimer au travers de la toxicité observée et à minima, rentrer en compétition avec la réactivité redox.

### b) Avec l'acide téréphtalique

L'acide 1,4-dibenzoïque ou téréphtalique **14** a également été étudié comme contrôle. Ce composé permet d'évaluer l'effet des groupements thiols sur la prolifération cellulaire. Le profil obtenu est représenté à la figure 94.

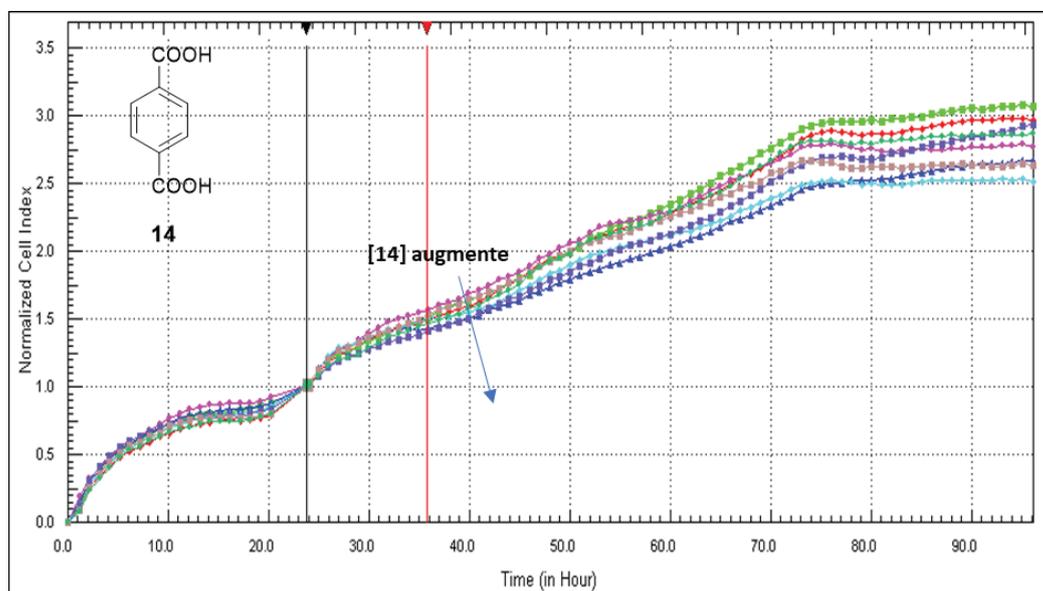


Figure 94 : profil du suivi cinétique de la prolifération des cellules cancéreuses avec injection d'acide téréphtalique **14**. Rouge : contrôle, verte : 1 µM, bleu foncé : 10 µM, rose : 100 µM, violet : 500 µM, bleu clair : 1 mM et marron : 2 mM.

L'examen rapide de ce graphique montre qu'aucun ralentissement de la croissance cellulaire n'est observé et aucun effet dose-réponse détectable pour **14**. Nous pouvons conclure que la cytotoxicité est liée à la présence de groupements thiophénols et la formation du récepteur est un prérequis pour observer un effet thérapeutique. Des expériences avec d'autres macrocycles à forte affinité pour les polyamines biogéniques doivent également être effectuées pour comparer leur activité biologique avec celle du dyn[4]arène **4**.

## B) Comparaison avec d'autres récepteurs macrocycliques

### a) Avec le cucurbituril CB[7]

Des expériences similaires ont été effectuées avec le macrocycle **CB[7]** commercial dans la même gamme de concentrations que pour les manipulations précédentes. Da Silva et. al. ont rapporté que **CB[7]** complexe les polyamines avec de très bonnes constantes d'association dans l'eau à 298 K (tableau 16).<sup>100</sup>

Complexation <b>CB[7]</b> - Ligands	Putrescine <b>6</b> <sub>4</sub>	Spermine <b>8</b>	Spermidine <b>7</b>
K( <b>CB[7]</b> – ligand) en M <sup>-1</sup> à 298 K	3,2 10 <sup>7</sup>	3,7 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>5</sup>

Tableau 16 : constantes d'association entre CB[7] et les polyamines

Le **CB[7]** ne provoque pas un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses et aucune dépendance en concentration n'a été constatée (figure 95). En effet, le profil représenté à la figure 96 montre une quantification de l'indexation cellulaire à 12 heures en fonction de la

concentration en **CB[7]** introduite. Aucun  $IC_{50}$  ne peut être extrait après modélisation, ni affirmer un effet antiprolifératif avec **CB[7]** alors qu'il est apte à complexer les polyamines (malgré une affinité bien plus faible que **4**<sub>4</sub>).

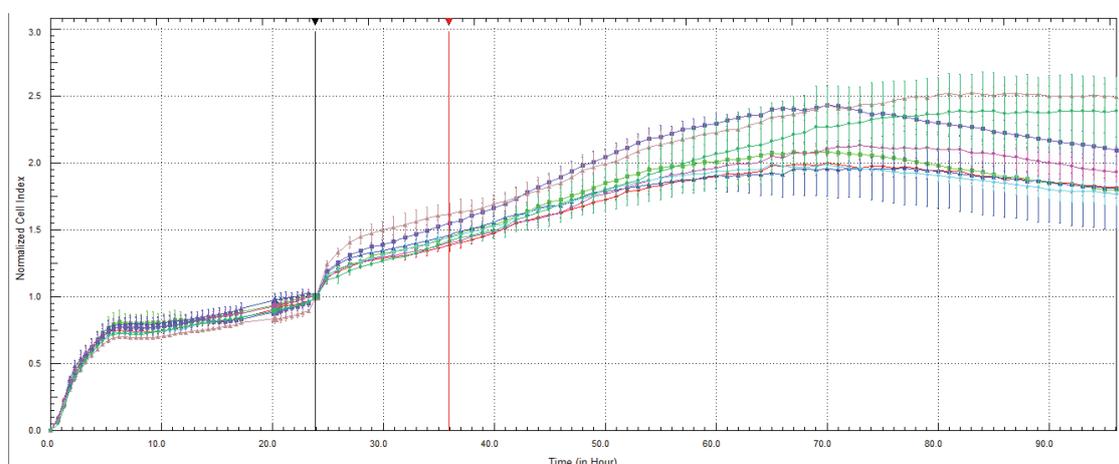


Figure 95 : profil du suivi cinétique de la prolifération des cellules cancéreuses avec différentes concentrations de brique **4** injectée. Rouge : contrôle, vert clair : 1  $\mu$ M, vert foncé : 10  $\mu$ M, bleu foncé : 50  $\mu$ M, rose: 100  $\mu$ M, bleu clair : 500  $\mu$ M, violette : 1 mM, marron : 2 mM.

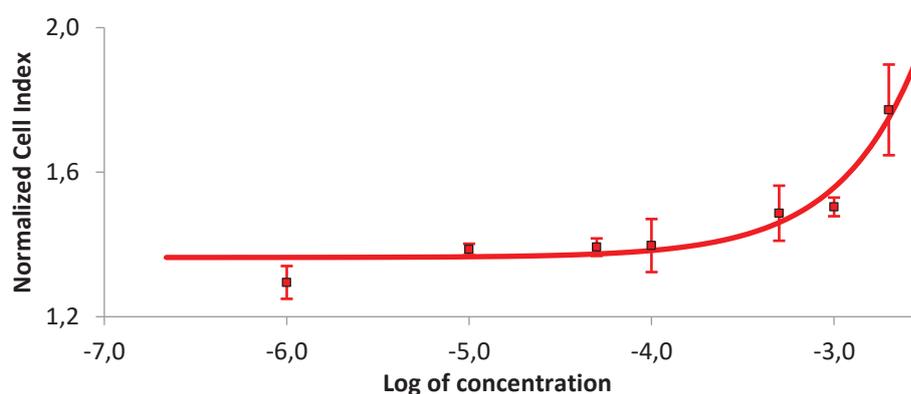


Figure 96 : Courbe dose-réponse et mesure de l' $IC_{50}$  de CB[7]

#### b) Avec le macrocycle **4**<sub>3</sub>

Des expériences similaires ont été conduites avec le dyn[3]arene hexacarboxylate **4**<sub>3</sub>. Le profil du suivi cinétique de la prolifération des cellules HeLa après injection de **4**<sub>3</sub> à différentes concentrations est présenté en figure 97. On observe un léger effet cytotatique dépendant de la dose en macrocycle. Cependant, lors de la détermination du paramètre  $IC_{50}$ , la modélisation indique que le profil observé correspond à une sigmoïde incomplète. Un  $IC_{50}$  moyen de  $2,26 \pm 0,55$  mM à l'issue de trois mesures concordantes a pu être extrait. Augmenter la gamme de concentration d'étude semble nécessaire pour compléter le profil. Un effet cytotatique, bien que moindre que pour le macrocycle **4**<sub>4</sub> semble néanmoins observé de la part du macrocycle **4**<sub>3</sub>.

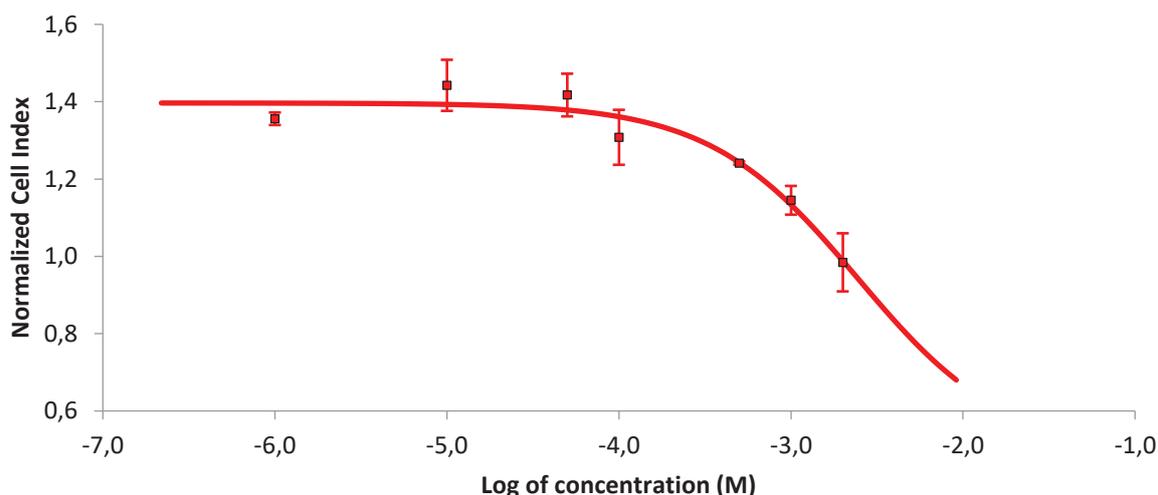


Figure 97 : Courbe dose-réponse et mesure de l'IC<sub>50</sub> de **4<sub>3</sub>**

Ces deux expériences menées sur **CB[7]** et **4<sub>3</sub>** n'ont pas montré d'effet thérapeutique marqué contrairement à **4<sub>4</sub>**. La forte association **4<sub>4</sub>** et les polyamines est donc en jeu dans ce processus. Il reste à savoir lesquelles de ces polyamines sont responsables de ce processus.

### C) Incubation avec des complexes dynarènes-polyamines

Dans le but de déterminer si l'activité du dyn[4]arène est liée à la disponibilité de sa cavité, nous avons engagé une série de suivis cinétiques avec des pré-complexes entre **4<sub>4</sub>** et la putrescine **6<sub>4</sub>**, la spermine **8** et la spermidine **7**. Le tableau 17 rappelle les valeurs des constantes d'association obtenues entre **4<sub>4</sub>** et les différentes polyamines. Pour un mélange à 1 mM en hôte et en invité, le pourcentage de dynarène non complexé est présenté dans ce même tableau.

Association <b>4<sub>4</sub></b> -ligand	Putrescine <b>6<sub>4</sub></b>	Spermine <b>8</b>	Spermidine <b>7</b>
K ( <b>4<sub>4</sub></b> – ligand) en M <sup>-1</sup>	1,05 10 <sup>7</sup>	7,12.10 <sup>10</sup>	2,43.10 <sup>11</sup>
Pourcentage de <b>4<sub>4</sub></b> non complexé lors de la préparation d'un complexe <b>4<sub>4</sub></b> -ligand à 1 mM	1,0%	0,01%	0,006%

Tableau 17 : Rappel des constantes d'association entre le dyn[4]arène et les polyamines

Chacun des suivis cinétiques est effectué en comparaison à un contrôle (absence de macrocycle) et à un système de référence (avec le macrocycle seul **4<sub>4</sub>**). Les différents complexes testés correspondent à des ratios 1/0.5, 1/1, 1/2 (**4<sub>4</sub>**/ligand). Dans chacun des cas, la concentration en dyn[4]arène est de 1 mM. Les analyses comparatives présentées ci-dessous ont été effectuées 12 heures après introduction des molécules dans le milieu de culture.

La figure 98 présente l'indexation cellulaire en présence des différents mélanges dynarène-putrescine **4<sub>4</sub>-6<sub>4</sub>**. Pour chacun des ratios ajoutés, les valeurs de l'indexation cellulaire sont comparables à celles obtenues macrocycle seul et sont toujours inférieures au contrôle. Ce résultat semble indiquer que l'occupation de la cavité par la putrescine n'est pas préjudiciable à l'activité cytostatique. A la vue des constantes d'associations, les polyamines biogéniques (spermine et spermidine) peuvent remplacer cette diamine dans la cavité.

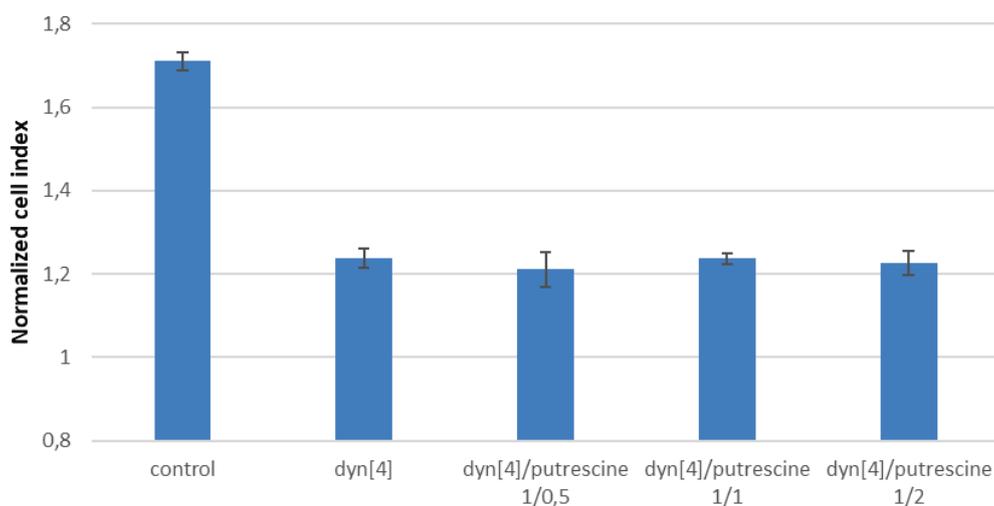


Figure 98 : Comparaison de l'indexation cellulaire 12 heures après injection de différents mélanges dynarène-putrescine **4<sub>4</sub>-6<sub>4</sub>**

Ces mêmes expériences ont été effectuées avec des complexes dynarène-spermidine **4<sub>4</sub>-7**. Les résultats présentés en figure 99 semble indiquer à nouveau que le ratio **4<sub>4</sub>/7** n'a pas d'influence sur la prolifération des cellules, car ils sont tous similaires au cas du macrocycle seul. Dans tous ces cas, un effet antiprolifératif complet est observé. La complexation de la spermidine ne semble pas être le phénomène mis en jeu dans le ralentissement de la croissance des cellules HeLa.

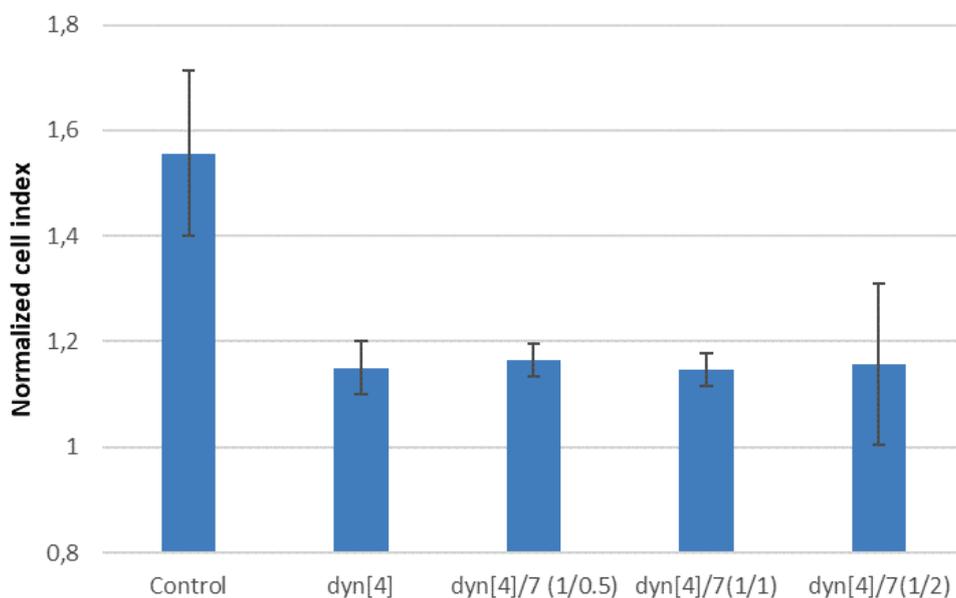


Figure 99 : Comparaison de l'indexation cellulaire 12 heures après injection de différents mélanges dynarène spermidine **4<sub>4</sub>-7**

Ces expériences ont enfin été réitérées avec des mélanges dynarène-spermine **4<sub>4</sub>-8**. Les résultats sont présentés en figure 100. Un effet de la complexation de la spermine est noté ici. Dans le cas de la première expérience effectuée, on observe que les complexes ont un effet anti-prolifératif. Cependant, on note que cet effet s'atténue légèrement avec l'augmentation de la quantité de

spermine. Dans la deuxième expérience, seuls les cas du dynarène seul et du mélange dynarène-spermine (1/0,5) présentent un effet anti-prolifératif. L'atténuation avec l'augmentation de la quantité de spermine est bien plus marquée. Ces résultats sont néanmoins à consolider : dans le premier cas, les barres d'erreurs semblent indiquer des cas similaires quel que soit le ratio de spermine ajouté au dynarène. Dans le deuxième cas, la valeur de l'indexation cellulaire dans le contrôle est très faible et la valeur de l'indexation cellulaire en présence du dynarène seul est inférieure à 1, ce qui indiquerait un effet cytotoxique et qui est contradictoire avec les résultats précédents. Néanmoins, ces résultats semblent montrer que la présence de complexe dynarène-spermine produit un effet thérapeutique moindre par rapport au cas où la cavité est disponible. Il faudrait consolider ces expériences pour pouvoir valider de l'hypothèse selon laquelle la complexation de la spermine au sein des cellules explique le ralentissement de la prolifération cellulaire.

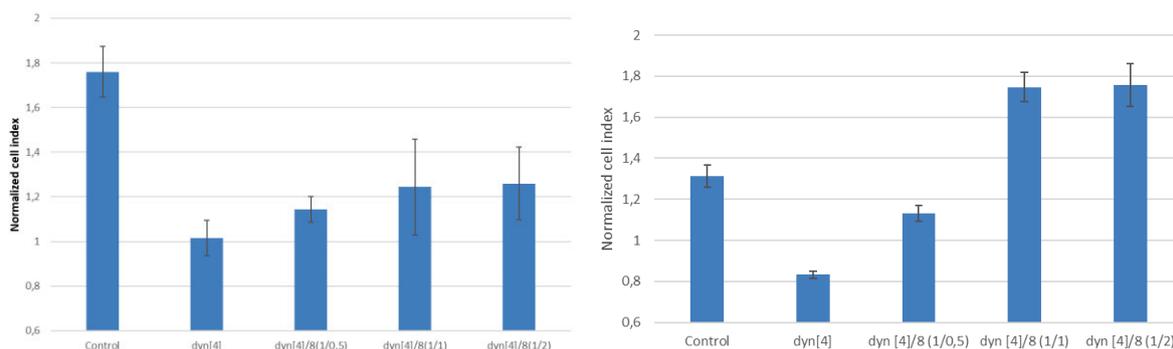


Figure 100 : Comparaison de l'indexation cellulaire 12 heures après injection de différents complexes dynarène –spermine **4<sub>4</sub>-8** sur deux expériences différentes.

Une nouvelle expérience de suivi cinétique a été effectuée sur un complexe dynarène-spermine **4<sub>4</sub>-8** avec un ratio 1 :1 à des concentrations comprises entre 1  $\mu$ M et 2 mM. La modélisation du profil dose-réponse obtenu 12 heures après injection, présenté en figure 101, permet l'extraction d'un  $IC_{50} = 203.3 \pm 90.7 \mu$ M. Cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le dyn[4arène seul, soulignant un effet thérapeutique amoindri par complexation. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la séquestration de la spermine dans la cavité du dyn[4arène soit responsable de l'effet thérapeutique observé.

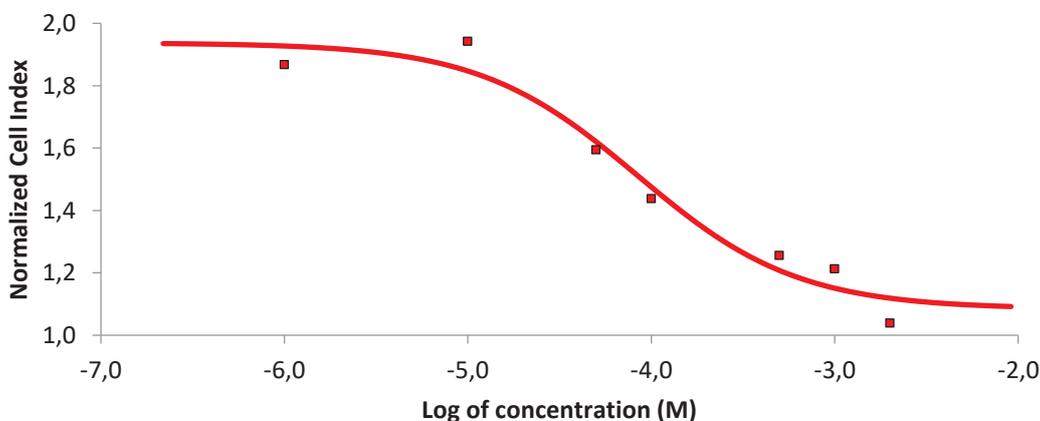


Figure 101 : Profil dose réponse par injection de complexe dynarène-spermine **4<sub>4</sub>-8**

Au travers de ces divers résultats, il semblerait que l'origine de l'effet anti-prolifératif du macrocycle **4** semble provenir d'une complexation de la spermine des cellules par le macrocycle **4**. L'hypothèse de départ n'est pas totalement validée, mais semble être en faveur de ce postulat. Nous allons maintenant tenter d'identifier le lieu d'action du macrocycle **4** dans le but de valider la seconde hypothèse.

### 3) Etude de l'internalisation dans les cellules

Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle le macrocycle est capable de rentrer dans les cellules, nous avons synthétisé un fluorophore susceptible d'être complexé par le macrocycle **4** pour pouvoir faire des expériences de microscopie.

#### A) Conception d'un ligand fluorophore

Connaissant la remarquable affinité du dynarène **4** pour la spermine **8**, nous avons synthétisé un dérivé de la spermine, le fluorophore FITC-spm **15**, décrit dans la littérature comme sonde supramoléculaire (figure 102).<sup>101</sup>

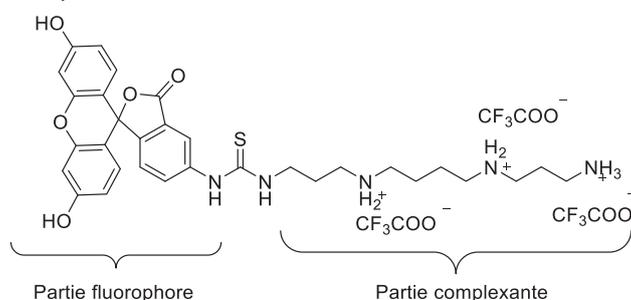


Figure 102 : structure du fluorophore FITC-spm **15**

Une synthèse a été effectuée en trois étapes (figure 103). La première étape a consisté à protéger toutes les fonctions amines de la spermine **8** sauf une amine terminale dans le but d'obtenir **16**. Pour cela, une monoprotection préliminaire de l'amine terminale a été effectuée à l'aide d'un trifluoroacétate d'éthyle dans le méthanol. Ensuite, une protection par le tert-dibutoxycarbonyl Boc<sub>2</sub>O a permis de protéger les amines restantes. Enfin, ayant utilisé des groupements protecteurs orthogonaux vis-à-vis d'un traitement basique, de la soude concentrée est utilisée pour cliver chimiosélectivement le groupement trifluoroacétate. On obtient ainsi, après ces 3 étapes en « one-pot », la molécule **16** avec un rendement de 30% similaire aux rendements obtenus dans la littérature. La seconde étape a consisté à effectuer une réaction d'addition nucléophile sur l'isothiocyanate de la fluorescéine **17** a permis un couplage entre partie complexante et partie fluorophore. La molécule **18** a été obtenue avec un très bon rendement de 81 %. Enfin, la déprotection des groupements tert-butoxycarbonyl en milieu acide, à l'aide de l'acide trifluoroacétique dans le méthanol a permis l'obtention de FITC-spm **15** avec un rendement de 82%. On obtient un rendement global de 20% pour la synthèse de **15** à partir de la **8**.

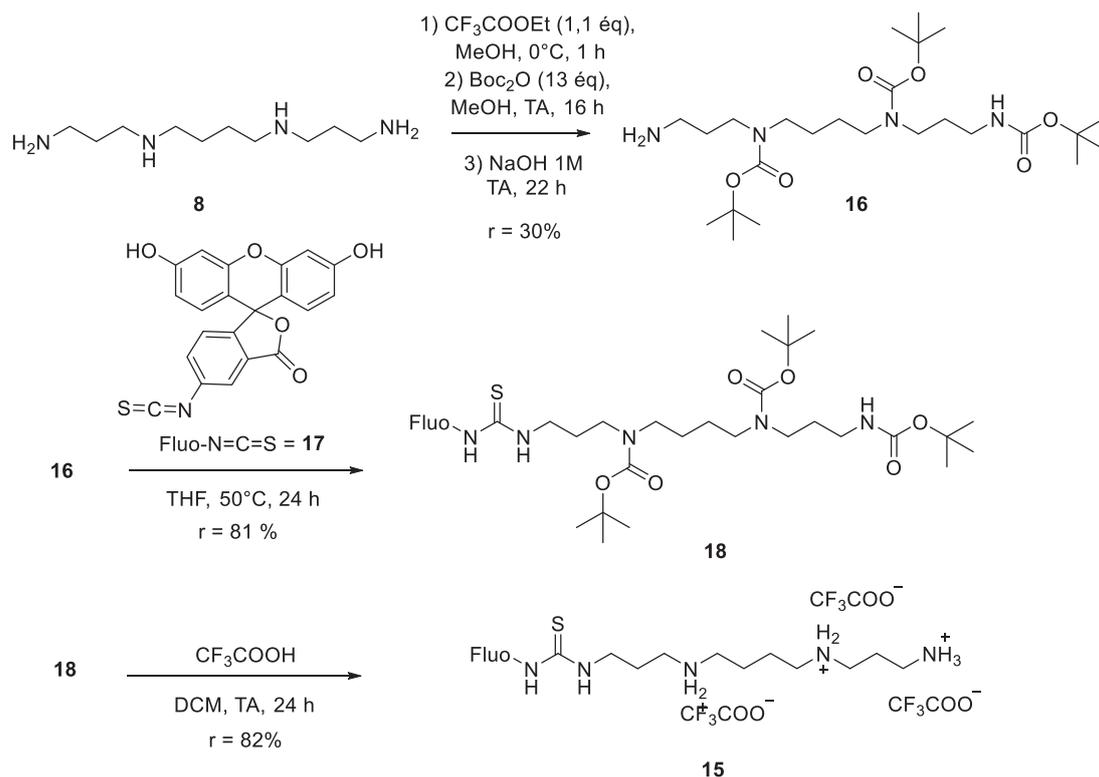


Figure 103 : synthèse du fluorophore FITC-spm **15**

Nous avons souhaité évaluer l'affinité entre le FITC-spm **15** et le dynarène **44**. Des expériences en ITC ont été menées en tampon TRIS 200 mM à pH = 7,4 à 298 K. Le thermogramme, présenté en annexe C, témoigne d'une association 1:1. Une constante d'association de  $1,67 \cdot 10^6 \pm 0,61 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  a été mesurée pour cette association ; la réaction est favorisée enthalpiquement ( $\Delta H = -27,9 \text{ kJ/mol}$ ) et entropiquement ( $-T\Delta S = -12,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Ainsi, le complexe **44-15** pourrait être utilisé comme sonde. Ce fluorophore ne présente pas de modification de signal de fluorescence qu'il soit complexé ou non.

### B) Expérience de microscopie : internalisation dans les cellules

Des expériences de microscopies de fluorescence ont été effectuées dans le but de suivre le complexe macrocycle-sonde. La constante d'association obtenue entre le système **44** et le FITC-spm **15** étant plus faible que celle obtenue avec la spermine **8**, il sera possible de détecter soit le complexe **44-15**, soit le fluorophore **15** seul dans le cas où une substitution aurait eu lieu. 3 manipulations, résumées dans le tableau 18, ont été effectuées. Les clichés obtenus à l'issue de l'incubation sont présentés en figure 104 à la page suivante.

Entrée	Système	Concentration de la solution injectée
1	Contrôle	/
2	<b>15</b>	10 $\mu\text{M}$
3	<b>44/15</b> - 1/1	10 $\mu\text{M}$

Tableau 18 : Systèmes et concentrations utilisés lors de l'injection dans les systèmes cellulaires. Après 1 heure d'incubation, les systèmes cellulaires sont analysés au microscope à fluorescence.

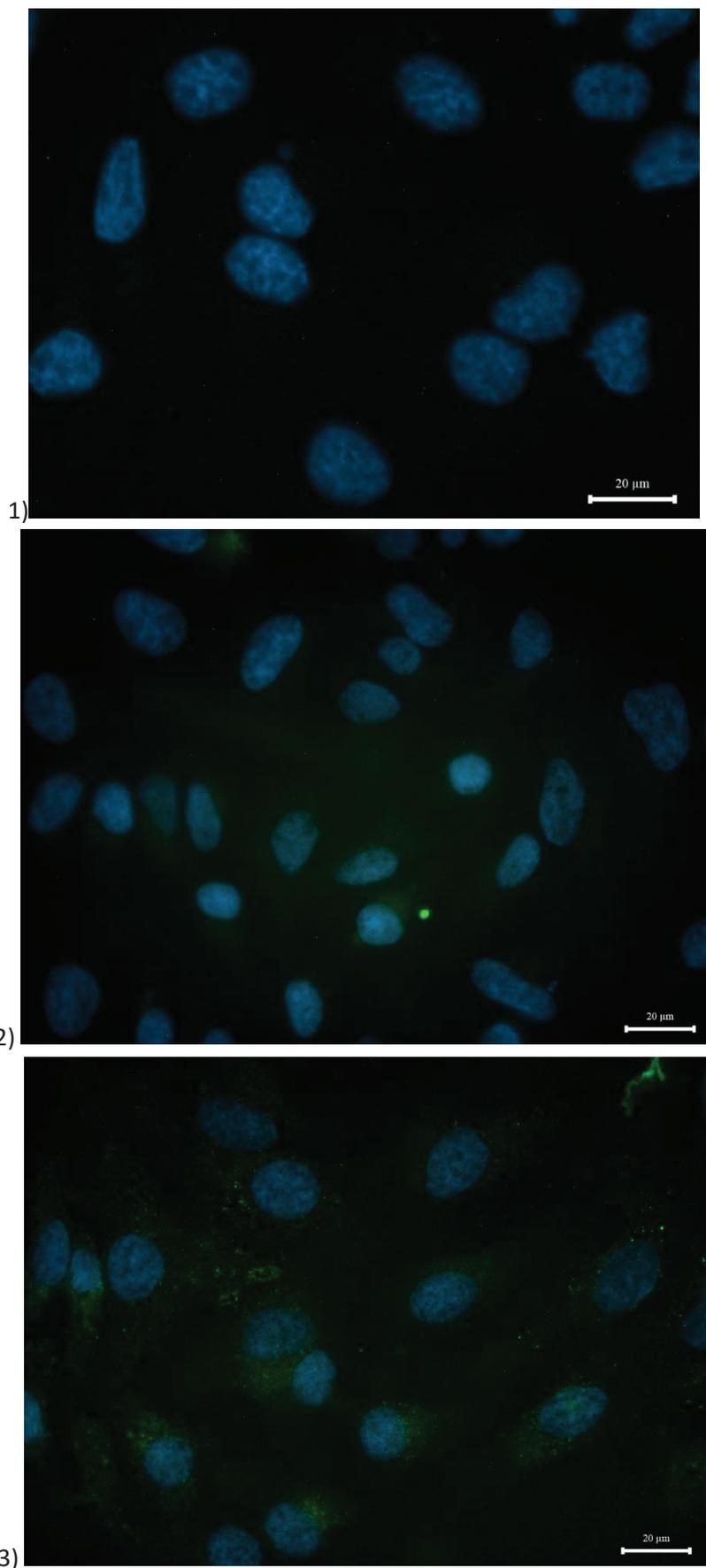


Figure 104 : cliché de microscopie de fluorescence sur les cellules HeLa. Cliché 1 : Contrôle. Cliché 2 : en présence de **15**. Cliché 3 : en présence de **4**-**15**. (Voir partie expérimentale pour détail)

A l'aide de la mesure de la constante d'équilibre par ITC, on peut remonter à la proportion de forme libre et de forme complexée dans l'échantillon injecté. Lors de la préparation des échantillons à  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , on a 77% de forme complexée et 22% de forme libre pour le fluorophore. En l'absence de ligand plus puissant que le fluorophore, le signal de fluorescence peut être quasi exclusivement attribué au macrocycle marqué.

Un fluorophore supplémentaire (Hoechst 33342) émettant dans le bleu à 488 nm et ciblant sélectivement les noyaux a été ajouté de manière à détecter ce compartiment. Ainsi, sur la figure 104, le premier cliché présente le contrôle et montrer la présence du fluorophore Hoeschst 33342 en bleu dans le noyau uniquement. Le second cliché correspond au FITC-spm **15** à  $50 \mu\text{M}$ . On observe la présence de petits points verts très diffus autour des noyaux. Il semblerait que le fluorophore seul soit internalisé. Enfin, le troisième cliché présente le cas du mélange **4<sub>4</sub>-15**. Des vésicules vertes, suggérant une internalisation par phagocytose, sont observées pour le complexe : de manière qualitative, il semblerait même que l'internalisation soit améliorée par la formation d'un complexe d'inclusion, car les vésicules vertes sont beaucoup plus visibles sur le cliché de la figure 104c par comparaison à 104b. Pour confirmer la présence du fluorophore uniquement dans le cytoplasme et non dans le noyau, nous avons comparé les clichés obtenus à l'aide des différents canaux de fluorescence pour détecter séparément les deux fluorophores. Ces clichés sont présentés à la figure 105 et confirment que l'internalisation n'a pas lieu dans le noyau et uniquement dans le cytoplasme.

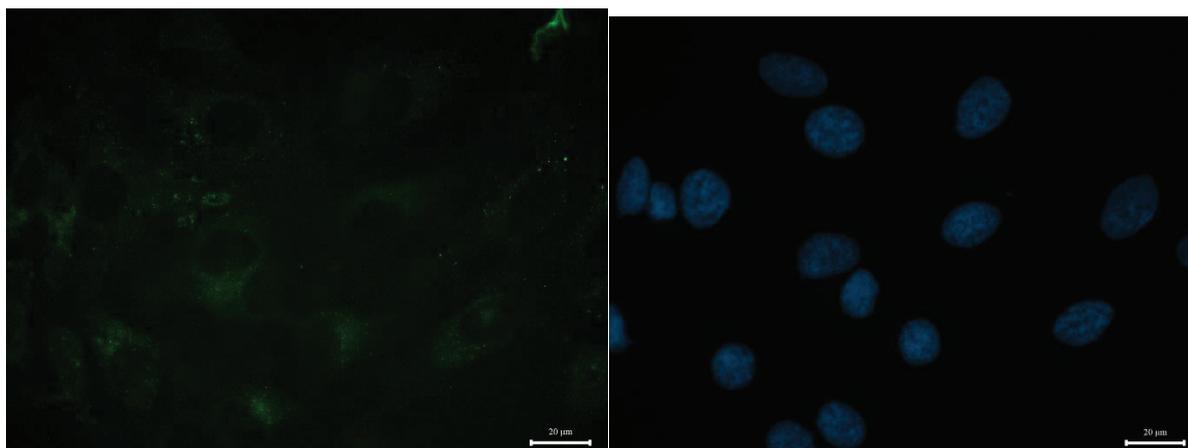


Figure 105 : Clichés de microscopie. Observation à différents canaux pour détecter séparément les deux fluorophores sur l'échantillon incubé avec le complexe **4<sub>4</sub>-15**.

### C) Conclusion sur les hypothèses

A l'aide des différentes expériences, nous pouvons proposer le mode d'action du dynarène. En effet, l'effet cytotatique serait produit par séquestration de la spermine dans le cytoplasme des cellules. Le mode d'action du dyn[4]arène est résumé à la figure 106, des expériences supplémentaires sont à effectuer pour consolider ce modèle. Nous avons vu que l'effet cytotatique est observé pendant un temps court de quelques heures. Nous proposons de nouvelles manipulations dans le but d'expliquer le caractère transitoire de cette action.

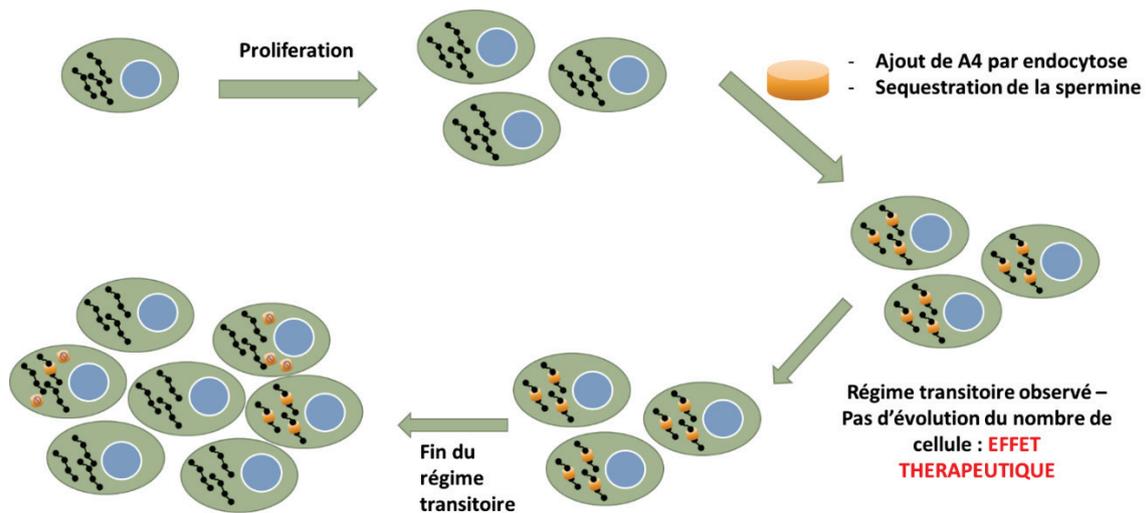


Figure 106 : Schéma bilan du mode d'action supposé de  $4_4$  au sein des cellules.

## IV) Identification de l'origine du régime transitoire

### 1) Position du problème et hypothèses

Plusieurs hypothèses sont émises de manière à interpréter l'origine du régime transitoire observé lors de l'injection de  $4_4$  dans le système de culture cellulaire.

- La première hypothèse repose sur la capacité du système pour s'autoréguler. Nous émettons alors l'hypothèse que la spermine synthase est capable de détecter la diminution de la spermine dans le cytoplasme, si celle-ci est réellement séquestrée par le macrocycle. Ainsi, elle va produire de la spermine, et cette nouvelle quantité apportée est responsable de la prolifération à nouveau observée.
- La seconde hypothèse est fondée sur la fragilité de la structure macrocyclique. On suppose que dans le milieu les ponts disulfures peuvent être rompus, par des réactions de réduction cinétiquement lente. Ainsi, après 12 heures, la spermine séquestrée serait relâchée ce qui expliquerait la ré-augmentation de l'indexation cellulaire.

### 2) Détermination de l'évolution la quantité de spermine synthetase

#### A) Contexte

Dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle le système possède un moyen de régulation, nous allons déterminer l'évolution de la quantité de spermine synthase. Pour cela, il faut premièrement être capable de mesurer le taux de protéine dans le système et ensuite déterminer le nombre d'enzyme. De manière à comparer les données entre les systèmes de la meilleure façon, nous comparerons ainsi les ratios enzyme/protéine, car la quantité de protéine peut varier d'un système à l'autre : on peut normaliser ainsi les données. Dans les expériences suivantes, nous avons utilisé trois systèmes : un contrôle sans injection de  $4_4$ , un système de milieu de culture avec  $4_4$  à  $10 \mu\text{M}$  et un système avec  $4_4$  à  $1 \text{mM}$  avec une détermination des grandeurs à  $t_1 = 24$  heures et  $t_2 = 48$  heures.

## B) Détermination du taux de protéine

Un kit commercial a été utilisé pour déterminer la quantité totale de protéine. Le principe repose sur la réaction de réduction du cuivre en présence des protéines des cellules, en milieu alcalin. Ainsi, la formation du cuivre(I) à partir du cuivre(II) est détectée par la formation d'un complexe violet avec deux équivalents d'acide 2,2'-bisquinoléine-4-4'-dicaarboxylique (BCA) présent dans le kit (figure 107). L'analyse en spectroscopie UV-visible de ce complexe violet permet, à l'aide de la loi de Beer-Lambert, de remonter à la quantité de protéine dans les cellules.

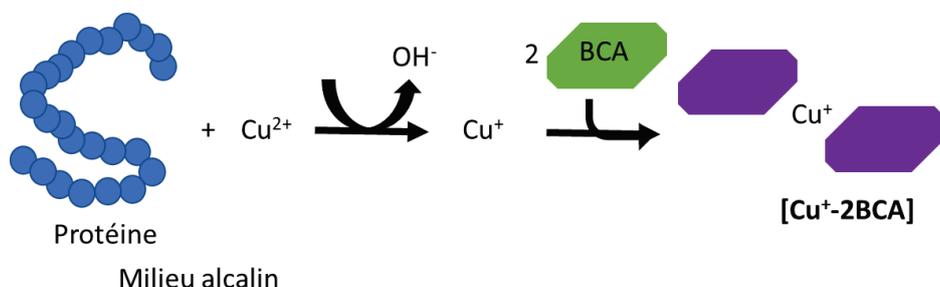


Figure 107 : Présentation du principe de la méthode de détermination du nombre de protéine

Après avoir tracé une droite de calibration pour une solution standard (cf. annexe F), on mesure le nombre total de protéine des trois systèmes étudiés. Les résultats sont résumés dans la figure 108. En comparant les 3 contrôles entre eux, on constate une augmentation globale avec le temps du nombre de protéine. A  $t_1 = 24$  h, la prise en compte des barres d'erreur indique qu'avec ou sans **4** les systèmes possèdent un nombre de protéine similaire. La même conclusion est tirée entre les différents systèmes à  $t_2$ . On conclut donc à une augmentation du nombre de protéine, en accord avec l'augmentation du nombre de cellule après 24 heures et 48 heures d'injection.

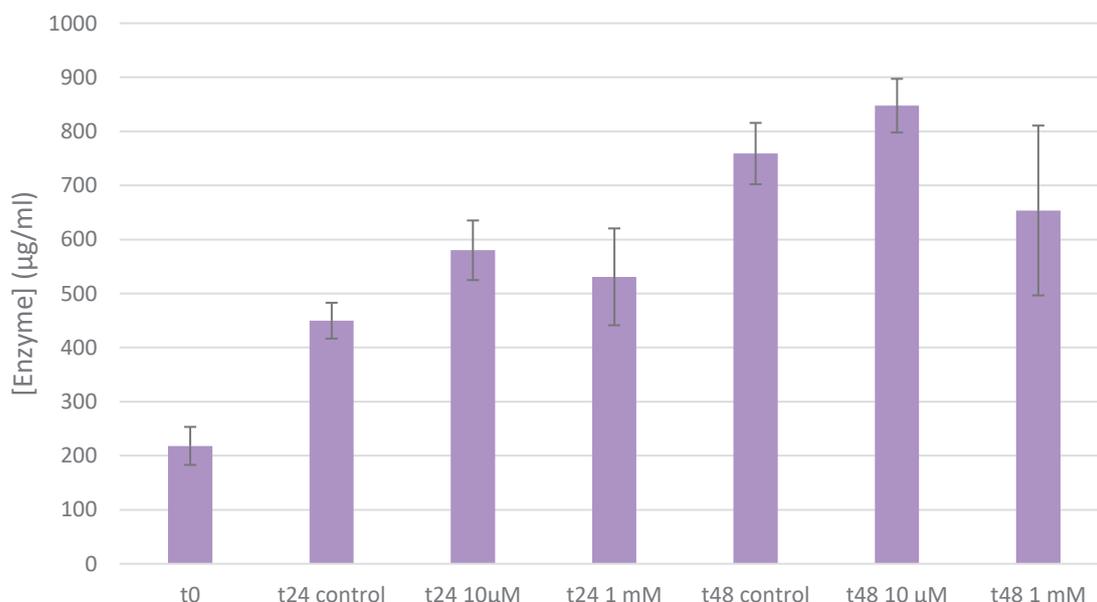


Figure 108 : Nombre de protéines en présence ou non de macrocycle à 10 µM et 1 mM.

### C) Détermination du taux d'enzyme

Un kit ELISA a été utilisé pour mesurer spécifiquement la quantité de spermine synthase humaine dans le système cellulaire étudié. Le principe de ce kit est présenté à la figure 109 : une première étape consiste à incuber la solution d'un antigène spécifique avec l'anticorps de la spermine synthase. Cet antigène se fixe au fond du puits. La seconde étape est l'incubation de l'anticorps à doser. La troisième étape consiste à ajouter un anticorps, capable de reconnaître l'anticorps à doser, couplé à une enzyme spécifique. Enfin, la dernière étape consiste à ajouter un substrat produisant un complexe coloré en présence de l'enzyme spécifique (ici la spermine synthase). L'analyse en spectroscopie UV-visible de la solution résultante permet de mesurer la quantité d'enzyme recherchée.

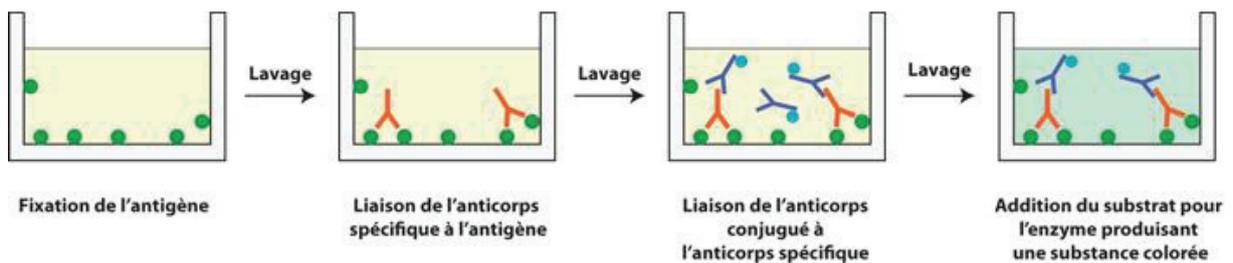


Figure 109 : principe du kit ELISA

Nous avons donc analysé les trois systèmes à  $t_0$ ,  $t_1$  et  $t_2$ . Après tracé d'une droite d'étalonnage (annexe E), un dosage du complexe jaune formée a été effectuée afin d'obtenir la quantité d'enzyme. Les chiffres obtenus ont été divisés par le nombre de protéines déterminé précédemment, pour mesurer les ratios enzyme/protéine. Ces données sont résumées sur la figure 110.

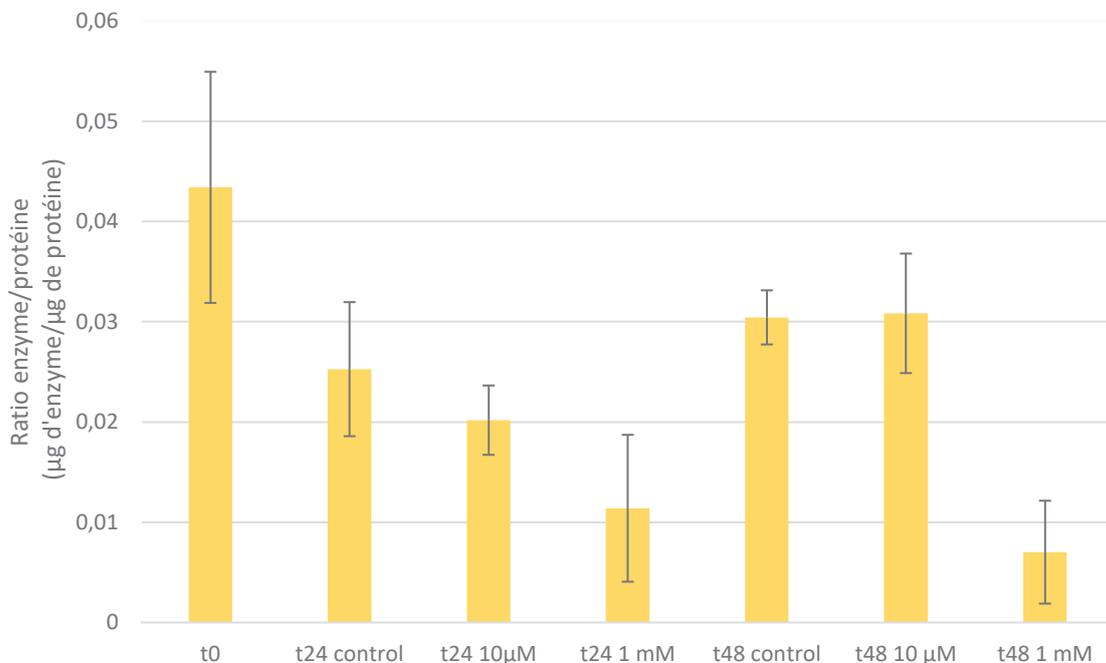


Figure 110 : mesure du ratio enzyme/protéine

Nous avons effectué une comparaison statistique à l'aide du logiciel Sigmastat. Une première analyse des données avec les erreurs statistiques, comparant les 3 contrôles entre eux, montre un ratio enzyme sur protéine constant entre les temps  $t_0$ ,  $t_1$  et  $t_2$ . Ensuite, à  $t_1 = 24$  heures, les systèmes ayant évolué en présence de **4<sub>4</sub>** présentent le même ratio enzyme/protéine que le contrôle : il n'y a donc pas de modification du nombre d'enzyme due à la présence de **4<sub>4</sub>**. Enfin, au temps  $t_2 = 48$  heures, le contrôle est uniquement comparable au cas **4<sub>4</sub>** à  $10 \mu\text{M}$ . Pour le cas **4<sub>4</sub>**  $1 \text{ mM}$ , il y a une chute du ratio par rapport au contrôle. On en conclut que le système subit une variation constante du nombre d'enzyme à faible concentration en **4<sub>4</sub>** et une diminution de ce nombre à forte concentration en **4<sub>4</sub>**. Ainsi, on infirme l'hypothèse selon laquelle le système est capable d'autoréguler le taux de spermine.

#### D) Conclusions

Dans cette partie, nous avons mis en évidence une application au sein des cellules à l'utilisation de composé de la famille des dynarènes. En effet, la séquestration des polyamines, notamment de la spermine, semble être la cause de l'effet cytotatique antiprolifératif transitoire, non cytotoxique, observé sur les cellules HeLa. L'activité biologique de la spermine au sein du complexe en ainsi masquée. L'utilisation d'un fluorophore dérivé de la spermine a permis de mettre en évidence l'internalisation du complexe moléculaire au sein des cellules par mécanisme de phagocytose. L'effet thérapeutique observée pendant quelques heures n'a pas été totalement interprété, même si une hypothèse a été écartée. En effet, le système cellulaire ne tend pas à s'autoréguler en surproduisant de la spermine à l'aide la spermine synthase, pour réajuster la quantité de spermine séquestrée par le dynarène. Ainsi, nous postulons l'hypothèse selon laquelle la fragilité des ponts disulfures au sein du système cellulaire est responsable du relâchement la spermine séquestrée, ce qui permet au système cellulaire de reprendre le processus de prolifération. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait reproduire un milieu cellulaire artificiel et effectuer un suivi cinétique de la stabilité du dyn[4]arène dans ce milieu.

## CONCLUSION DU CHAPITRE 1

En conclusion de ce premier chapitre, nous avons présenté la formation d'une nouvelle famille de récepteurs moléculaires appelés dyn[n]arènes, synthétisée à l'aide d'une procédure de chimie dynamique combinatoire. L'identification de nouveau membre de la famille des dynarènes a été concluante à l'aide de nouvelles chimiothèques sur des thiols fonctionnalisés par des groupements carboxylates. Les différents comportements de ces briques face à des templates ont permis d'isolation de deux macrocycles par précipitation sélective : le dyn[3]arène hexacarboxylates et le dyn[4]arène octacarboxylates. La synthèse de ces objets, effectuée en solution aqueuse et ne nécessitant aucune purification par chromatographie a été développé aisément à l'échelle du gramme. Nous avons pu ainsi caractériser ces hôtes structurellement par des informations structurales : stéréochimie, charge en solution ou encore le diamètre de la cavité.

Ces hôtes moléculaires ont été ainsi décrits comme des récepteurs moléculaires capables d'effectuer de la reconnaissance de polyamines, de métaux ou encore d'acide aminés. Des associations hors cavité ont été mises en évidence avec le dyn[3]arène, due au faible volume de sa cavité tandis que des complexes d'inclusion ont été analysés avec le dyn[4]arène. Une étude thermodynamique sur une série d' $\alpha,\omega$ -alkyle-diamines a permis de souligner le rôle du solvant dans la complexation. En effet, une forte stabilisation enthalpique de solvatation explique les fortes sélectivités observées lors des complexation du dyn[4]arène avec les polyamines organiques. Pour les métaux, les lanthanides s'avèrent être de meilleurs complexants du dyn[4]arène par rapport aux métaux de transition et aux alcalino-terreux. Le rôle effecteur du calcium a été souligné lors de la complexation dyn[4]arène et histidine. Les ions sodium présentent aussi un rôle effecteur lors de la complexation du dyn[4]arène avec l'hexane-1,6-diol à l'état solide uniquement.

Les excellentes constantes reportées lors de la complexation avec les polyamines, et la compatibilité du récepteur avec les conditions physiologiques nous ont conduits à envisager des applications en milieu cellulaire. Une étude sur les cellules cancéreuses de type HeLa nous a permis d'observer un effet anti-prolifératif d'une dizaine d'heures du dyn[4]arène sur les cellules cancéreuses par encapsulation de la spermine. Nous avons prouvé à l'aide d'expérience de microscopie une internalisation dans le cytoplasme par phagocytose. Le caractère transitoire de cet effet thérapeutique n'est pas en lien avec une autorégulation du système, qui n'est pas capable de compenser la spermine séquestrée en la reproduisant. Nous émettons ainsi l'hypothèse que ce temps correspond à la cinétique de rupture de pont disulfure.

Dans le but de renforcer les liens entre les unités aromatiques dans la structure du récepteur, deux optimisations sont envisagées. Premièrement, il peut être envisagé de modifier les ponts disulfures en liens thioéthers ou en liens entre atomes de carbones. Ces modifications feront l'objet du prochain chapitre. Deuxièmement, une possibilité de modifier la réaction des thiols aromatiques, en présence d'aldéhyde en para du thiol, par formation de dithiocine. Ces nouveaux objets feront l'objet du dernier chapitre.



## CHAPITRE 2 : Modification structurelle des dynarènes par extrusion de soufre

**Objectif :** Dans ce chapitre, nous allons proposer une exploration des voies de post-fonctionnalisation de la structure des dynarènes (figure 111). La modification des ponts disulfures en lien thioéther ou en lien entre atomes de carbone pourrait permettre au récepteur moléculaire d'être plus robuste face aux oxydants et nucléophiles du milieu cellulaire. L'objectif principal est de voir s'il est possible de combiner chimie dynamique combinatoire et post-conversion en objets plus statique et robuste. L'objectif secondaire est donc de renforcer la durée de l'effet thérapeutique lors de l'injection du macrocycle au sein des cellules cancéreuses. Pour cela, des agents capables de modifier des ponts disulfures en solution aqueuse seront étudiés directement dans les chimiothèques. Diverses expériences seront réalisées dans le but de trouver les conditions opératoires optimales à la formation de thioéther. Des expériences complémentaires seront effectuées dans le but de rationaliser le système d'étude.

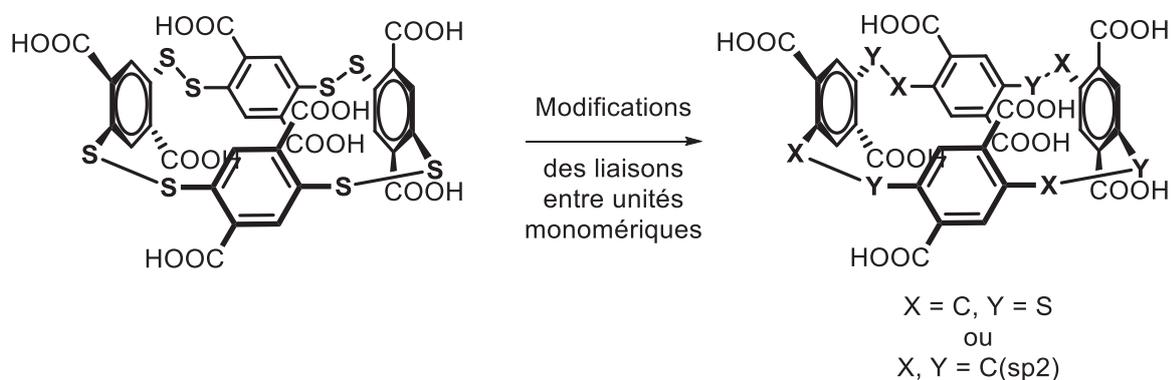


Figure 111 : Interconversion de fonction envisagée sur les dynarènes.

**Réalisation :** une étude bibliographique détaillant les grandes méthodes d'extrusion de soufre ainsi que les conditions les plus optimales recensées pour l'extrusion de soufre est d'abord présentée. Ensuite, des molécules modèles sont synthétisées dans le but d'identifier les conditions optimales pour effectuer des réactions de suppression de soufre. Sur les composés parents des briques moléculaires, aucun produit d'extrusion de soufre n'a été observé, quelles que soient les diverses conditions testées. Néanmoins, lorsqu'un agent phosphoré a été utilisé pour catalyser le processus étudié, un intermédiaire réactionnel particulièrement stabilisé a été identifié. De façon inattendue, nous avons montré que l'extrusion de soufre peut directement avoir lieu au sein de certaines bibliothèques de disulfures (figure 112).



Figure 112 : Nouveaux cyclophanes capables d'effectuer de l'auto-extrusion

## Partie A : Etude bibliographique – Formation de liens thioéthers par processus d'extrusion de soufre

### I) Présentation générale

#### 1) Définition

Depuis les années 60, les réactions d'élimination d'un ou plusieurs atomes de soufre sur une molécule organique ont été étudiées. Ces réactions sont appelées « réactions d'extrusion de soufre » ou « désulfurisation ». La plupart des travaux menés par Harpp et al., ont été développés entre les années 60 et 90. Depuis, peu de réactions d'extrusion ont été décrites dans la littérature.

La figure 113 présente des exemples de réactions d'extrusion de soufre. Le premier exemple est une extrusion de soufre à partir d'un pont trisulfure **II-A** à l'aide de la triphénylphosphine pour mener à un pont disulfure **II-B**.<sup>102</sup> Le deuxième exemple propose une synthèse de thioéther **II-D** à partir des disulfures **II-C**, en présence de cuivre métallique.<sup>103</sup> Ces deux exemples sont des extrusions partielles de soufre, car la totalité des atomes de soufre du substrat ne sont pas extrudés. Le troisième exemple présente une extrusion de soufre totale à partir de liens thioéthers **II-E** à l'aide d'un agent phosphoré dans le but de former des liaisons entre atomes de carbones **II-F**.<sup>104</sup>

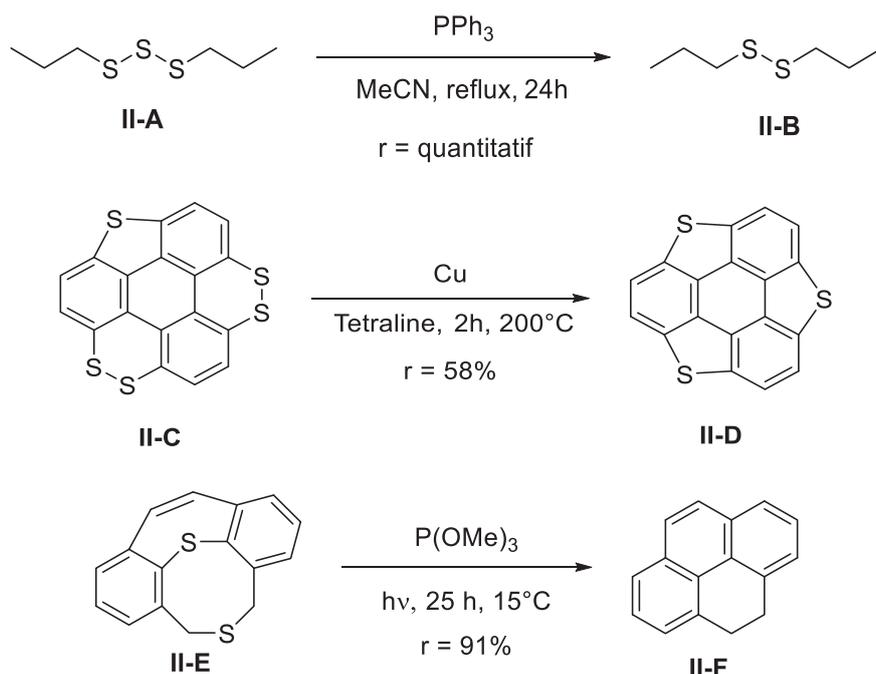


Figure 113 : Exemples de réactions d'extrusion de soufre partielles ou totales.

Ce phénomène peut présenter plusieurs intérêts en synthèse, notamment dans des stratégies d'interconversion de fonction ou pour effectuer une réduction de taille de cycle. Dans la suite, seule la conversion de disulfure en thioéther sera étudiée.

#### 2) Avantage des réactions d'extrusion de soufre pour la synthèse de thioéthers

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature pour synthétiser des liens thioéthers. La méthode classique consiste en une simple réaction de Williamson entre un thiol et un halogénoalcane. Cependant, ces substitutions nucléophiles ont souvent des rendements faibles, comme en témoigne

la synthèse du cyclophane **II-I** représenté à la figure 114 à partir de **II-G** et **II-H**.<sup>89</sup> Une stratégie combinant synthèse de ponts disulfure suivie d'une réaction d'extrusion de soufre à partir de deux **II-G** est décrite comme étant plus performante en termes de rendement.

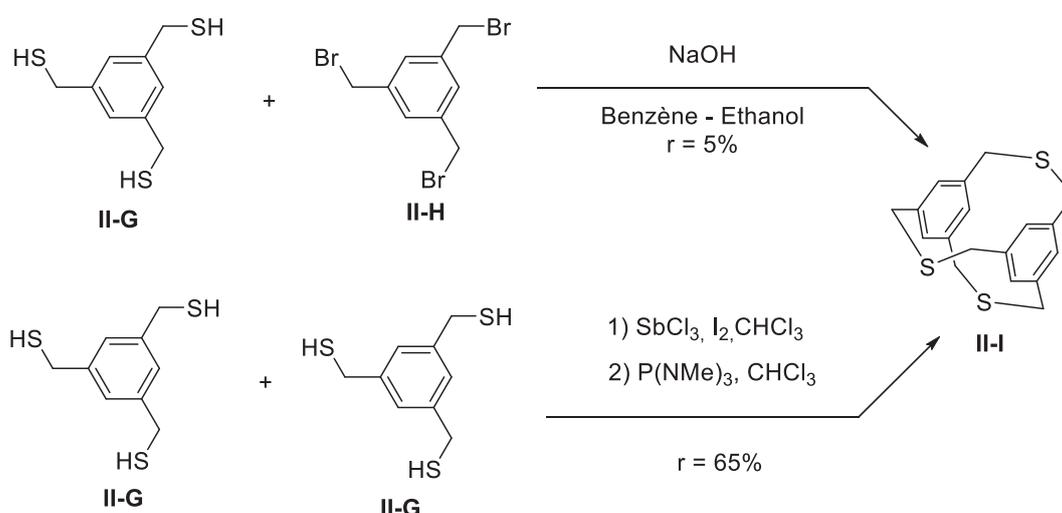


Figure 114 : Comparaison de la synthèse d'un thiacyclophane par substitution nucléophile ou par stratégie d'oxydation – extrusion.

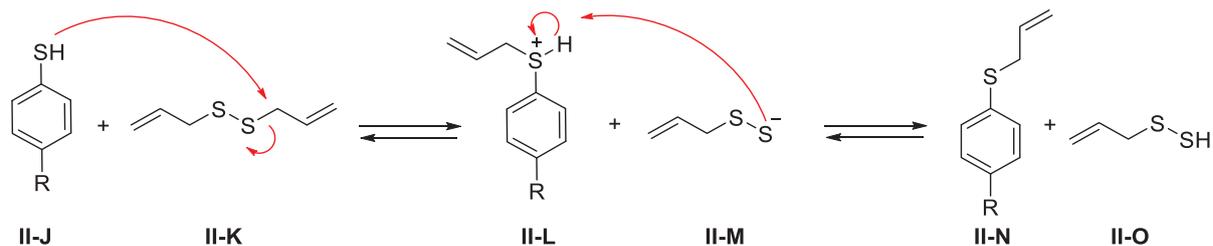
L'extrusion de soufre semble donc être une voie prometteuse pour former des liaisons thioéthers à partir de disulfures. Deux méthodes sont principalement reportées :

- par substitution directe.
- par action d'un agent phosphoré sur un disulfure.

## II) Synthèse de thioéther par substitution directe

Des réactions dites par substitution directe, entre un disulfure et un thiol libre, ont été décrites dans la littérature par Gates et coll. afin de synthétiser des thioéthers.<sup>105</sup> La figure 115 présente la différence entre réaction de substitution directe et réaction d'échange thiol-disulfure. Lors d'une réaction de substitution directe, le thiophénol **II-J** attaque l'atome de carbone en alpha de l'atome de soufre du disulfure **II-K** pour former les intermédiaires **II-L** et **II-M**. Après réaction acido-basique, le thioéther **II-N** est généré et le disulfure **II-O** apparaît comme sous-produit. Cette réaction peut être considérée comme une réaction de transfert de groupement allylique. Lors de la réaction de la réaction d'échange thiol-disulfure, le thiophénol **II-J** attaque un des atomes de soufre du disulfure symétrique **II-K** pour former les intermédiaires **II-P** et **II-Q**. Après réaction acido-basique, le disulfure dissymétrique **II-R** est obtenu ainsi qu'un thiol allylique **II-S**. L'électrophilie du disulfure au niveau des atomes de carbone et de soufre est donc à comparer lorsque ces réactions entrent en compétition.

"Substitution directe" sur le carbone - échange d'un groupement allylique :



Echange thiol - pont disulfure :

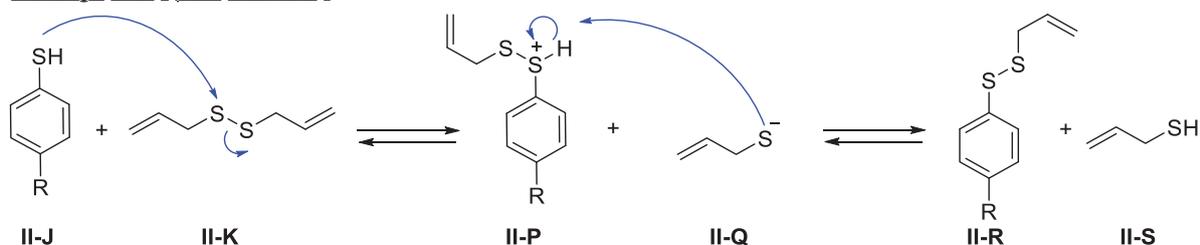


Figure 115 : réaction de substitution directe sur le carbone et réaction d'échange de ponts disulfures

Comme représenté en figure 116, les auteurs ont synthétisé un thioéther dissymétrique **II-U** à partir du disulfure allylique symétrique **II-K** et du thiophénol **II-T**. Dans le cas des disulfures allyliques, il semble donc possible d'avoir un atome de carbone assez électrophile pour permettre la substitution directe. De nombreuses conditions ont été testées dans le méthanol en présence de triéthylamine (TEA), en modifiant le nombre d'équivalents de base et le temps de réaction pour optimiser la formation du thioéther **II-U** au détriment des disulfures résultants de la réaction d'échange thiol disulfure (**II-V**) ou de la dimérisation du thiol en disulfure **II-W**. Les meilleurs résultats sont obtenus avec 10 équivalents de thiol libre **II-T** et un équivalent de disulfure **II-K** : le thioéther **II-U** est obtenu avec 68% de rendement. Les auteurs ont également synthétisé ce même composé par synthèse de Williamson dans le THF à température ambiante, avec un équivalent de thiol, trois équivalents de triéthylamine et trois équivalents de bromure d'allyle. Dans ces conditions, le produit **II-U** est isolé avec un rendement de 89%. Dans ce cas, la réaction d'extrusion par échange n'est pas plus performante que la synthèse de Williamson. L'extrusion est favorisée lorsque le disulfure est de type allylique et le thiol libre un thiophénol électriquement enrichi.

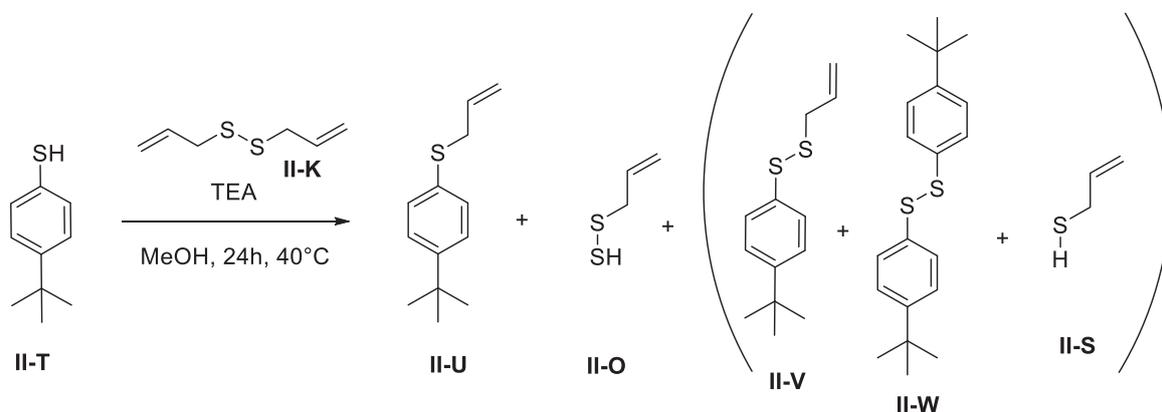


Figure 116 : Réactions d'échange d'un groupement allylique entre un disulfure et un thiophénol dans le méthanol

Les auteurs ont aussi validé la faisabilité de cette réaction en milieu aqueux. En effet, l'utilisation de 5 équivalents du thiol hydrosoluble **II-X** dans un tampon HEPES à 20 mM et pH = 7,5 à 40°C et du disulfure **II-K**, la formation du thioéther **II-Y** et du thiol allylique **II-S** est observée après 24 heures de réaction avec un rendement faible de 13% (figure 117).

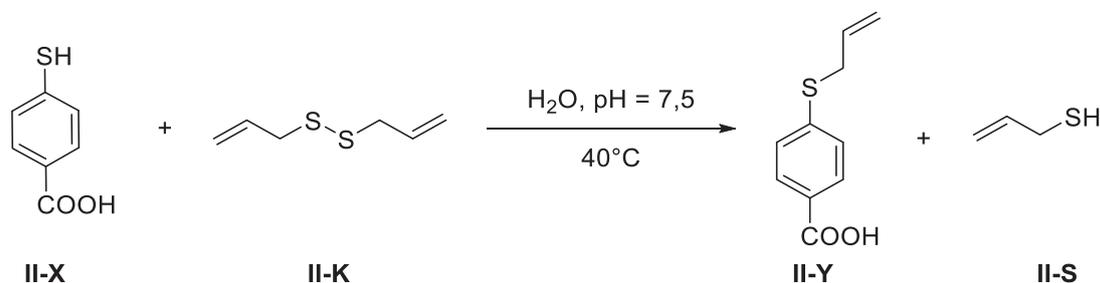


Figure 117 : Réactions d'échange de ponts disulfures avec des thiols dans le méthanol

Cette méthode d'échange de groupement allylique, bien qu'effective, n'est pas la plus optimale, car elle est en compétition avec les réactions d'échange de thiols. Elle permet néanmoins d'obtenir certains produits issus d'extrusion de soufre. Nous allons ainsi maintenant nous intéresser à la méthode la plus appliquée pour l'extrusion de soufre, ayant recours à des agents phosphorés.

### III) Synthèse de thioéthers à l'aide d'agent phosphoré

#### 1) Présentation des agents phosphorés

Trois familles de composés phosphorés catalysant l'extrusion de soufre sont grandement utilisées dans les travaux de Harpp et al. : les phosphines  $PR_3$ , les phosphites  $P(OR)_3$  et les aminophosphines  $P(NR_2)_3$  où R est un groupement alkyle, aromatique ou allylique.

Les phosphines : ces composés de formule  $PR_3$ , où R est un groupement alkyle ou phényl, sont généralement utilisés comme réducteur de ponts disulfures en thiols libres. D'autres études leur prêtent des propriétés en catalyse de métathèse de disulfures.<sup>106</sup> Crich et al. présentent de rares cas où les phosphines sont utilisables comme agent d'extrusion, grâce à leur caractère thiophile. La figure 118 présente cette réaction sur un pseudo-tripeptide dérivé du glutathion **II-Z** à l'aide de la triphénylphosphine pour sa conversion en thioéther **II-AB** à l'aide d'un disulfure dissymétrique **II-AA**.<sup>107</sup>

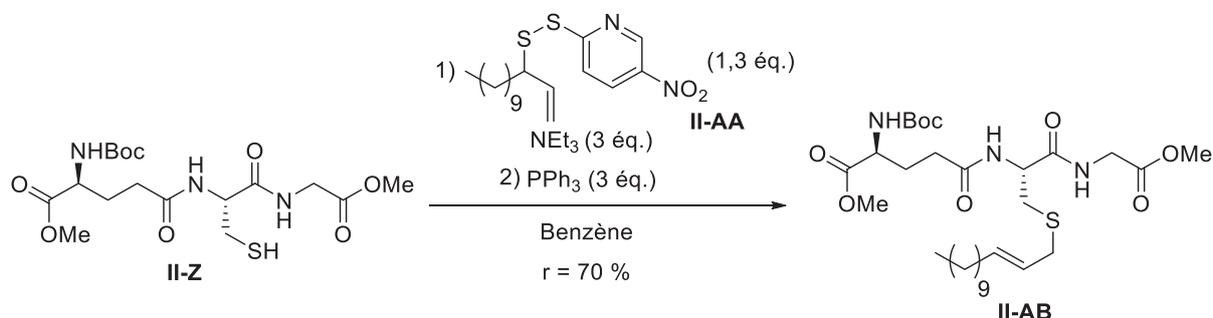


Figure 118 : Formation d'un thioéther par formation de disulfure suivi d'un réarrangement sigmatropique.

Les étapes synthétiques sont présentées à la figure 119. Une première étape d'échange est observée entre le thiol **II-Z** et le disulfure **II-AA** : il s'agit d'un échange de groupement thiol allylique

conduisant à la formation d'un nouveau disulfure mixte allylique-aliphatique **II-AC**. Ensuite, l'intermédiaire **II-AC** subit une transposition sigmatropique [2,3], et le substrat formé **II-AD** est converti en **II-AB** à l'aide de la triphénylphosphine, elle-même transformée en sulfure de triphénylphosphine  $\text{SPPH}_3$ . Les rendements isolés de ces réactions sont compris entre 66 et 80% selon le substrat.

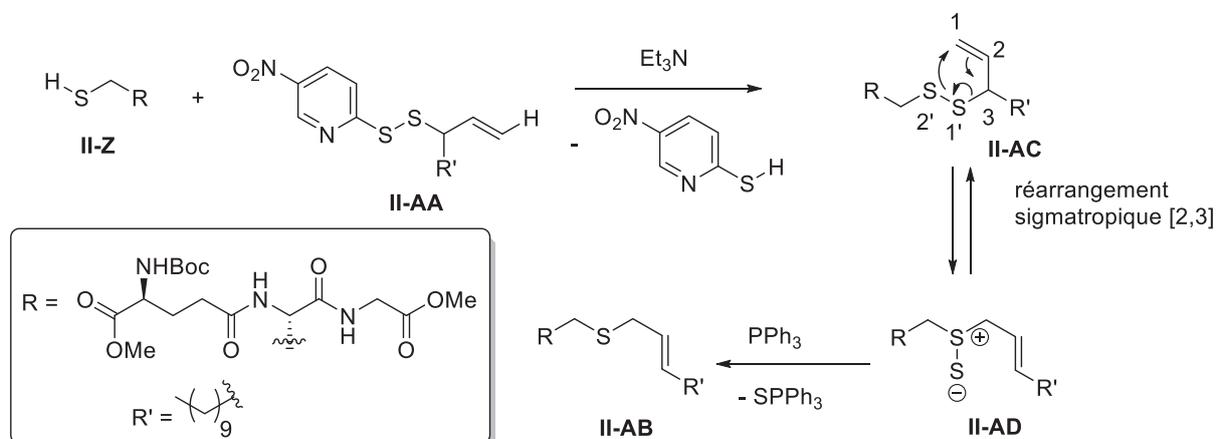


Figure 119 : Mécanisme associé au bilan réactionnel de la figure 118

Les phosphites : ces composés de formule générique  $\text{P(OR)}_3$  sont souvent employés comme agents d'extrusion de soufre activée par voie thermique ou photochimique. En figure 120, le substrat **II-AE**, dissout dans la triméthylphosphite solvant, est irradié à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure de 400 W pendant 25 heures à  $15^\circ\text{C}$  pour former le produit **II-AF**.<sup>104</sup> Aucune information mécanistique n'a été apportée par les auteurs. Ils supposent néanmoins un mécanisme radicalaire.

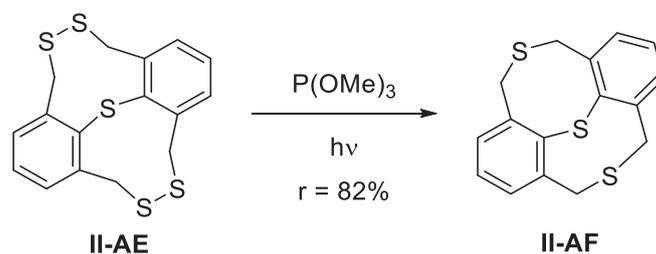


Figure 120 : Réaction d'extrusion de soufre à l'aide d'un phosphite

Les aminophosphines : ces composés de formules génériques  $\text{P(NR}_2)_3$  sont répertoriés comme étant d'excellents agents d'extrusion de soufre. La tris(diméthylamino)phosphine  $\text{P(NMe}_2)_3$  et la tris(diéthylamino)phosphine  $\text{P(NEt}_2)_3$  sont les réactifs les plus utilisés par voie thermique. L'exemple de la figure 121 montre la conversion quantitative du disulfure cyclique **II-AG** en thioéther cyclique **II-AH** à l'aide de la tris(diméthylamino)phosphine.

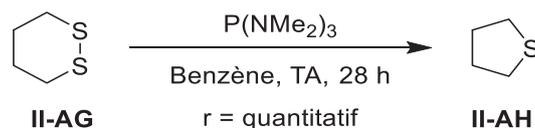


Figure 121 : Réaction d'extrusion de soufre à l'aide d'une aminophosphine

Les aminophosphines étant utilisées sur de nombreux disulfures, nous allons analyser en détail le mécanisme et les paramètres qui influencent cette réaction dans le but de la mettre en œuvre sur les cavitands poly(disulfures).

## 2) Analyse mécanistique de l'extrusion de soufre à l'aide d'aminophosphine

Une analyse mécanistique du phénomène d'extrusion de soufre par les aminophosphines a été présentée par Harpp et al. dans les années 70.<sup>108,109</sup> Ce mécanisme est présenté sur la figure 122. Lors d'une première étape réactionnelle, la tris(diméthylamino)phosphine, très bon nucléophile induit la formation d'un thiol **II-AJ** après substitution nucléophile du phosphore sur l'un des atomes de soufre de **II-AI**. On forme un intermédiaire réactionnel de type thiophosphonium **II-AK**. La deuxième étape de ce mécanisme consiste en une nouvelle substitution nucléophile : un doublet non liant du thiol **II-AJ** vient attaquer l'intermédiaire cationique **II-AK** au niveau de l'atome de carbone lié au soufre. La rupture de cette liaison carbone-soufre permet de former une liaison double phosphore-soufre remarquablement stable, ce qui déplace l'équilibre de la réaction vers la formation des produits **II-AL** et le sulfure de tris(diméthylimino)phosphine. On notera que l'énergie de dissociation d'une liaison P=S vaut 335 kJ.mol<sup>-1</sup> égale à l'énergie de la liaison P-O. Pour la liaison P=O, on a une énergie de dissociation bien plus élevée, égale à 544 kJ.mol<sup>-1</sup>.<sup>19</sup>

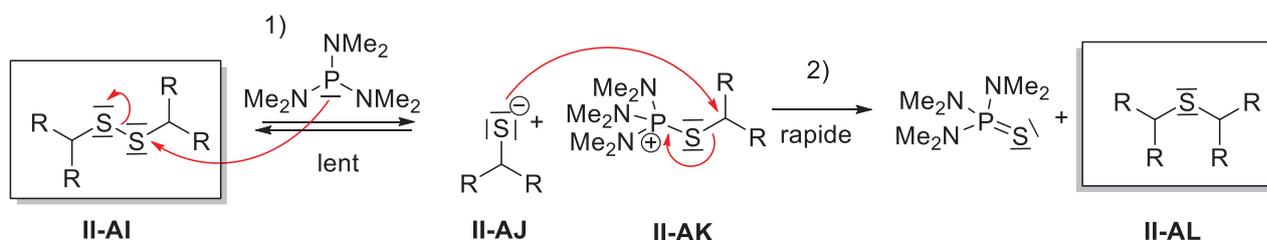


Figure 122 : mécanisme de l'extrusion de soufre à l'aide d'aminophosphine

Le mécanisme proposé en 1971 par Harpp implique l'intermédiaire réactionnel de type thiophosphonium. Cependant, la deuxième étape a priori rapide, cette espèce est difficilement isolable. En 2003, l'équipe de Oku a notamment fait appel à la chimie supramoléculaire pour pouvoir stabiliser de cet intermédiaire réactionnel afin de le caractériser.<sup>110</sup> En effet, ils ont utilisé un substrat réactionnel de type rotaxane **II-AM** présenté sur la figure 123.

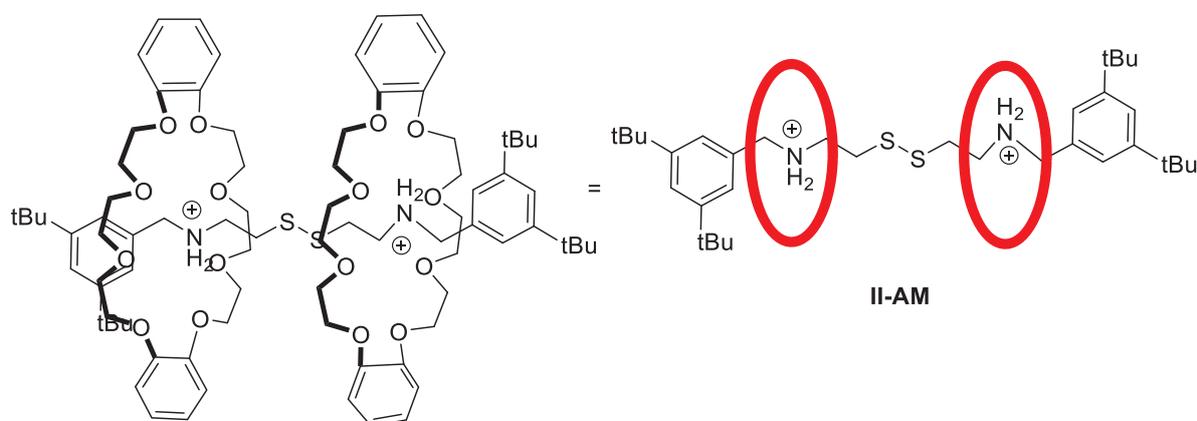


Figure 123 : rotaxane d'Oku et al. et sa représentation schématique. Les éthers couronnes sont schématisés par des cercles rouges.

L'axe principal du rotaxane est un disulfure aliphatique comportant deux ammoniums. Autour de ces deux unités ammoniums, on note la présence de deux macrocycles de types éther-couronne. Ce rotaxane est stabilisé grâce par les interactions de type dipôle-cation au sein de la structure ainsi qu'à la présence des groupements encombrants (« stoppers ») aux extrémités.

L'utilisation de ce rotaxane comme substrat d'extrusion induite par la tris(diméthylamino)phosphine permet de mettre en évidence l'intermédiaire réactionnel mis en jeu dans la réaction (figure 124). Comme cela a été détaillé précédemment, la première étape de la réaction consiste en une substitution nucléophile formant un thiolate d'ammonium complexé par un des éthers couronnes **II-AO** ainsi que le thiophosphonium complexé par le second éther couronne **II-AN**. En présence des éthers couronnes, le thiolate libre ne peut pas réagir sur l'intermédiaire réactionnel. La prototropie, thermodynamiquement défavorisée, permet de générer un intermédiaire neutre décomplexé **II-AP** pouvant réagir comme nucléophile. Ce thiol ne peut attaquer que sur l'atome de phosphore de **II-AN** par une nouvelle substitution nucléophile (une attaque sur le carbone n'est pas possible du fait de la présence de l'éther couronne). A l'issue de cette réaction, on obtient les éthers couronnes libres **II-AQ** ainsi qu'un des thiols issus de l'axe **II-AR** et le sel de phosphonium **II-AS**. Les auteurs indiquent que ce sel de phosphonium se décompose rapidement et qu'il n'est pas isolable.

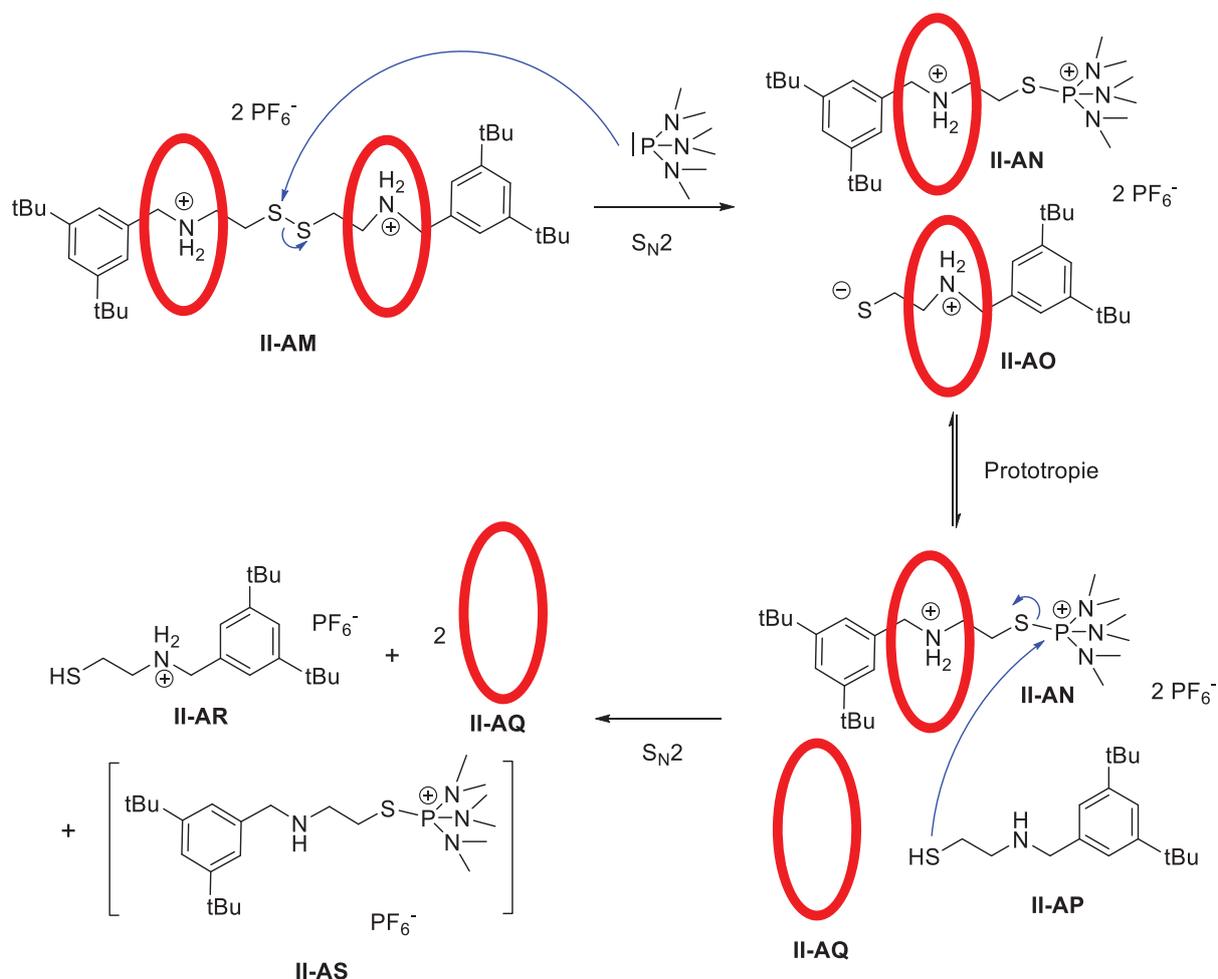


Figure 124 : mécanisme mettant en évidence l'isolation de l'intermédiaire réactionnel phosphoré

Il a été possible d'identifier l'intermédiaire réactionnel **II-AN** notamment à l'aide de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie RMN. Le rendement maximal pour l'isolation de cet

intermédiaire est de 65%, après 32 heures de réactions dans l'acétonitrile en présence de 1,1 équivalent d'aminosphosphine et un équivalent d'hexafluorophosphate d'ammonium. Une caractérisation supplémentaire par diffraction aux rayons X a permis de confirmer la structure de l'intermédiaire réactionnel. Cette structure est présentée à la figure 125. Des interactions de type  $\pi$  – cation entre les cycles aromatiques des unités éthers couronnes et l'atome de phosphore cationique peuvent être associées au repliement de la structure de l'éther couronne. Les aminosphosphines se distinguent des autres phosphines par leur forte nucléophilie ainsi que leurs capacités à stabiliser des cations : la triphénylphosphine et les phosphines n'ont pas permis d'isoler l'intermédiaire réactionnel. Dans ce cas, l'aminosphosphine est suffisamment volumineuse pour bloquer l'éther couronne dans l'axe du rotaxane.

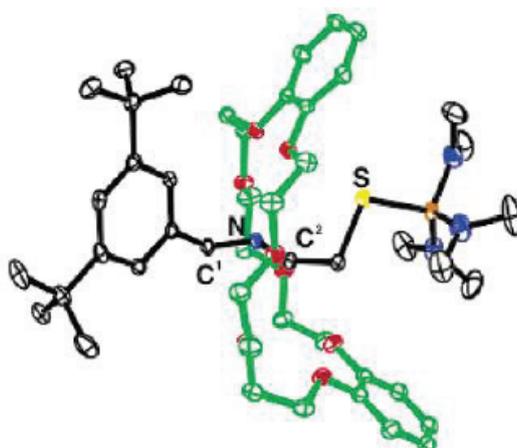


Figure 125 : Structure cristallographique de l'intermédiaire réactionnel thiophosphonium **II-AN**

### 3) Facteurs influençant l'extrusion de soufre

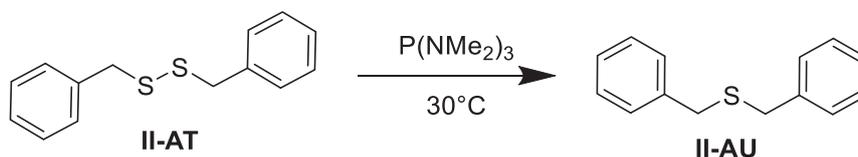
#### A) Influence des paramètres physico-chimiques

Dans le but de maîtriser ce phénomène d'extrusion de soufre sous contrôle cinétique, il est indispensable d'identifier les paramètres influençant la cinétique de la réaction.<sup>109</sup>

La réaction étudiée implique comme étape cinétiquement déterminante l'attaque de la tris(diméthylamino)phosphine sur le disulfure. La cinétique est d'ordre 2 avec une loi de vitesse dépendant de la concentration en disulfure et en aminosphosphine.

Le solvant a également un impact sur la cinétique de la réaction. En effet, la plupart des réactions utilisant la tris(diméthylamino)phosphine ont pour solvant le benzène. Le tableau de la figure 126 présente les paramètres cinétiques de la conversion du 1,2-dibenzyldisulfane **II-AT** en dibenzylsulfane **II-AU** dans quatre solvants de permittivité relative différentes. Les constantes de vitesse ainsi que les entropies et enthalpies d'activation de la réaction  $\gamma$  sont présentées. Premièrement, on remarque une augmentation de la constante de vitesse de la réaction avec la permittivité du solvant. En effet, du cyclohexane à l'O-dichlorobenzène, la permittivité du solvant est multipliée par cinq et les constantes de vitesse augmentent de trois ordres de grandeur. Ceci est cohérent avec la nature d'un état de transition polaire et chargé : une permittivité élevée va dans le sens d'une stabilisation des charges dans l'état de transition et donc vers une amélioration de la cinétique de la réaction. Deuxièmement, les enthalpies d'activation obtenues dans ces mêmes solvants sont positives et faibles entre 9 et 16 kJ.mol<sup>-1</sup>. On a donc une substitution par S<sub>N</sub>2 où la dissociation des liaisons pour passer à l'état de transition est plus rapide que l'association. Dernièrement, les

entropies d'activation obtenues dans ces mêmes solvants sont négatives et relativement élevées. Ceci est cohérent avec un mécanisme d'ordre 2 où on diminue le désordre par passage des réactifs à l'état de transition. Ainsi, ces exemples illustrent une cinétique de réaction améliorée dans le cas de solvant très polaire.



Solvant	$\epsilon$	$k$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Enthalpie d'activation ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Entropie d'activation ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
Cyclohexane	2,02	$1,5\cdot 10^{-6}$	15,6	-24
Benzène	2,28	$4,7\cdot 10^{-5}$	13,5	-24
Acétate d'éthyle	6,02	$1,2\cdot 10^{-4}$	10,2	-34
O-dichlorobenzène	9,93	$2,1\cdot 10^{-3}$	9,7	-28

Figure 126 : influence du solvant sur la réaction de conversion de **II-AT** en **II-AU**

## B) Influence de la structure du substrat

### a) Caractéristiques stéréochimiques

Harpp et al. ont aussi étudié la stéréosélectivité de la réaction d'extrusion. Les auteurs ont utilisé des disulfures cycliques diastéréoisomériquement purs **II-AV** et **II-AX** et observé une inversion de configuration de l'un des carbones lors de la réaction d'extrusion de soufre formant les diastéréoisomères **II-AW** et **II-AY** (figure 127). Ces résultats sont en accord avec un mécanisme de  $\text{S}_{\text{N}}2$  avec inversion de Walden stéréosélective et stéréospécifique.<sup>111</sup>

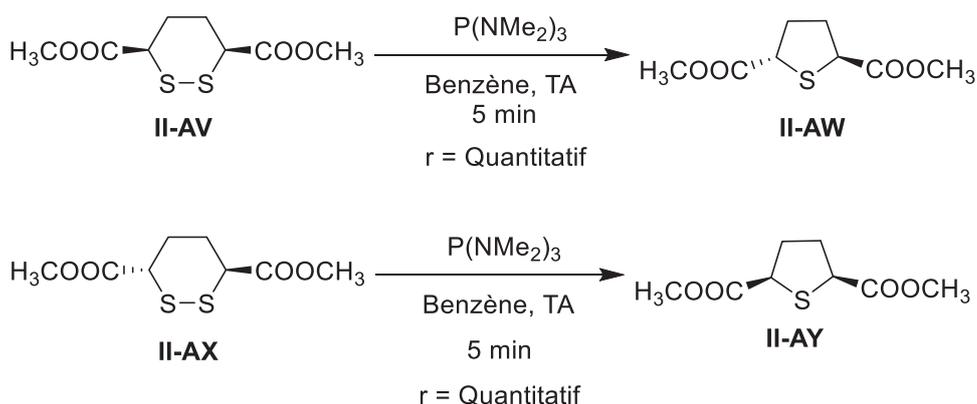


Figure 127 : Considérations stéréochimiques lors de la réaction d'extrusion de soufre en présence d'aminophosphine.

La chimiosélectivité de la réaction a aussi été étudiée, de manière à connaître les groupements compatibles avec la présence de l'aminophosphine (figure 128). Les conditions réactionnelles

d'extrusion de soufre semblent compatibles avec la présence d'ester et d'amide, utilisable comme groupements protecteurs, comme le montre la conversion de **II-BC** en **II-BD** et de **II-BE** en **II-BF**. Dans le cas d'acide carboxylique, une réaction d'addition élimination est observée entre l'acide et une des amines portées par l'agent phosphoré. Ainsi, le substrat **II-AZ** est converti en amide **II-BB** présentant toujours les ponts disulfures au lieu du thioéther **II-BA** attendu.<sup>111</sup>

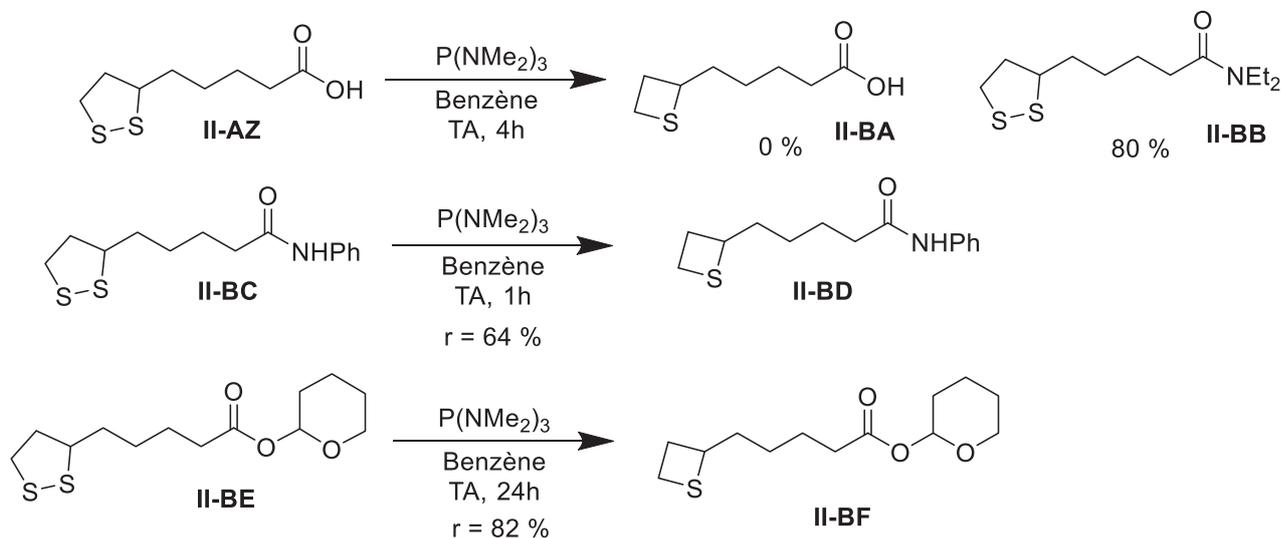


Figure 128 : considérations chimiosélectives

*b) Influences structurales dans le cas des disulfures aromatiques*

Enfin, l'influence de la structure du disulfure sur l'efficacité de la réaction d'extrusion avec l'aminophosphine a été étudiée, notamment en comparant disulfures phényles et benzyliques (figure 129).<sup>112</sup>

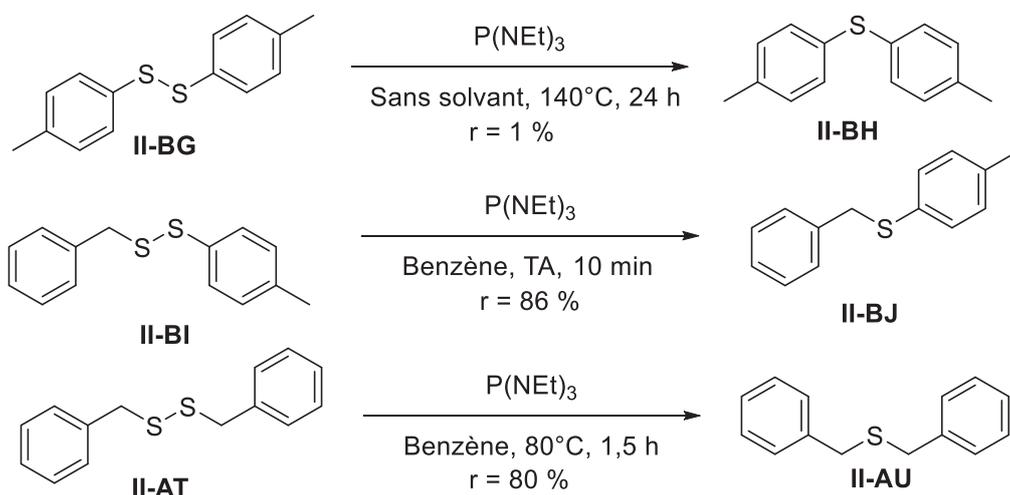


Figure 129 : Réaction d'extrusion de soufre sur différents substrats aromatiques

Ce paramètre semble être capital : en effet, en utilisant un disulfure phényle **II-BG**, le rendement de la réaction de formation du thioéther **II-BH** est de 1%. Les réactions entre disulfures benzyliques **II-AT** ou entre disulfures benzylique-phényle **II-BI** permettent la formation des thiéthers **II-AU** et **II-BJ** avec des rendements supérieurs à 80%. Ceci est de nouveau en accord avec le mécanisme postulé qui implique l'attaque d'un thiolate sur le carbone substitué par le

thiophosphonium. Les auteurs reportent que la réaction sur des disulfures dissymétriques benzyliques-phényliques se fait à température ambiante, contrairement aux disulfures symétriques benzyliques-benzyliques qui nécessitent une activation thermique. Dans le cas du disulfure dissymétrique, seul le produit extrudé dissymétrique est observé montrant qu'il n'y a pas de métathèse de ponts disulfures dans le processus.

#### 4) Applications

##### A) Extrusion de soufre sur des glycoprotéines

La présence d'unités glycosidiques sur des protéines se manifeste dans 50% des cellules eucaryotes et est liée à la régulation cellulaire, la différenciation cellulaire et aux réponses immunitaires. Les glycopeptides possédant des liens thioéthers présentent de meilleures stabilités chimique et enzymatique par rapport aux glycopeptides naturellement liés par des asparagines ou des sérines par lien disulfure. Bernades *et al.* ont ainsi utilisé le processus d'extrusion de soufre pour créer des liens thioéthers robustes entre un sucre et une protéine. Cette stratégie représente la première méthode chimique capable d'effectuer la synthèse de thioéther entre ces partenaires.<sup>113</sup> Ainsi, après avoir validé la compatibilité entre conditions réactionnelles et glycopeptides et acides aminés avec des rendements variables compris entre 8% et 75%, la stratégie d'extrusion de soufre a été mise en place sur une protéine mutante *Bacillus lentus* SBL-S156C. Cette protéine possède une unique cystéine en position 156, sur laquelle est d'abord effectuée un couplage oxydant glycosylant de la fonction thiol disulfure dissymétrique puis l'extrusion de soufre à l'aide de la tris(diméthylamino)phosphine (figure 130). En effet, son utilisation a permis de synthétiser la glycoprotéine d'intérêt qui a été caractérisée en spectroscopie de masse. Il est à noter ici qu'il s'agit d'un des rares exemples de la littérature validant le phénomène d'extrusion de soufre dans l'eau et prouvant donc la compatibilité des aminophosphines avec le milieu aqueux et avec les groupements protecteurs classiques de la chimie des sucres et des peptides.

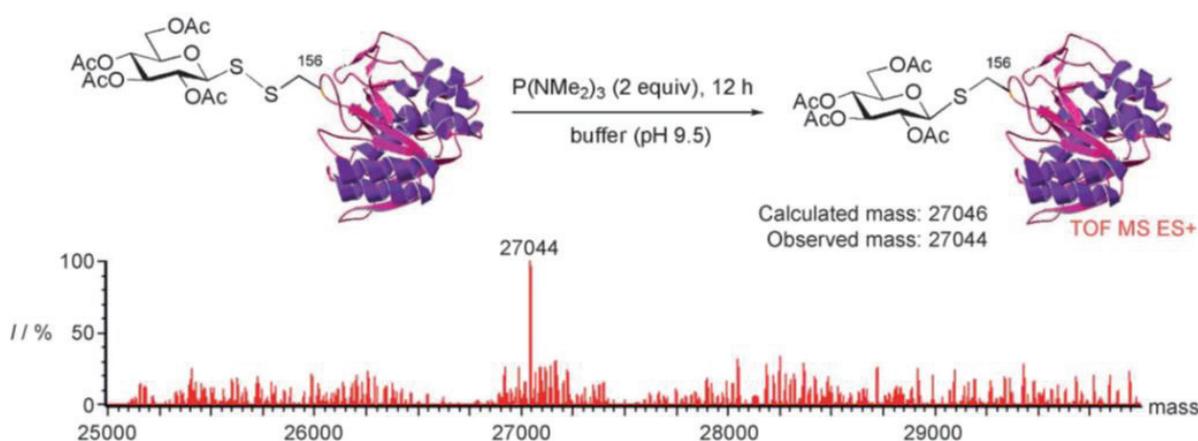


Figure 130 : Formation d'une glycoprotéine au lien thioéther à l'aide de l'extrusion de soufre. Spectre de masse révélant le produit issu de la réaction d'extrusion de soufre.<sup>113</sup>

##### B) Synthèses de récepteurs supramoléculaires par extrusion de soufre

Peu de récepteurs supramoléculaires présentant des liens thioéthers sont décrits dans la littérature. Des mélanges de thiacalixarènes, comme celui présenté en figure 131a, peuvent être obtenus par réaction successive entre le p-tert-butylphénol et le dichlorure de soufre SCl<sub>2</sub> dans le

dichlorométhane.<sup>114,115</sup> Après purification par chromatographie, le thiacalix[4]arène **II-BK** est isolé avec un rendement de 4%.

Dehaene et al. ont synthétisé plus récemment de nombreux dérivés de calixarènes présentant des liens thioéthers ainsi que des cyclophanes comme **II-BL**, **II-BM** ou encore **II-BN** (figure 131b) : des travaux de post-fonctionnalisation, permettant le greffage de groupement améliorant la solubilité est effectuée avec d'excellents rendements.<sup>116,117,118</sup> La post-fonctionnalisation de polydisulfures obtenus par la chimie combinatoire dynamique peut donc être une alternative d'augmentation des rendements de synthèse de ces cavitands.

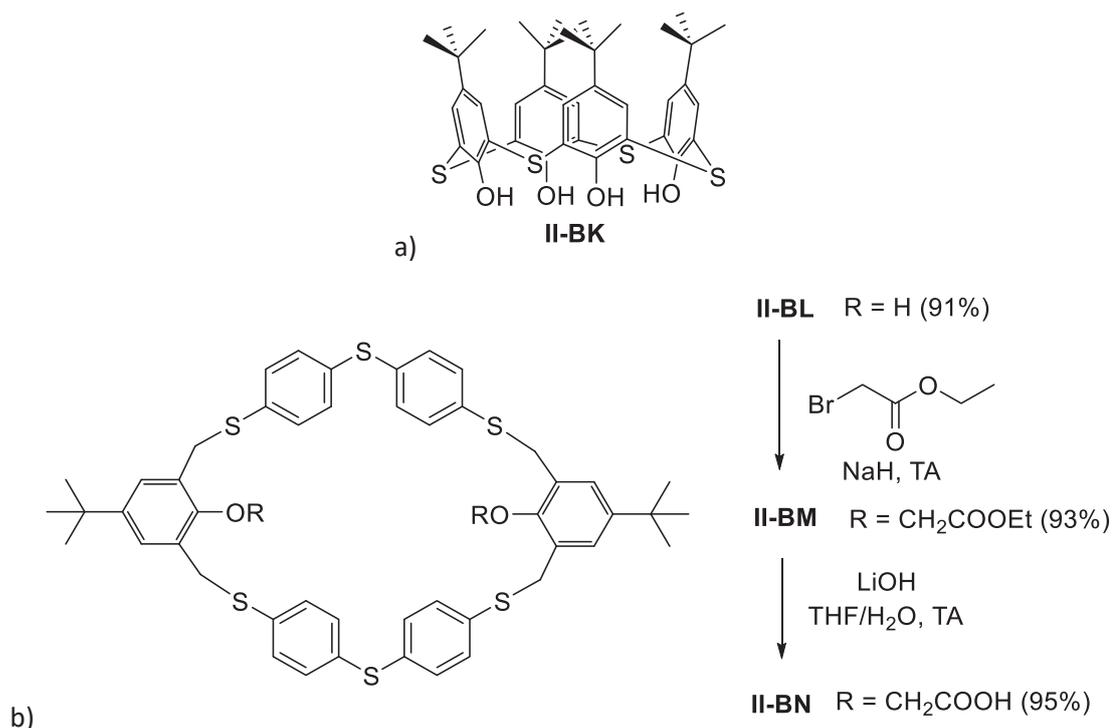


Figure 131 : a) Structure d'un calixarènes présentant des liens thioéthers. B) Cyclophane au lien thioéther décrit par Dehaene, réactions de post-fonctionnalisation.

Johnson et coll. ont développé récemment une nouvelle famille de cyclophanes **II-BP<sub>n</sub>** synthétisés à partir de réaction d'extrusion de soufre à l'aide de la tris(diméthylamino)phosphine.<sup>89,92</sup> Premièrement, des chimiothèques de macrocycles polydisulfures benzyliques, analogues aux dynarènes, ont été créées à partir de briques benzyliques **II-BO** (figure 132). Ces chimiothèques sont générées en présence de chlorure d'antimoine dont le rôle est de diminuer la formation de polymères et d'améliorer la cinétique et la sélectivité de la formation de macrocycle par formation de disulfures. Le diiode joue quant à lui le rôle d'oxydant. A l'état d'équilibre, des macrocycles polydisulfures **II-BO<sub>n</sub>** de différentes tailles sont formées (de n = 2 à n = 6). Dans le cas de la brique non fonctionnalisée (R = H), le trimère est obtenu comme produit majoritaire à 45% dans la bibliothèque. Dans le cas de la brique fonctionnalisée par des groupements, le dimère et le trimère sont les produits majoritaires, obtenus à 37 et 35 % respectivement. Les trimères ont été isolés puis soumis à l'action de la tris(diméthylamino)phosphine : la conversion des disulfures en thioéther est obtenue avec d'excellents rendements (82 % dans le cas R = H et 72 % dans le cas R = OMe) et les macrocycles résultants ont été caractérisés, notamment par cristallographie.

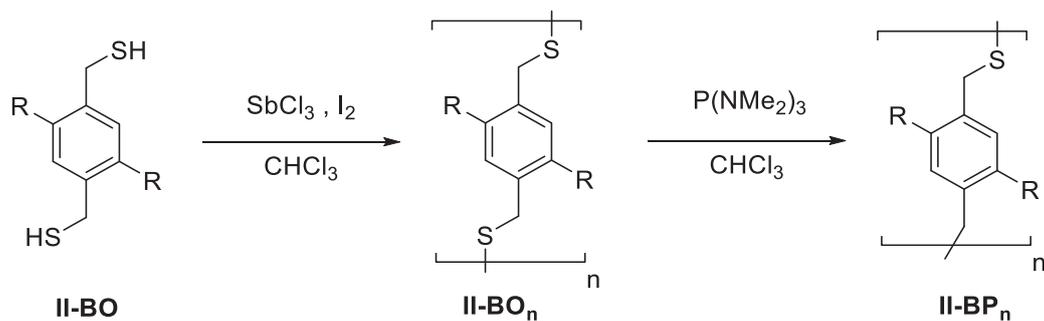


Figure 132 : Synthèse de macrocycle par extrusion de soufre

Les auteurs ont aussi travaillé avec des briques tri-thiols, de manière à concevoir des édifices en forme de cages (figure 133). L'action de l'aminophosphine permet d'obtenir une cage **II-BR** présentant des liens thioéthers : la réaction d'extrusion permet ainsi de réduire le volume de la cavité de la cage **II-BQ**.

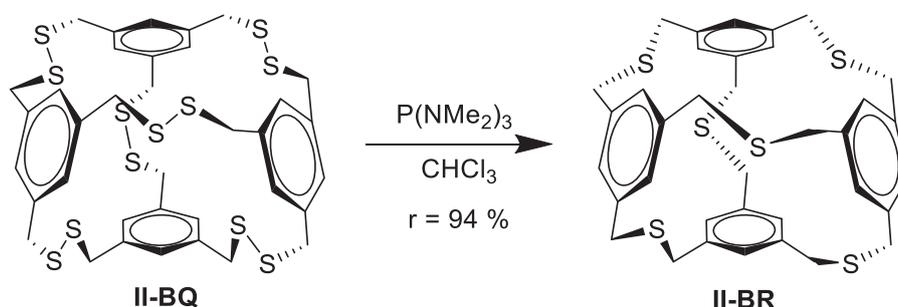


Figure 133 : synthèse de molécules cages par extrusion de soufre.

Ces exemples montrent à nouveau tout l'intérêt d'une chimie utilisant l'approche combinatoire dynamique pour synthétiser des liens thioéthers, au lieu d'une synthèse classique par substitution nucléophile. Les nombreux avantages synthétiques (rendement, purification) sont à nouveau soulignés dans cette étude. Les auteurs indiquent que ces macrocycles peuvent présenter des applications comme précurseur dans la synthèse industrielle de polymère tel que le parylène ou comme hôte supramoléculaire.<sup>89,92</sup>

## IV) Synthèse de squelette carboné par extrusion de soufre

Si l'extrusion partielle de soufre permet de convertir des architectures polydisulfures labiles en polythioethers robustes, l'extrusion complète mène à des structures dont le squelette principal est purement carboné. Nous allons décrire brièvement quelques exemples permettant la formation d'alcane ou d'alcène par cette voie synthétique.

### 1) Formation d'alcènes par extrusion de soufre

Une première voie fait appel à un mode d'activation thermique. Une fois une cage présentant des liens thioéthers synthétisée, il est possible de former des alcènes par extrusion totale de soufre grâce à une série de quatre étapes réactionnelles (figure 134).<sup>119</sup>

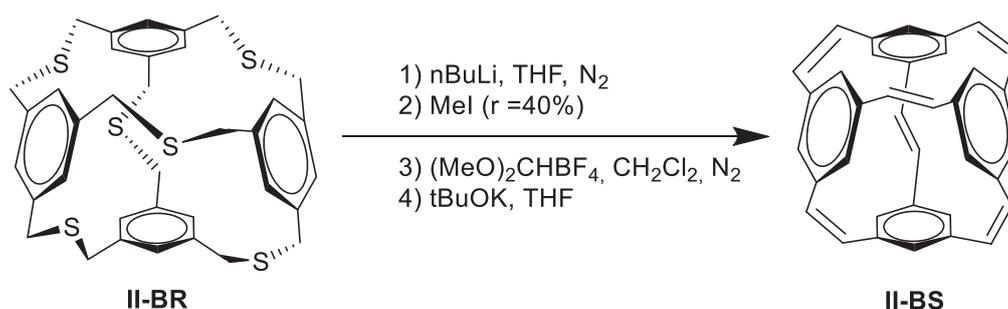


Figure 134 : Exemple d'extrusion totale de soufre sur un édifice macrocyclique

Les intermédiaires à l'issue de chaque étape sont présentés de manière simplifiée dans la séquence à la figure 135. L'utilisation du butyllithium (1) permet de déprotoner le carbone en alpha de l'atome de soufre. Après alkylation du soufre par MeI (2), un réarrangement intervient de manière à former un thioéther méthylénique. Ensuite, une seconde alkylation du soufre est effectuée (3), permettant l'obtention un bon groupe partant. L'utilisation d'une base (4) permet une réaction d'élimination pour former d'un alcène avec départ de diméthylesulfure. La nouvelle cage ainsi obtenue, présentant des liens alcènes, subit aussi une réduction de taille de cycle.

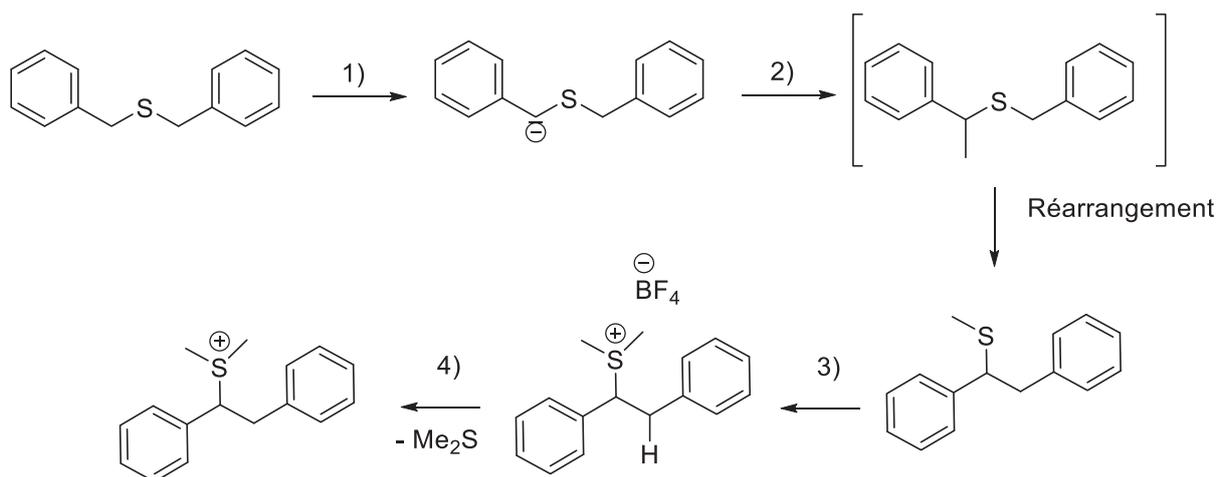


Figure 135 : détail de la séquence réactionnelle de l'extrusion de **II-BS**. Les conditions réactionnelles numérotées font appels aux réactifs décrit en figure 134.

## 2) Création d'alcènes par extrusion de soufre

Une seconde voie synthétique repose sur une activation photochimique et permet de créer des liaisons simples entre unités phényles. Il est ainsi possible de convertir avec des très bons rendements une molécule présentant des liens thioéthers de **II-E** en liaison carbone-carbone à l'aide de phosphite pour former **II-F**. Cependant, la nature du substrat a un impact déterminant sur la conversion, comme le montrent les études de Fujihara et al. présentées en figure 136 : la conversion de **II-BU** et **II-BV** n'ont pas donné le produit souhaité.<sup>104</sup>

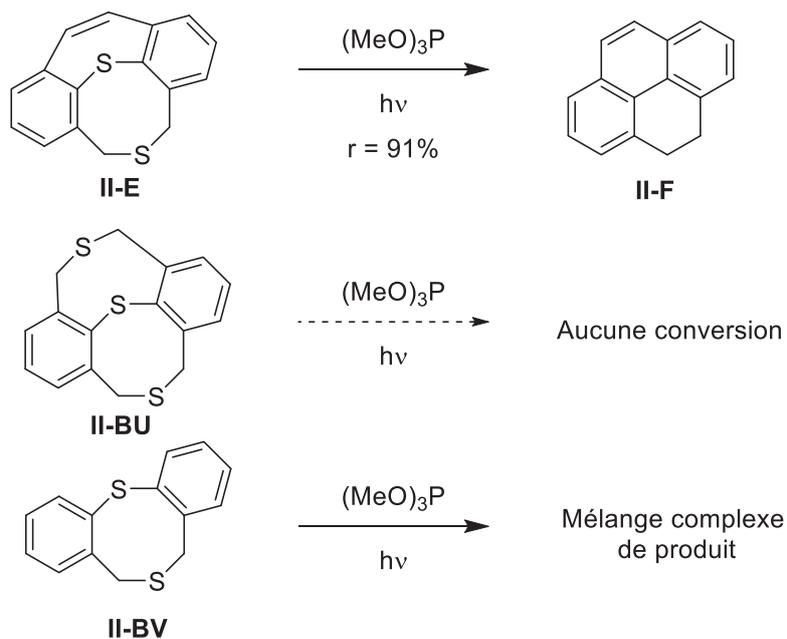


Figure 136 : Mise en évidence des différences de réactivités lors de l'extrusion de soufre par des phosphites sur des substrats thioéthers.

Dans cette étude bibliographique, nous avons donc présenté les réactions d'extrusion de soufre. Après introduction des diverses méthodes de synthèse, nous avons souligné la compatibilité de cette réaction avec le milieu aqueux. De plus, l'extrusion de soufre semble performante pour la synthèse de récepteurs supramoléculaires. Nous allons nous appuyer sur ces informations pour explorer la synthèse de nouveaux cyclophanes présentant des liens thioéthers ou liaisons carbone-carbone à partir d'architectures polydisulfures.

## Partie B : Etude de l'extrusion de soufre pour la synthèse de dérivés des dynarènes

### I) Cadre de l'étude et objectifs

Dans le chapitre précédent, un effet cytostatique transitoire été mis en évidence à la suite de l'introduction du dynarène **4<sub>4</sub>** au contact de cellules cancéreuses. Le caractère transitoire est imputé à la fragilité des ponts disulfures vis-à-vis des espèces réductrices ou nucléophiles présentes dans le milieu cellulaire. La post-fonctionnalisation des dynarènes en cyclophanes ayant des liens plus robustes entre unités aromatiques apporterait un plus à l'application envisagée. L'étude bibliographique précédente a détaillé quelques voies de formation de lien thioéther et de carbone-carbone à partir de précurseurs disulfures. Ainsi, nous avons envisagé d'explorer l'obtention des cyclophanes présentés à la figure 137.

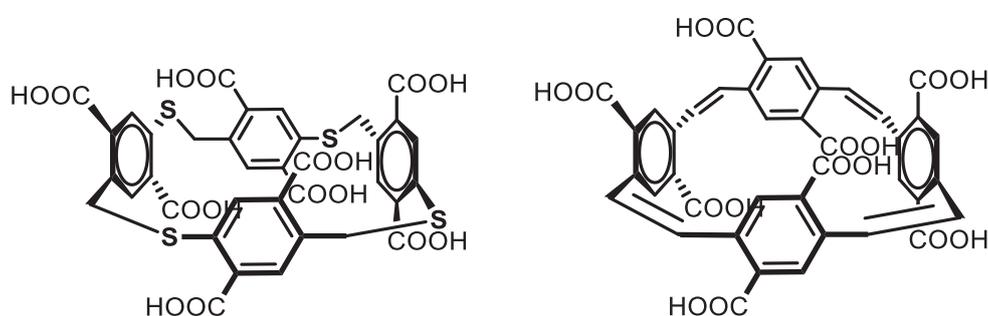


Figure 137 : Structure des cyclophanes dérivés des dynarènes.

Ces macrocycles présentent des liens différents de ceux présents dans les dynarènes. En effet, leurs configurations et conformations stables étant différentes, cela impactera la taille, la géométrie et les caractéristiques électroniques de la cavité. La présence de groupements acides carboxyliques permettra toujours d'envisager la reconnaissance moléculaire de polyamine. Malgré un gain en rigidité, le caractère constitutionnellement dynamique des dynarènes sera perdu dans ces structures. L'étude bibliographique a révélé la difficulté de mettre en œuvre le processus d'extrusion de soufre sur des disulfures purement phényliques. L'extrusion de soufre n'est donc pas directement envisageable sur le dynarène **4<sub>4</sub>**.

Pour accéder à ces nouveaux objets, deux stratégies ont été envisagées. Deux analyses rétrosynthétiques sommaires sont présentées en figure 138. L'analyse rétrosynthétique 1 présente la stratégie de synthèse d'un lien thioéther. Un thiophénol et un thiol benzylique sont d'abord oxydés en disulfure mixte par oxydation à l'air. Ensuite, une réaction d'extrusion de soufre conduit au lien thioéther. L'analyse rétrosynthétique 2 de la figure 138 présente la stratégie de synthèse de liaisons oléfiniques. Dans ce cas, une réaction d'oxydation de thiols en disulfure symétriques est envisagée sur des substrats benzyliques uniquement. Une réaction d'extrusion de soufre totale sera effectuée en deux temps : dans un premier temps pour former des liens thioéthers, puis dans un deuxième temps pour conduire à l'alcène.

Nous avons choisi de tester ces stratégies sur des monomères modèles, dans le but d'identifier les conditions optimales d'oxydation et d'extrusion qui seraient ensuite applicables aux structures cyclo-oligomériques. Ces monomères modèles sont un monothiophénol et un monothiol benzylique.

La dernière contrainte posée a été de travailler au plus proche des conditions physiologiques dans le but d'envisager une utilisation pour la reconnaissance moléculaire en solution aqueuse comme cela a été le cas pour les dynarènes.

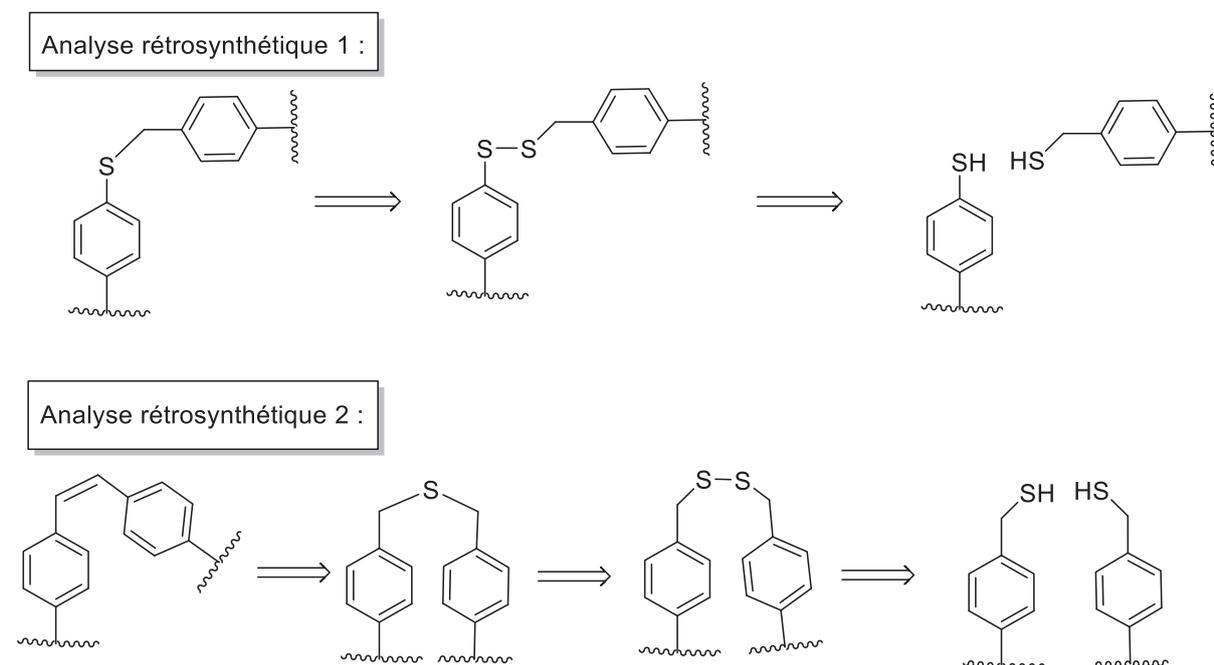


Figure 138 : Stratégie de synthèse des liaisons envisagées dans les nouveaux cyclophanes

## II) Post-modification de disulfures issus de briques monothiolées

### 1) Synthèse des briques élémentaires

#### A) Briques élémentaires de première génération

Une brique benzylique et une brique phénylique ont été envisagées (figure 139). La brique thiophénol **19**, réactif commercial, correspond à l'équivalent monovalent de la brique **4**. La brique **20** est quant à elle l'équivalent benzylique de la brique **19**. Ces deux briques présentent une unique fonction acide carboxylique en position ortho.



Figure 139 : présentation des briques monothiolées de première génération

La synthèse de la brique benzylique **20** est présentée en figure 140.<sup>120,121</sup> En partant du méthyl 2-méthylbenzoate **21**, une réaction de bromation radicalaire permet l'obtention de **22** avec un rendement de 47%. Cette réaction utilise l'AIBN comme initiateur de radicaux et le N-bromosuccinimide comme source de brome. Le produit désiré subit très rapidement une deuxième réaction de bromation en position benzylique alors que la conversion du réactif de départ n'est pas totale. Un suivi minutieux en RMN <sup>1</sup>H a donc été effectuée pour optimiser le rendement de la réaction, initialement limité à 16%. Ensuite, une étape de substitution nucléophile de l'atome de brome par la thiourée, permet l'obtention du dérivé **23** avec un excellent rendement de 97%. Pour finir, une

réaction d'hydrolyse basique permet de déprotéger l'ester méthylique en acide carboxylique et libérer le groupement thiol par formation d'une urée. Le composé **20** est synthétisé avec un rendement de 36%. Ainsi, la conversion de l'ester **21** en thiol **20** est réalisée avec un rendement de global de 16% pour 3 étapes de synthèse.

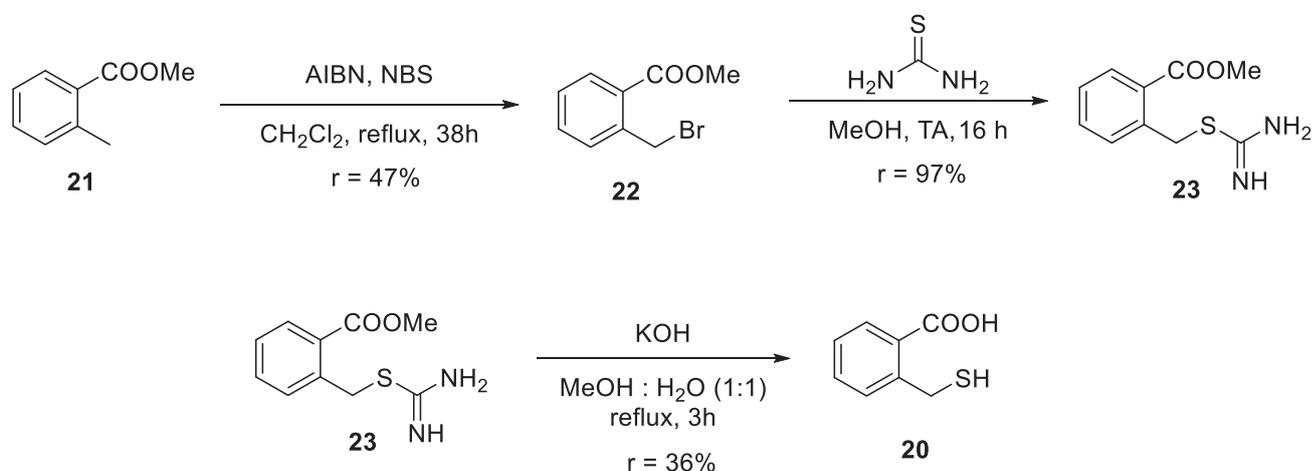


Figure 140 : Synthèse de la brique **20**

Avant d'entreprendre des travaux de synthèse de disulfure et d'extrusion de soufre, nous avons effectué des tests de solubilité de la brique **19** et **20** dans l'eau. Malheureusement, ces composés ne sont pas solubles dans l'eau, mais uniquement dans des mélanges de solvants organiques et aqueux.

### B) Briques élémentaires de deuxième génération

De nouvelles briques modèles possédant une fonction acide carboxylique supplémentaire ont été envisagées. Les briques moléculaires phényliques **24** et benzyliques **25** (figure 141), où les acides carboxyliques sont volontairement en position para l'un de l'autre, comme sur le monomère **4** ont été entreprise en s'inspirant des quatre étapes réactionnelles utilisées pour les molécules **4** et **20**.<sup>122, 83</sup>

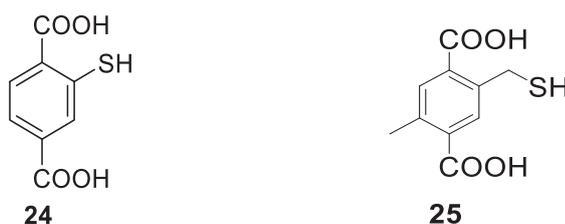


Figure 141 : présentation des briques monothiolées de seconde génération

La synthèse de la brique **24** est présentée à la figure 142. Elle est constituée de 4 étapes réactionnelles.

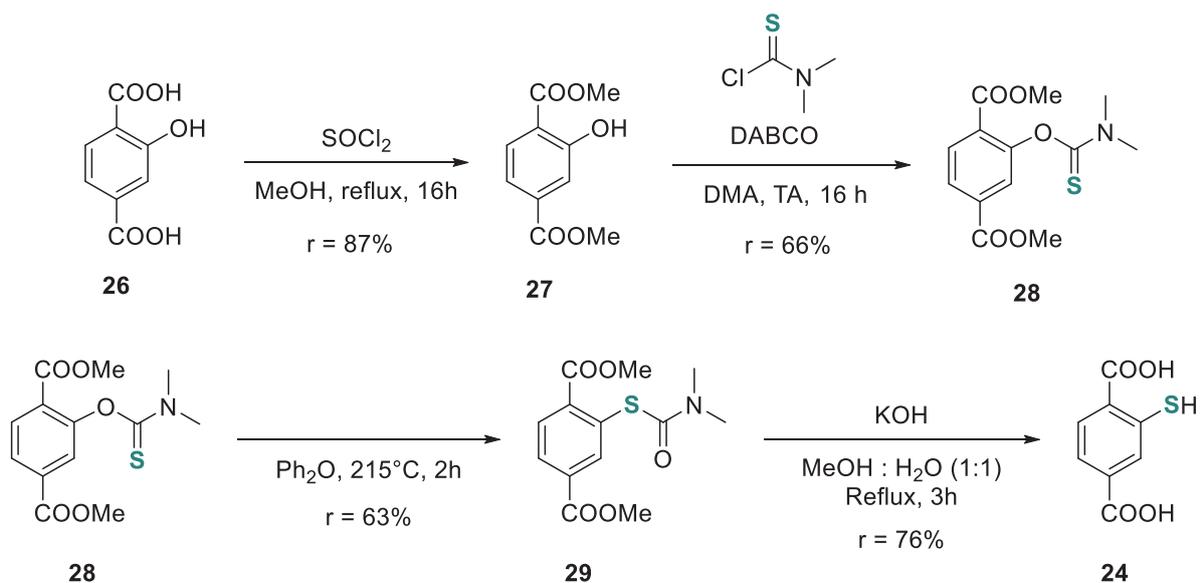


Figure 142 : Synthèse du thiophénol **24**

La première étape consiste à effectuer une estérification des acides carboxyliques de l'acide 2-hydroxyterephthalique **26** à l'aide d'une activation par le chlorure de thionyle suivi d'une séquence d'addition-élimination à l'aide du méthanol. Cette étape permet d'obtenir le thiol **27** avec un excellent rendement de 87%. La molécule **27** est convertie en O-thiocarbamate **28** avec un rendement de 66%. Une réaction de Newman-Kwart (optimisée comme le montre le tableau 19) est effectuée pour convertir le O-thiocarbamate **28** en S-thiocarbamate **29**. La première entrée du tableau décrit une synthèse activée par les micro-ondes, qui ne s'est pas avérée être performante puisqu'aucune conversion n'a été observée : on obtient uniquement du réactif de départ après réaction. Nous avons effectué ce réarrangement de façon thermique sans solvant (entrée 2, 3 et 4 du tableau 19). L'entrée 2 décrit la réaction à une température de 230°C. Dans ces conditions, la molécule **30** identifiée en spectrométrie de masse et en RMN du proton, est obtenue sous forme d'un solide noir. Cela montre qu'une température de chauffage trop élevée entraîne la dégradation du produit souhaité (figure 143). Enfin, les entrées 3 et 4 comparent la réaction sans solvant à même température, avec 2 heures ou 3 heures de réactions. Dans les deux cas, il y a conversion du O-thiocarbamate en S-thiocarbamate, avec un meilleur rendement pour un temps plus court. Ainsi, cette étude de l'impact de la température et du temps de réaction sur le rendement a permis d'atteindre une valeur de 63 % dans les conditions optimales. Enfin, la dernière étape est une hydrolyse basique qui convertit **29** en acide 2-mercaptotéréphthalique **24** avec un rendement de 76%. Le rendement global de cette synthèse est de 27% pour 4 étapes.

Entrée	Quantité de réactif	Température	Temps de réaction	Conditions réactionnelles	Produit et rendement
<b>1</b>	392 mg	215°C	15 minutes	NMP, réaction micro-ondes	Aucune conversion
<b>2</b>	150 mg	230°C	3 heures	Sans solvant	Formation de <b>30</b>
<b>3</b>	290 mg	215°C	2 heures	Sans solvant	63%
<b>4</b>	290 mg	215°C	3 heures	Sans solvant	47 %

Tableau 19 : Optimisation des conditions opératoires pour le réarrangement de Newman-Kwart de la molécule **27**.

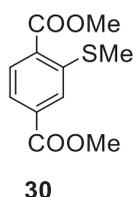


Figure 143 : Structure du produit secondaire identifiée (condition : entrée 2 du tableau 14).

La synthèse en quatre étapes de la brique benzylique **25** est présentée à la figure 144. La première étape consiste à protéger les fonctions acides carboxyliques de l'acide 2,5-diméthyltéréphthalique **31** en esters méthyliques. La synthèse de la molécule **32** est effectuée avec un excellent rendement de 99%. Une étape de bromation radicalaire par l'AIBN et le NBS conduit à la formation de **33** avec un rendement de 92%. Pour cette étape, un suivi par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H pour quantifier les espèces polybromées ou non bromées indésirables a été entreprise. Il a ainsi été possible de déterminer la durée de la réaction optimisant la conversion en espèce **33**. Le produit bromé **33** est ensuite lui-même substitué par la thiourée en **35** avec un rendement de 68%. L'hydrolyse basique de **35** permet la formation de la brique benzylique **25** avec un rendement de 67%. Le rendement global de cette synthèse est de 42% pour 4 étapes de synthèse.

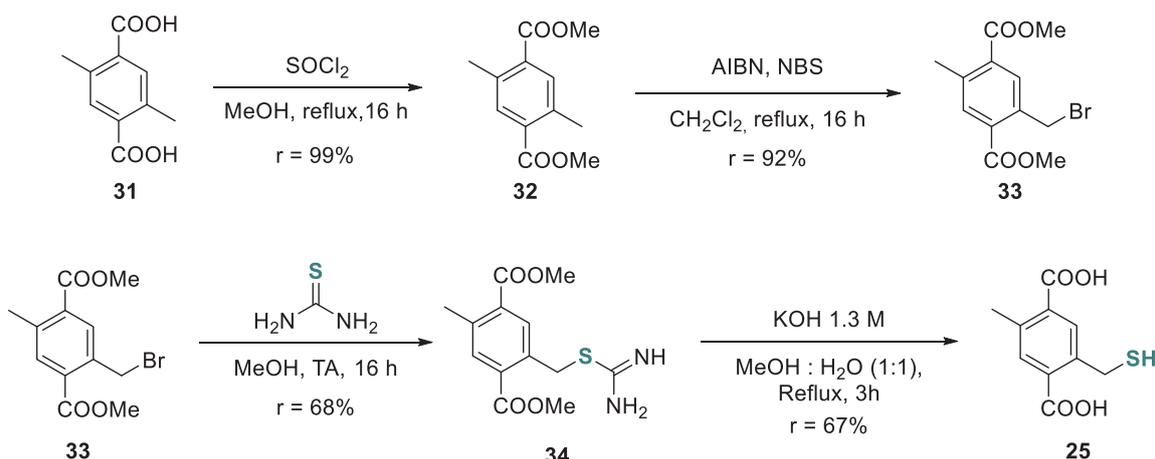


Figure 144 : Synthèse de la brique benzylique **25**

Une fois le monomère obtenu, nous avons formé le disulfure benzylique **35** par oxydation de la fonction thiol de **25** (figure 145). L'oxydation en présence de dioxygène atmosphérique a été effectuée dans l'eau à pH = 9,8, conditions dans lesquelles la brique **25** est soluble. Le dimère a été isolé après 5 jours de réaction avec un rendement de 56%. Ce rendement a été amélioré en utilisant le diiode comme oxydant dans le dichlorométhane, ce qui a permis d'isoler le dimère benzylique **35** en 5 minutes, avec un rendement de 70%.

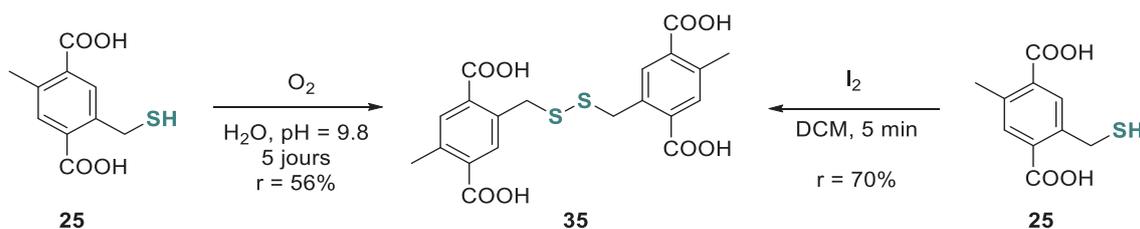


Figure 145 : Synthèse du dimère **35**.

Les briques **25** et **35** sont solubles au-delà de pH = 9,8 dans l'eau, qui sera la nouvelle valeur fixée pour le pH dans les prochaines études.

## 2) Extrusion de soufre par substitution directe

Les réactions d'oxydation en disulfure et extrusion de soufre ont été envisagées entre le disulfure benzylique **35** et le thiophénol **25** dans le but de former le dimère thioéther correspondant, en s'inspirant des travaux de Gates et coll. évoqué en partie A de ce chapitre. L'analyse des chimiothèques sera effectuée par HPLC.

### A) Identification des références

Dans un premier temps, la dimérisation de la brique **24** en disulfure **36** a été suivie (à 1 mM de **24** dans l'eau à température ambiante). L'analyse après 6 jours d'agitation indique que seulement 10% de dimère s'est formé. Nous avons reproduit sur cette expérience dans les conditions décrites par Gates et coll. Ainsi, après 48 heures d'agitation dans le méthanol avec un équivalent de triéthylamine, le dimère **36** est obtenu à 85% dans la chimiothèque, devant les 15% de monomère **24** n'ayant pas réagi (figure 146).

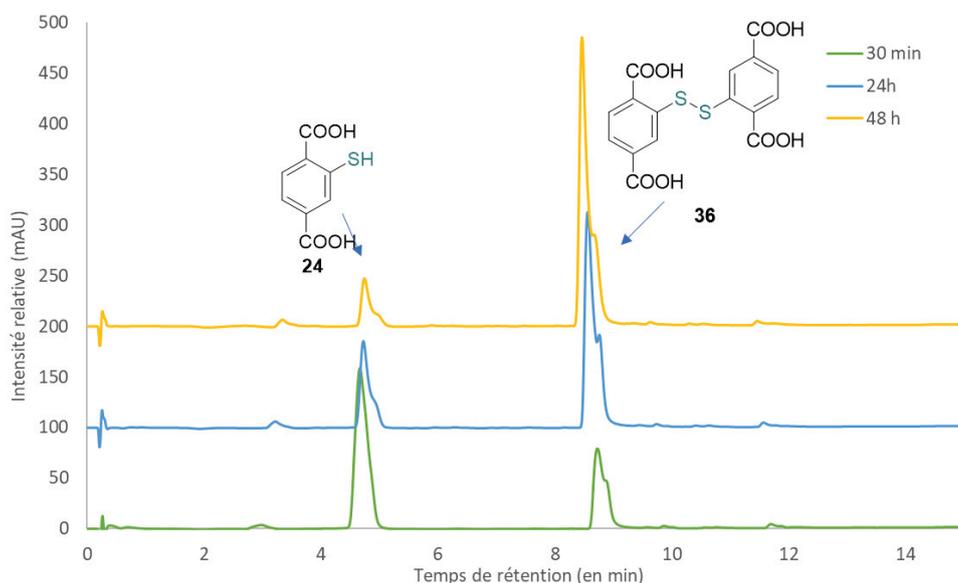


Figure 146 : Suivi par HPLC de la conversion de la brique **24** (1mM dans le méthanol avec un équivalent de triéthylamine) dimère **36**.

Dans un second temps, nous avons réalisé le suivi de la formation du disulfure dissymétrique à partir du thiophénol **24** et du thiol benzylique **25** dans le méthanol à 40°C avec un équivalent de triéthylamine (figure 147). Le spectre obtenu à t=0 montre que les deux espèces ont des coefficients de réponses très différents. Nous avons pris en compte ce paramètre dans les quantifications. Après 48 heures, l'oxydation des fonctions thiols est quasiment complète : le disulfure symétrique benzylique **35** n'est quasiment pas observable dans la bibliothèque, le disulfure symétrique phénylique **36** est présent à 16% et le disulfure dissymétrique **37** est obtenu comme produit majoritaire à 84% dans la bibliothèque finale. La formation préférentielle du disulfure dissymétrique semble indiquer une stabilité accrue de l'hétérodimère par rapport au couple d'homodimère (sous réserve que le mélange quantifié soit sous contrôle thermodynamique).

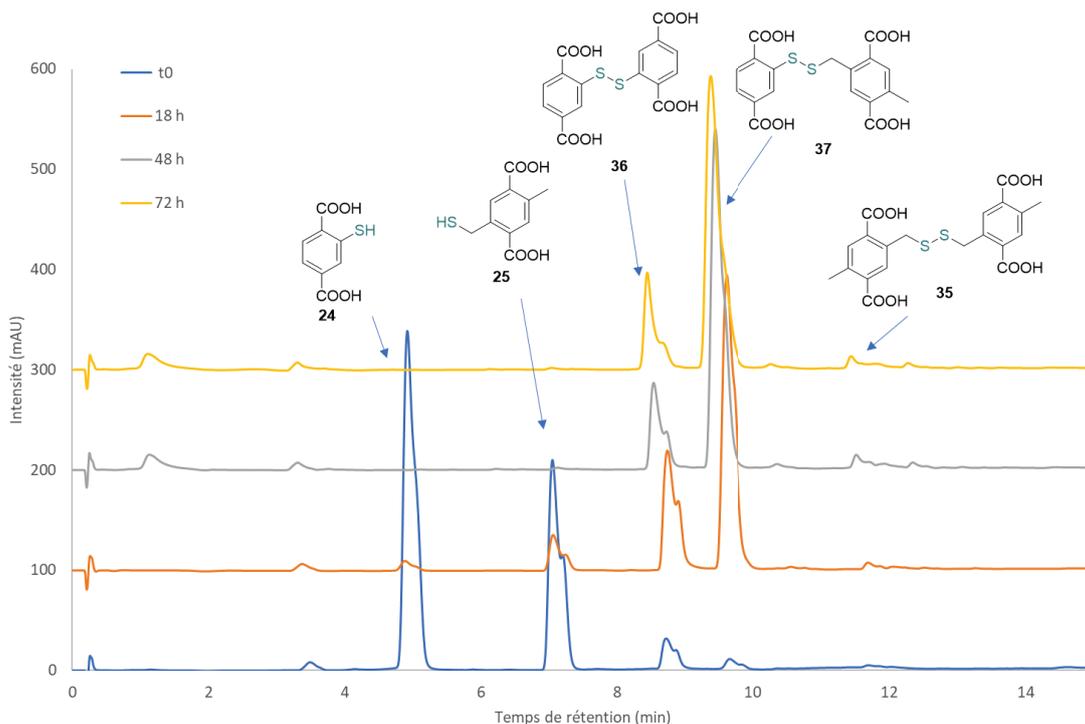


Figure 147 : Chromatogrammes HPLC du suivi cinétique de la chimiothèque formée à partir de **24** et **25**

Enfin, nous avons tenté d'observer la formation du thioéther correspondant au disulfure **33**. Pour cela, une synthèse directe par réaction de substitution nucléophile du thiophénol **24** sur le bromure benzylique **34** (présentée à la figure 148) a été réalisée. Le produit **38** désiré a été identifié en spectrométrie de masse, mais le mélange impur en contient une quantité trop faible, aucune tentative de purification supplémentaire n'a été initiée. La déprotection des groupements méthoxy de **38** conduisant à **39** n'a donc pas été envisagée.

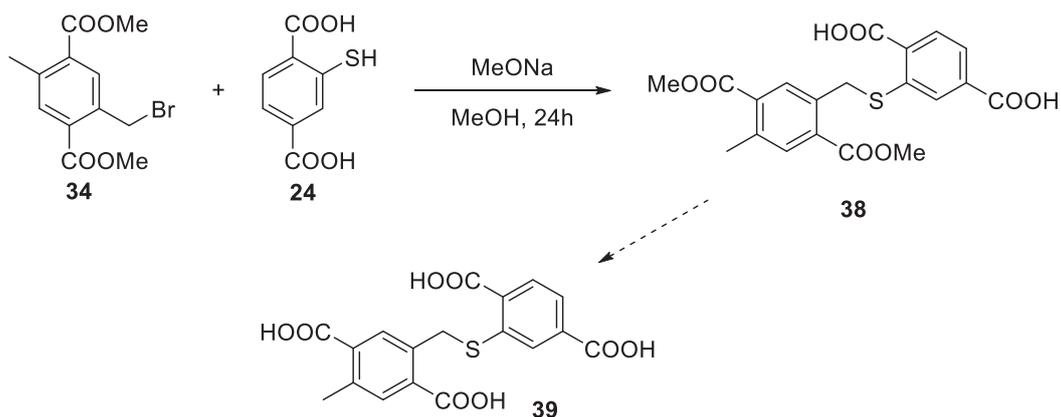


Figure 148 : Synthèse par substitution nucléophile du thioéther

Nous allons maintenant aborder les réactions d'échange thiol-disulfure dans le but d'observer le phénomène concomitant d'extrusion de soufre sur le disulfure dissymétrique conduisant potentiellement à l'espèce **39** au sein d'une chimiothèque.

## B) Suivi de la réaction de substitution directe

Dans un premier temps, nous avons effectué la réaction de substitution directe à l'aide d'un thiophénol sur un disulfure en solution aqueuse. Un premier essai a été réalisé à partir du dimère **35** et du monomère **24** à 1 mM chacun dans l'eau à pH = 9,8 et à température ambiante et sous atmosphère inerte (pour éviter tout phénomène d'oxydation thiol-disulfure simultané). Dans ces conditions, le suivi de la bibliothèque a été effectué par HPLC, mais aucune évolution n'a été observée, même après 7 jours d'agitation.

Pour améliorer la cinétique de la réaction, les conditions proposées par Gates et coll. ont été à nouveau appliquées. La nouvelle chimiothèque a été générée à partir d'un mélange stœchiométrique de **24** et **35**, avec un équivalent de triéthylamine dans le méthanol à 40°C. Son suivi cinétique est exposé à la figure 149. Le monomère **24** est d'abord rapidement consommé en dimère **36**. Ce dimère symétrique est ensuite converti en dimère dissymétrique **37** par une réaction de métathèse de ponts disulfure avec le dimère symétrique **35**. A l'équilibre, le dimère **37** est présent à 45% dans la bibliothèque et le dimère **35** à 55%. Aucune espèce issue d'une réaction d'extrusion de soufre n'est a priori présente dans le milieu en quantité notable.

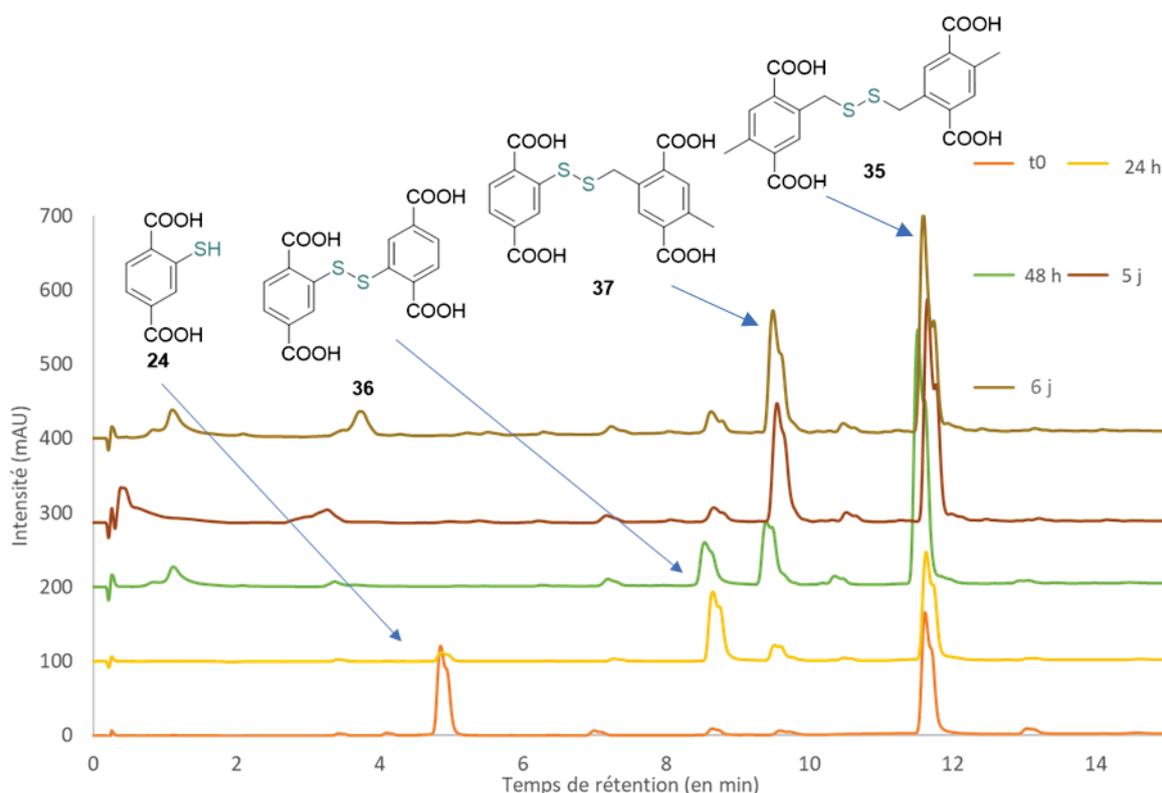


Figure 149 : Chromatogrammes HPLC du suivi cinétique de la chimiothèque formée à partir d'un mélange 1:1 de **24:35** dans le méthanol en présence d'un équivalent de triéthylamine.

La manipulation a finalement été reproduite dans les conditions les décrites comme étant optimales par Gates et coll. pour favoriser la formation de thioéther. Ainsi, une nouvelle chimiothèque a été générée avec 10 équivalents de thiol libre **24**, 1 équivalent de dimère **35** et 1 équivalent de triéthylamine dans le méthanol à 40°C. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en figure 150. Dans ces conditions, les fonctions thiols sont complètement oxydées après 24 heures de réaction. Comme précédemment, le thiol libre **24** est principalement rapidement et quantitativement converti en homodimère **36**. Un faible pourcentage de cet homodimère est capable de réagir avec

l'homodimère **35** par métathèse de ponts disulfure pour former l'hétérodimère **37**. Après 5 jours d'agitation, aucune modification des proportions n'est observée dans la bibliothèque. Ainsi, à l'état d'équilibre, **35** est présent à 27% dans la bibliothèque, **36** à 66% et **37** à 7% et aucune espèce avec extrusion de soufre n'ont été produites au cours de cette chimiothèque.

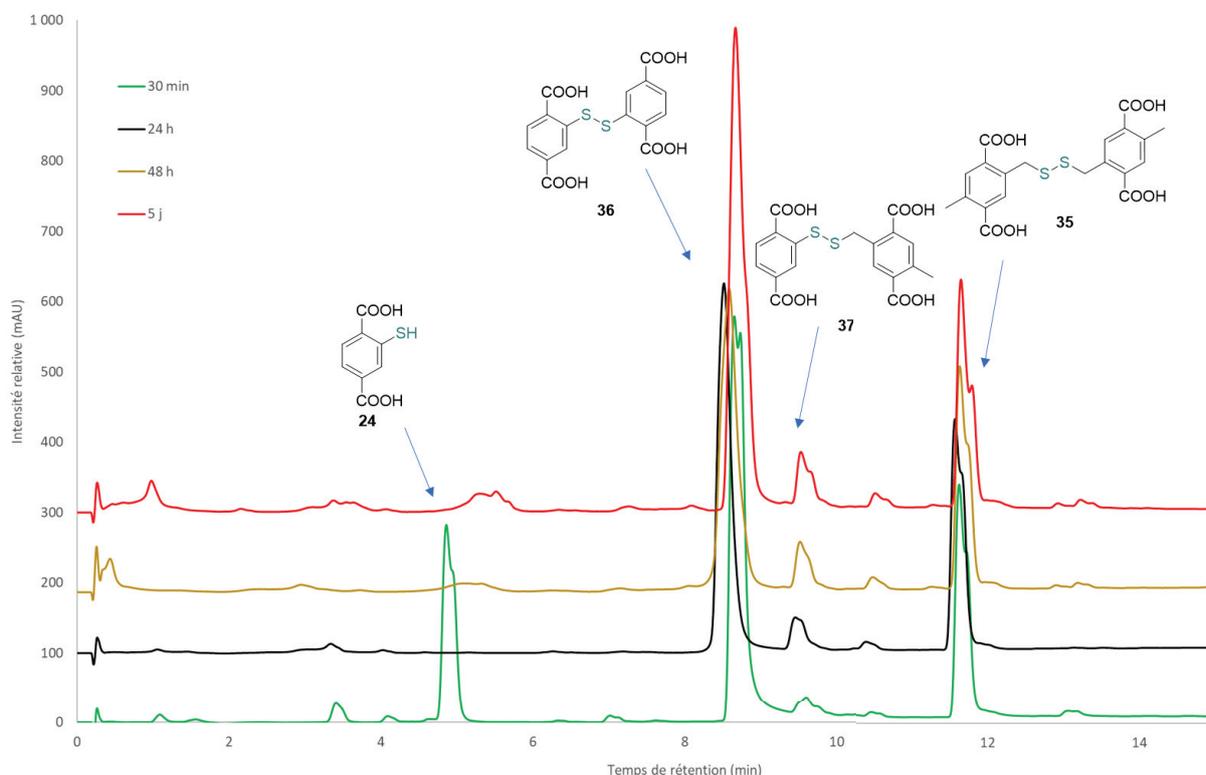
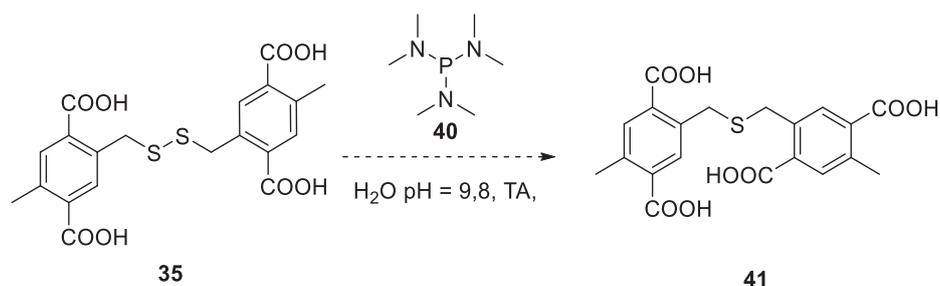


Figure 150 : Chromatogrammes HPLC du suivi cinétique de la chimiothèque formée à partir de 10 équivalents de **24** et un équivalent de **35** dans le méthanol en présence de triéthylamine.

Ainsi, les conditions expérimentales testées ne se sont pas avérées être efficaces pour observer des espèces résultantes de réactions d'extrusion de soufre. L'analyse rétrosynthétique 1 n'a donc pas été sélectionnée. Néanmoins, l'analyse rétrosynthétique 2 semble plus prometteuse, comme nous l'avions abordée dans la partie bibliographique.

### 3) Extrusion de soufre à l'aide d'agent phosphoré

L'analyse rétrosynthétique 2 de la figure 138 présentait une voie de synthèse de thioéther symétrique à partir d'un disulfure symétrique. Le disulfure benzylique **35** a ainsi été mis en contact avec la tris(diméthylamino)phosphine **40** dans le but de former l'espèce extrudée correspondante **41**. Cette réaction a été effectuée avec un nombre variable d'équivalents d'aminophosphine, dans l'eau à pH = 9,8 (figure 151). Les réactions ont été effectuées soit sous atmosphère inerte soit à l'air libre, mais aucun impact de la présence d'oxygène n'a été relevé. Nous présentons ici les résultats des tests aérobies.



Entrée	Eq. Dimère 35	Eq. Phosphine 40	Conversion du réactif de départ ?
1	1	1	Non
2	1	2	Non
3	1	10	Non
4	1	50	Oui : intermédiaire <b>42</b> observé
5	1	Solvant ( <b>40</b> : H <sub>2</sub> O – 1 :1)	Oui : intermédiaire <b>42</b> observé

Figure 151 : Schéma de synthèse du thioéther 41 et tableau indiquant les conditions réactionnelles testées.

La première entrée du tableau implique un équivalent d'aminophosphine **40** par rapport à **35** en milieu aqueux. Un suivi RMN <sup>1</sup>H a été effectué ne révélant aucune évolution des signaux correspondants au réactif **35** après 3 jours d'agitation. Ce premier test suggère que le nombre d'équivalents en **40** trop peu important pour observer une conversion du réactif. Dans le cas des entrées 2 et 3, correspondant à l'ajout de 2 et 10 équivalents, le suivi RMN <sup>1</sup>H et HPLC n'indique à nouveau aucune conversion.

La quatrième entrée du tableau correspond à l'ajout de 50 équivalents de phosphine **40** par rapport à **35**. Dans ce cas, nous avons observé une évolution du système, mais aucun phénomène d'extrusion de soufre n'a été détecté.

- Le suivi en HPLC montre qu'il y a une consommation du réactif de départ (figure 152). On observe une forte diminution du signal correspondant au réactif **35**, et l'apparition rapide de deux nouvelles espèces (au temps de rétention  $t = 0,2$  min et  $t' = 8$  min).
- Une analyse en spectrométrie de masse a permis après 9 jours d'observer la présence de l'intermédiaire réactionnel **42** ainsi que l'hexaméthylphosphoramidate **43** et l'espèce **45** (qui peut être issu de la fragmentation de **43** dans l'analyseur de masse) en plus du réactif initial **35** (figure 153). Le réactif **40** n'est pas visible en HPLC du fait de son oxydation en **43**. Nous supposons alors que l'espèce cationique **42** est présente à  $t = 0,2$  min sur les chromatogrammes HPLC. Une nouvelle analyse en spectrométrie de masse a été effectuée après 1 mois d'incubation : le dimère **35**, l'intermédiaire **42** et le composé phosphoré sont toujours présents et accompagnés de nouvelles espèces phosphorées : la thiophosphine **44** et l'analogue **46**. La présence de ces deux espèces contenant des liaisons P=S suggère une progression de la réaction dans le sens de l'extrusion de soufre. Néanmoins, aucune espèce de type thioéther n'est détectable dans ce même milieu réactionnel.

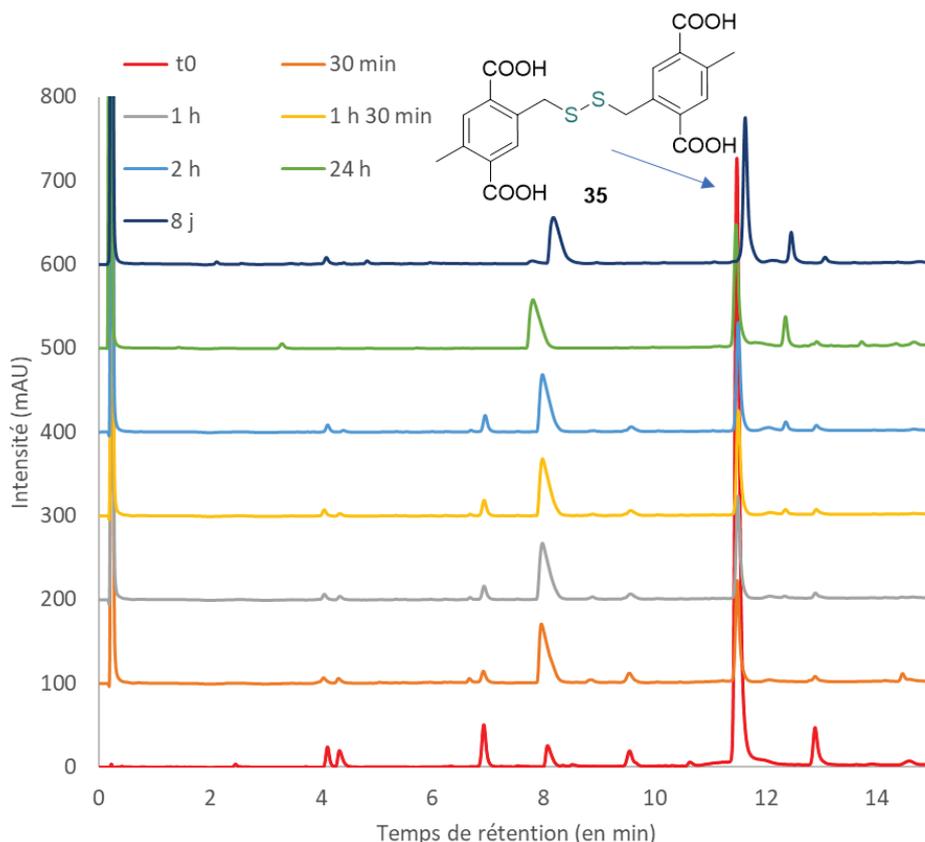


Figure 152 : Chromatogrammes HPLC de la chimiothèque formée à partir du disulfure **35** en présence de 50 équivalents d'aminophosphine **40** dans l'eau pH = 9,8 à TA.

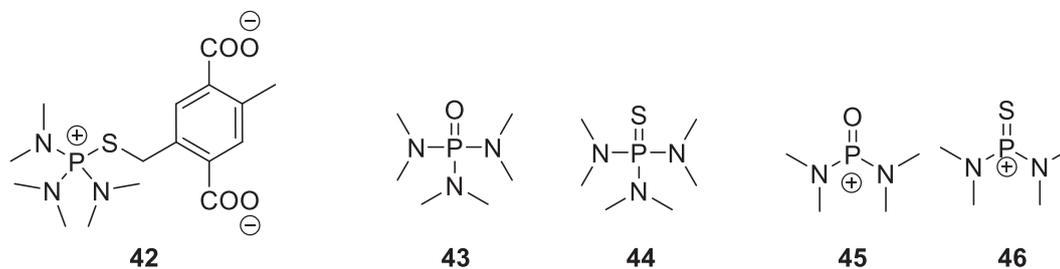


Figure 153 : espèces formées dans le mélange réactionnel dont la préparation est décrite à l'entrée 4 du tableau de la figure 151

- Les suivis effectués en RMN  $^1\text{H}$  effectuée ont indiqué la présence d'une nouvelle espèce en faibles quantités, caractérisée par 2 nouveaux signaux de type singulet à 7,34 et 7,38 ppm en plus de ceux de l'homodimère **35** (à 7,25 et 7,31 ppm) qui semblent correspondre l'intermédiaire réactionnel **42**. Des expériences de RMN bidimensionnelle de type COSY et DOSY n'ont pas permis de progresser vers l'attribution de ces signaux, du fait de la concentration trop élevée de l'aminophosphine dans le milieu. Des expériences de RMN  $^{31}\text{P}$  ont permis de mettre en évidence une espèce phosphorée dont le déplacement chimique est de 15,6 ppm en plus de l'aminophosphine **40** et **43**. Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé de référence dans l'eau pour ces espèces, mais seulement dans le benzène deutéré avec  $\text{H}_3\text{PO}_4$  lors de l'observation de **42'**.<sup>123</sup> La concordance établie entre les axes pour ces différents

solvants deutérés n'invalide pas l'hypothèse que cette espèce puisse correspondre à **42** ou à **44** (figure 154).

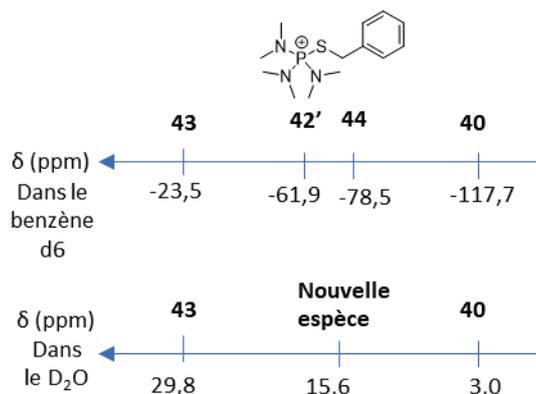


Figure 154 : Axes présentant les données en RMN  $^{31}\text{P}$  dans le benzène- $\text{d}_6$  ou dans le  $\text{D}_2\text{O}$

- Nous avons chauffé la chimiothèque à  $65^\circ\text{C}$  pendant 24 heures et aucune modification de l'allure des graphiques ou de la quantité de produits n'a été notée.

Ainsi, dans les conditions de l'entrée 4, aucun produit issu d'une réaction d'extrusion de soufre n'a été détecté au cours de ces différentes analyses.

Les conditions de l'entrée 5 du tableau de la figure 151 ont été appliquées, où la phosphine est directement utilisée comme solvant en mélange 1:1 avec l'eau. La phosphine est ainsi en large excès. Un suivi en spectrométrie de masse et en HPLC est effectué après 24 heures de réaction. Les espèces **42** et **43** sont à nouveau identifiées, indiquant la relative stabilité de l'intermédiaire réactionnel. Une nouvelle espèce dont le ratio  $m/z = 341,2$  a été détectée en spectrométrie de masse de type (+) ESI-MS, mais n'a pas pu être identifiée. Le chromatogramme HPLC correspondant est présenté à la figure 155, où l'on observe le pic supposé de l'espèce **42** (0,2 min) et le pic à 8 min correspondant à la nouvelle espèce et la disparition du réactif. Une nouvelle analyse en spectrométrie de masse a montré uniquement la présence de la nouvelle espèce formée après 1 semaine d'agitation.

Ainsi, les voies synthétiques d'extrusion de soufre à partir de disulfures de la littérature ont été testées sur nos systèmes. Pour chacune de ces séries de tests, aucune molécule présentant des liens thioéthers recherchés n'a été obtenue. Néanmoins, dans le cas de l'utilisation de l'aminophosphine, l'identification d'un intermédiaire thiophosphonium issu du mécanisme validé dans la littérature et précurseur du thioéther ciblé a pu être observé. L'étude bibliographique a révélé la faible tolérance de l'aminophosphine envers les acides carboxyliques, la réaction entre ces partenaires conduisant à la formation d'amide. Aucun produit porteur d'une telle fonction chimique n'a été détecté ici, ce qui suggère la compatibilité entre réactif dans les conditions testées. Ces résultats indiquent a priori que l'étape de formation du thioéther est particulièrement lente dans le cas du système d'étude. Compte tenu de cette absence d'extrusion sur des disulfures porteurs d'acides carboxyliques simples, aucun essai n'a été conduits sur les poly(disulfures) macrocycliques de type dyn[n]arènes. Toutefois, le processus d'extrusion de soufre a pu être observé sur des systèmes apparentés sans faire intervenir un agent extérieur phosphoré.

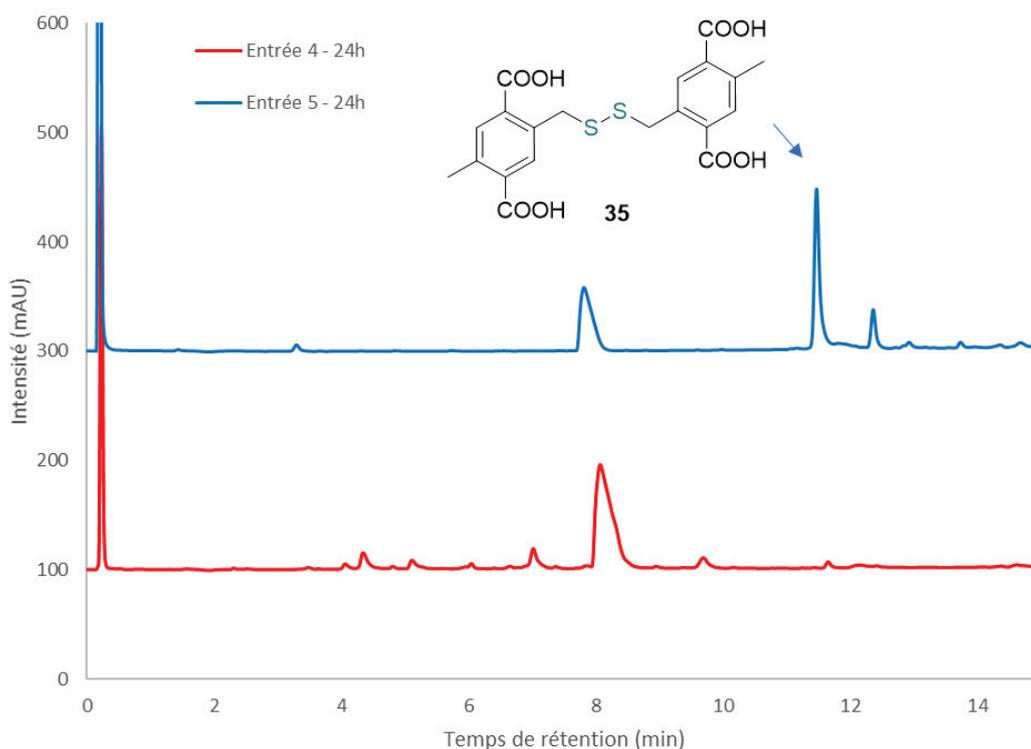


Figure 155 : Chromatogrammes HPLC correspondant aux entrées 4 et 5 du tableau de la figure 151 à 24h de réaction.

### III) Phénomène d'extrusion de soufre spontanée sur des macrocycles poly(disulfures) pyridinium carboxylates

#### 1) Présentation des briques pyridinium

De nouvelles briques, présentées à la figure 156, ont été synthétisées par Kenji Caprice au département de chimie organique de l'université de Genève. Il s'agit de briques de type méta-mercaptométhyl N-alkylpyridinium. La brique **47** et **48** diffèrent par leur bras liant les deux noyaux pyridinium : le premier contient un cycle benzénique alors que le second est purement aliphatique.



Figure 156 : briques méta-mercaptométhyl N-alkylpyridinium synthétisées par l'équipe de Genève.

Les bibliothèques combinatoires dynamiques issues de l'oxydation aérobie de chacune de ces briques seules ont été étudiées par l'équipe partenaire. Pour chacune des briques **47** et **48**, les produits formés sont les monomères et les dimères cycliques issus de l'oxydation des thiols en pont disulfures. A la suite à ces résultats préliminaires, nous avons étudié les chimiothèques issues de l'oxydation conjointe de chacune des briques **47** et **48** en présence d'une quantité stœchiométrique de brique **4**. L'objectif initial était d'observer un processus de « self-sorting » : l'obtention de caténanes formés

d'un anneau cationique issu de la cyclisation des briques **47** ou **48** et d'un anneau issu de l'homomacrocyclisation de **4** (figure 157).

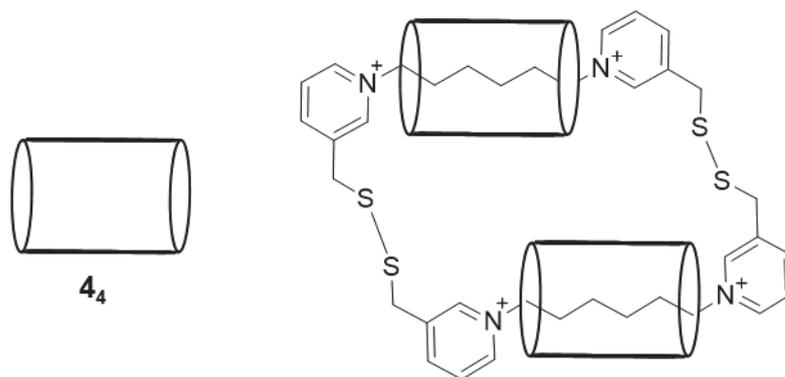


Figure 157 : structure d'un caténane supposé se former entre **4** et **48**

## 2) Synthèse de macrocycles en chimiothèque

Une première chimiothèque a été générée par mise en contact de la brique **4** avec la brique **47** à une concentration de 1 mM chacune à pH 7,4 dans l'eau à température ambiante. Sa composition a été suivie par LC/MS pendant 2 mois (cf. chromatogramme annexe A). Comme le montre la figure 159, au bout de 7 jours, on observe la disparition quasi complète des réactifs initiaux et la formation d'un mélange 75:23 des deux macrocycles **49** et **50** (figure 158). Le macrocycle **49** correspond à l'hétérodimère issu de l'association de **4** et **47** par formation de ponts disulfures tandis que le macrocycle **50** est produit par extrusion d'un atome de soufre à partir de **49**. Il semble donc qu'il y ait ici un phénomène d'extrusion spontanée de soufre, puisqu'aucun agent n'a été ajouté. Aucun adduit de type caténane n'a été observé. Lorsque la chimiothèque est analysée à nouveau après 7 jours d'agitation l'espèce issue de la perte d'un second atome de soufre à partir de **50** noté **51** est observée à près de 20% dans la chimiothèque. Entre 10 et 15 jours, le macrocycle **50** devient l'espèce majoritaire dans le mélange pour être remplacé par le macrocycle **51** après plus de 40 jours. Par la suite, des phénomènes de suroxydations des ponts disulfures sont observés (cf annexe A). Il semble donc y avoir un phénomène spontané d'extrusion de soufre pour former un hétérodimère statique à liaisons exclusivement thioéthers à partir d'un hétérodimère dynamique à liaison disulfures.

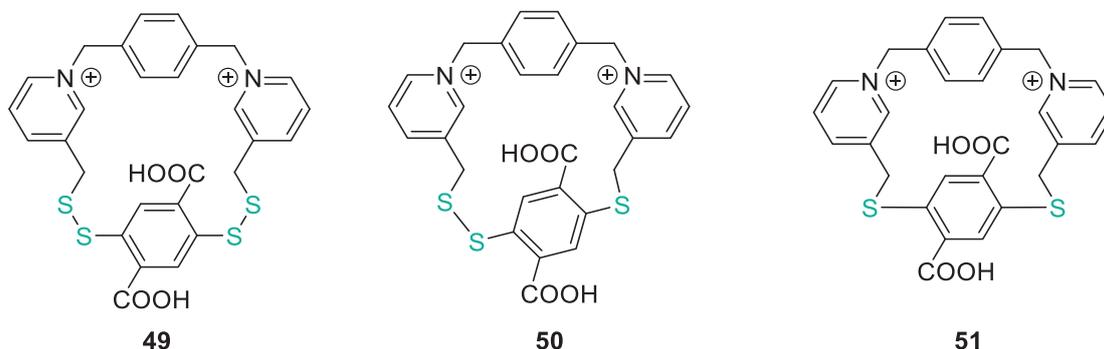


Figure 158 : structure des macrocycles formés dans la chimiothèque entre **4** et **47**.

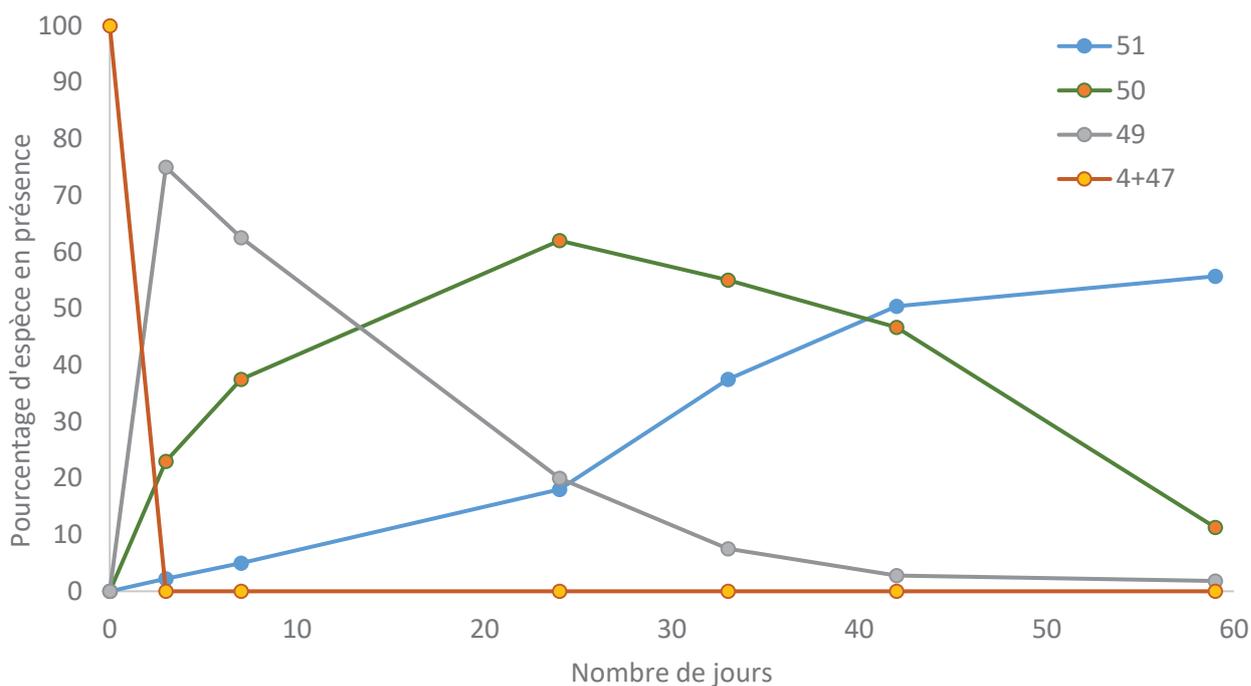


Figure 159 : Pourcentage d'espèces en présence en fonction du temps pour la chimiothèque des briques **4 + 47** dans l'eau à pH = 7,4 et à température ambiante.

Une chimiothèque similaire a été générée entre les espèces **4** et **48** dans les mêmes conditions. Les espèces formées sont représentées à la figure 160 et le suivi cinétique de cette expérience est résumé à la figure 161 (cf. chromatogramme annexe A). On observe la formation de macrocycles dont les hétérodimères **52**, **53** et **54** et les hétérotrimères **55**, **56**, **57** et **58** avec disparition complète des briques dithiols au bout de 7 jours d'agitation. La formation de cyclotrimères est probablement due à la souplesse apportée par la chaîne aliphatique entre les pyridiniums. Aucun auto-assemblage de type caténane n'a été observé à nouveau dans ce mélange. Les espèces issues de l'extrusion de soufre sont détectées, mais restent minoritaires même après 60 jours de suivi, comme le montre le profil cinétique. L'hétérotrimère **55** reste ainsi l'espèce majoritaire (43% de la chimiothèque) jusqu'en fin de suivi cinétique. Enfin, nous observons également l'espèce **58** qui contient un pont trisulfure. Ce type d'espèce n'avait pas été observé dans la bibliothèque entre **47** et **4**.

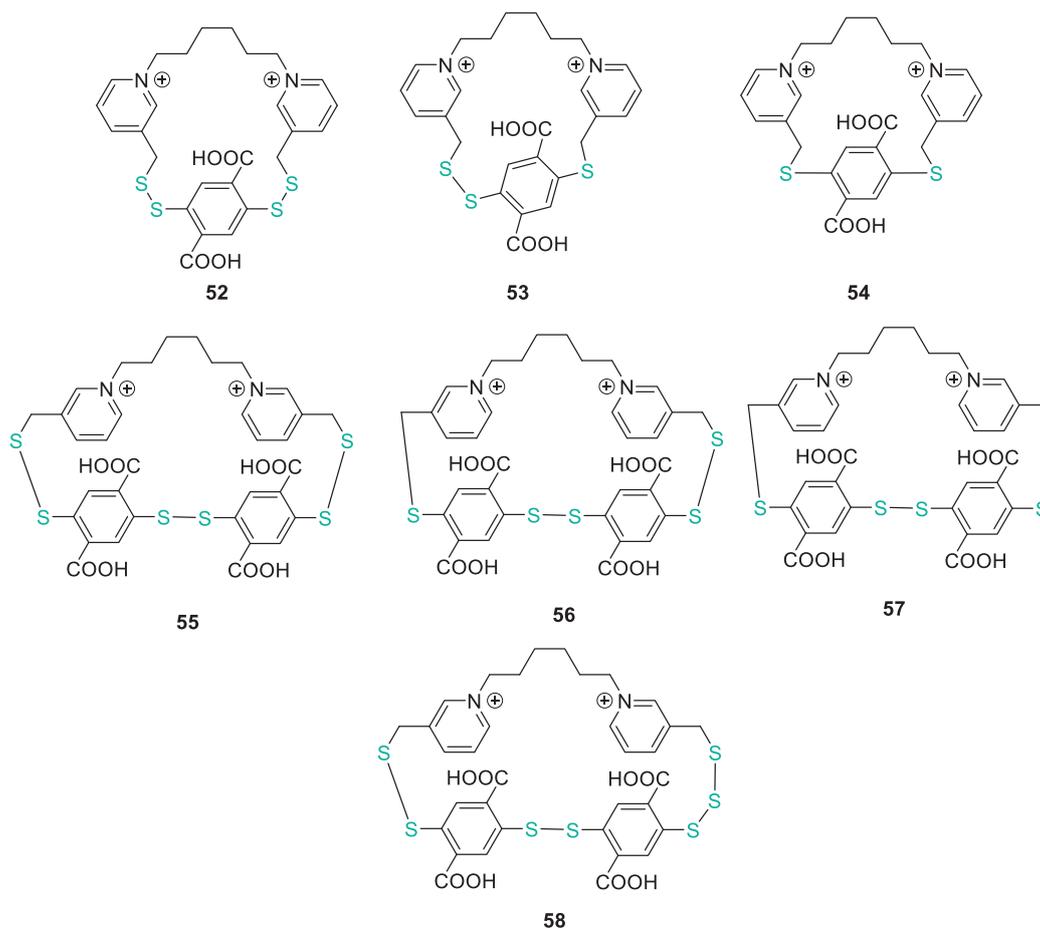


Figure 160 : structures des macrocycles observés dans la chimiothèque formée à partir de **4** et **48**.

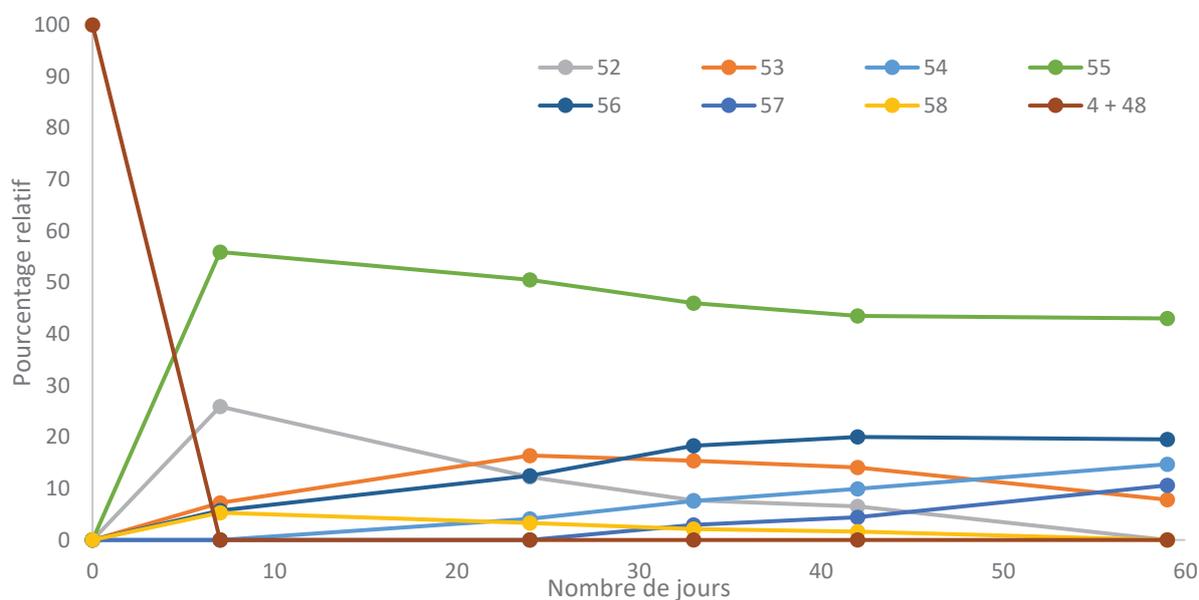


Figure 161 : Pourcentage d'espèces en présence en fonction du temps pour la chimiothèque des briques **4 + 48** dans l'eau à pH = 7,4 et à température ambiante.

L'hétérodimère **52** est observé sous la forme de deux pics distincts dont les temps de rétention sont séparés d'une minute sur le chromatogramme HPLC. Comme cela a été vu précédemment pour les dynarènes, la rotation bloquée de la brique dimercaptotéréphtalate au sein d'une structure macrocyclique peut induire l'observation de plusieurs stéréoisomères. Cette rotation bloquée peut être imputée à des interactions répulsives (répulsions stériques) ou attractives. Dans le cas présent, des interactions type  $\pi$ -stacking entre les briques pyridium appauvries électroniquement et les briques carboxylates enrichies électroniquement peuvent induire un repliement au sein du macrocycle. Des modélisations sur Spartan (à l'aide de calcul semi-empirique en phase gaz) ont été effectuées par le Pr. Leclaire et dont des clichés sont représentés en figure 162. Ils confirment les interactions de type  $\pi$ -stacking qui bloquent à la fois la libre rotation des unités téréphtalates et pyridinium. Il est donc a priori possible d'identifier quatre stéréoisomères, comme décrits en figure 162. On distingue deux couples d'énantiomères, diastéréoisomères entre eux. Ainsi, chaque pic observé sur le chromatogramme HPLC peut raisonnablement correspondre à un couple d'énantiomères. Dans le cas étudié, avec une chaîne aliphatique de 6 carbones entre les unités pyridinium, n'est pas optimal pour visualiser rigoureusement le  $\pi$ -stacking, dû aux tensions de cycle. Un macrocycle similaire, qui présenterait un espaceur aliphatique de 11 carbones serait le cas optimal pour observer le repliement par  $\pi$ -stacking (figure 162).

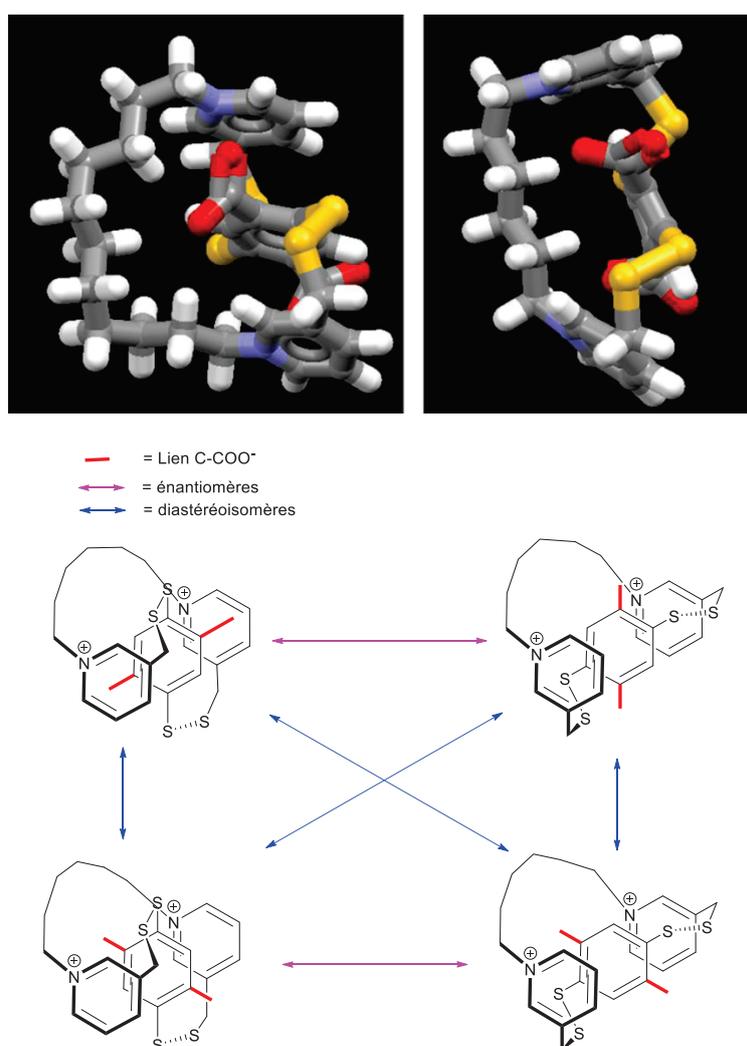


Figure 162 : Modélisations des macrocycles et présentation de la chiralité hélicoïdale de **52**.

Il est donc possible d'observer de l'extrusion spontanée de soufre. La présence du pont trisulfure semble indiquer qu'un processus de métathèse entre disulfures participe à la conversion du système en thioéther et trisulfure. Ce phénomène, bien que remarquable, est difficilement interprétable. Une hypothèse est que cette extrusion réduit la mobilité conformationnelle et est optimisée cet empilement. Elle est plus importante dans le cas du macrocycle présentant **49** présentant un espaceur aromatique rigide, par rapport aux espèces **52** et **55** présentant un espaceur aliphatique permettant plus de flexibilité. Nous allons essayer de rationaliser la relation structure-réactivité l'aide des briques monomériques.

### 3) Rationalisation du phénomène d'extrusion spontané à l'aide de briques monomériques

Deux chimiothèques correspondant avec les entrées 1 et 2 du tableau 20 ont été générées. Pour chacun de ces mélanges, les chromatogrammes obtenus montrent uniquement la présence d'espèces à des temps de rétention trop faibles pour être analysés (dans le pic d'injection ou pic à des temps de rétention non analysable en LC/MS). Une optimisation des conditions d'analyse (choix de la colonne, cf. partie expérimentale) a été effectuée dans le but de retenir ces espèces sur la colonne.

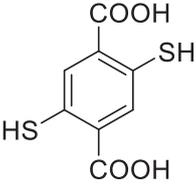
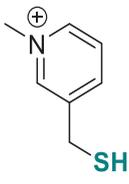
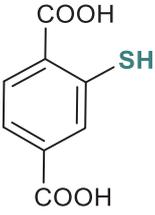
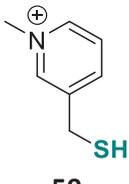
Entrée 1	 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>59</b></p>
Entrée 2	 <p style="text-align: center;"><b>24</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>59</b></p>

Tableau 20 : Briques utilisées dans les chimiothèques pour tenter de rationaliser le phénomène d'extrusion spontanée.

La chimiothèque correspondant à l'entrée 1 a été préparée à partir d'un mélange stœchiométrique en proportion stœchiométrique en chacune des briques dans l'eau à pH = 7,4 et à température ambiante. Le suivi HPLC en figure 163 montre la disparition de la brique **4** avec le temps et aucune oxydation de la brique **59**. Lors des études de la chimiothèque de **4** seule, la formation de **4<sub>3</sub>** homochiral qui s'auto-agrège n'était pas détectable par HPLC couplée à un détecteur UV-visible. Nous supposons dans le cas présent qu'un phénomène du même type a lieu dans le mélange (génération d'espèces peu soluble).

Le suivi de la chimiothèque 2, préparée à partir d'un mélange également stœchiométrique et analysé en HPLC est présenté ci-dessous en figure 164. On observe seulement une dimérisation de la brique **24** et aucune évolution de la brique **59**. Aucune espèce présentant de l'extrusion de soufre n'a été observée.

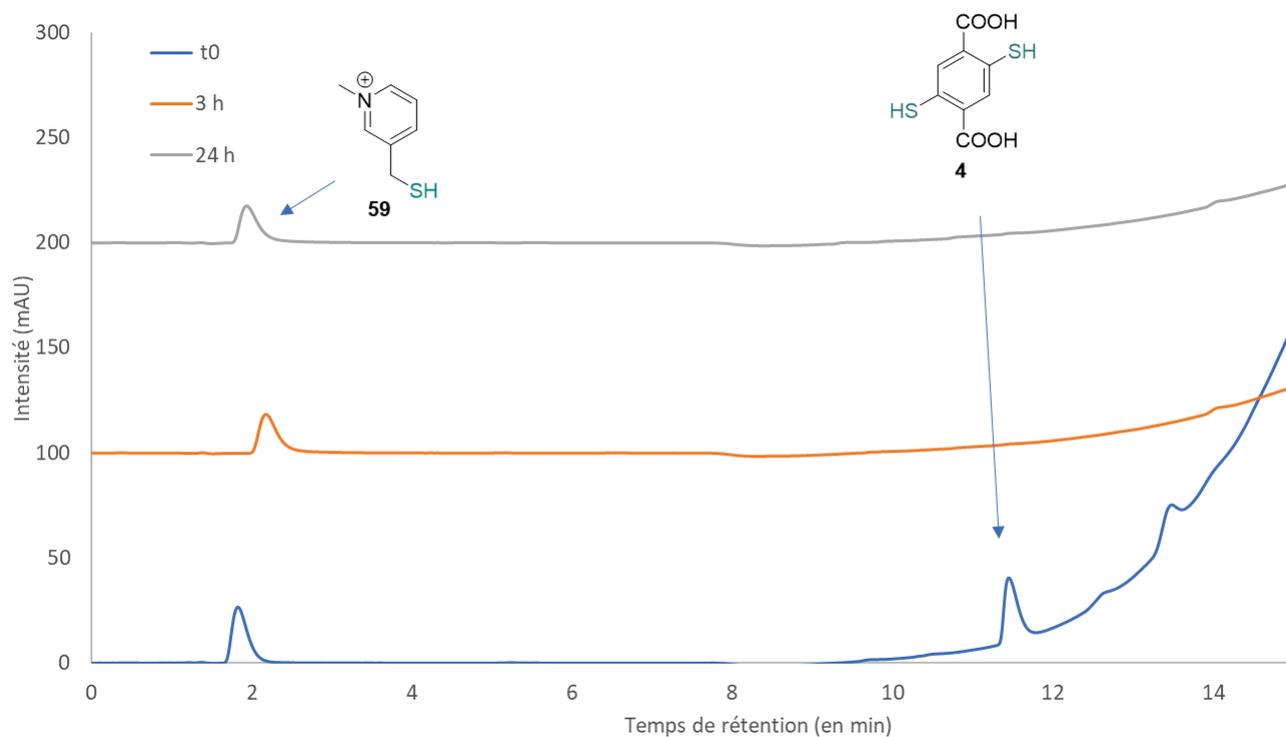


Figure 163 : Chromatogrammes de l'entrée 1 du tableau 16 (1 mM en chacune des briques dans l'eau pH = 7,4 et température ambiante).

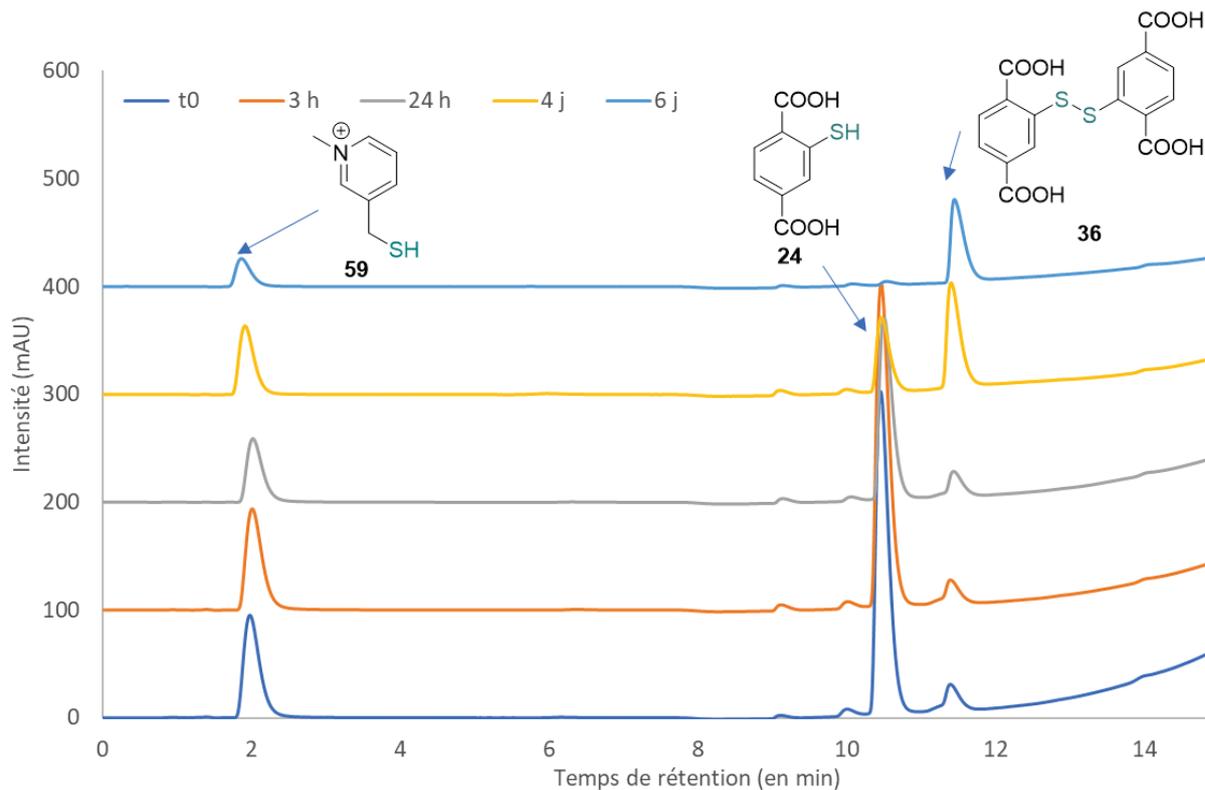


Figure 164 : Chromatogrammes de l'entrée 2 du tableau 16 (1 mM en chacune des briques dans l'eau à pH = 7,4 et à température ambiante).

Ainsi, les résultats obtenus sur ces composés modèles n'ont pas permis d'expliquer le phénomène d'extrusion de soufre. L'absence de produit d'extrusion spontanée semble conforter l'hypothèse selon laquelle cette réaction inattendue est due à des effets ou interactions uniquement mis en jeu dans les structures macrocycliques. Il semble également (et cela nécessitera d'être confirmé) qu'il faille un thiol benzylique et phénylique de richesses électroniques opposées pour observer cette extrusion spontanée.

#### 4) Perspectives

Les différents hétérodimères et hétérotrimères identifiés, résultants de l'oxydation des thiols en disulfure et de l'extrusion spontanée de soufre peuvent avoir un intérêt en reconnaissance moléculaire. Du fait de leur structure zwitterioniques à pH physiologique, ces cavitands peuvent être de potentiels récepteurs à acides aminés. Une des perspectives de ce travail est donc d'isoler ces macrocycles. Des modélisations effectuées sur Spartan (à l'aide de calcul semi-empirique en phase gaz) par le Pr. Leclaire montrent néanmoins une cavité peu définie due à un repliement des cycles aromatiques dans la structure de **49**. La figure 165 présente aussi la modélisation de l'association du macrocycle **49** avec l'acide aspartique, régit par des interactions électrostatiques ammonium-carboxylate. Le macrocycle ne semble pas être capable de former des complexes d'inclusion.

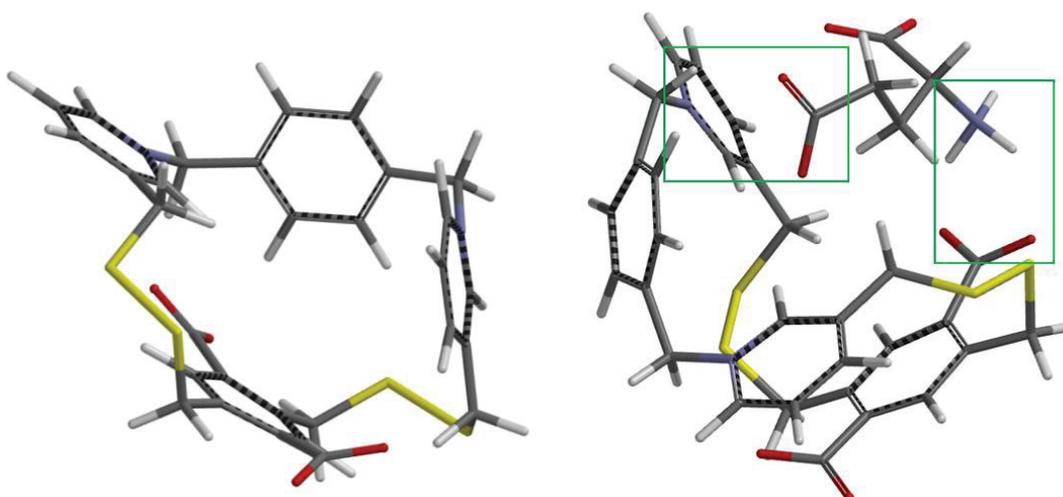


Figure 165 : A gauche, modélisation de **49**. A droite, modélisation de l'association **49** – acide aspartique. Les interactions électrostatiques sont encadrées en vert.

Une seconde perspective à l'issue de ces travaux serait de synthétiser de nouveaux cyclophanes présentant des unités benzyliques. Les briques **60** et **61** (figure 166) seraient de bons candidats pour effectuer ces nouveaux macrocycles. La brique **60** a été synthétisée par Benjamin Ourri dans le laboratoire. Dans la chimiothèque générée à partir de cette brique, les différentes espèces macrocycliques **60<sub>n</sub>** avec n compris entre 2 et 6 sont observées. Le dimère cyclique **60<sub>2</sub>** majoritaire a été isolé et cristallisé, mais aucune extrusion de soufre n'a été observée après applications de diverses méthodes. La brique asymétrique **61** n'a pas été synthétisée, mais elle présente une fonction thiophénol et une fonction thiol benzylique : malgré son intérêt limité, cette brique serait une bonne candidate pour former des dérivés de dynarènes présentant des liens carbone-soufre après réaction d'oxydation des thiols en disulfure et extrusion de soufre.

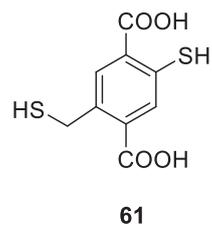
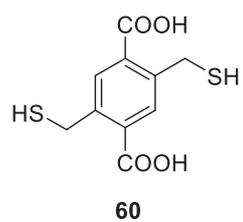


Figure 166 : structure des briques **60** et **61**

## CONCLUSION - CHAPITRE 2

Les réactions d'extrusion de soufre, effectuées suite à l'échange entre disulfures symétriques et thiols pour former des disulfures dissymétriques, ou par utilisation d'un agent phosphoré ont été décrite mécanistiquement. Certaines études récentes soulignent la compatibilité de ces réactions avec le milieu aqueux. Des stratégies d'interconversion de fonction faisant appel à ces stratégies sont rapportées dans la littérature, ou encore la conversion de macrocycles présentant des liens disulfures en liens thioéthers ou en liaisons carbone-carbone. Nous avons ainsi voulu combiner ces deux éléments, de manière à concevoir de nouveaux récepteurs macrocycliques issus de réactions d'extrusion de soufre en conditions aqueuses.

Ces méthodes de conversion post-macrocyclisation devaient initialement être appliquées aux récepteurs de la famille des dynarènes. L'application des conditions décrites dans la littérature sur des composés modèles inspirés des dynarènes polycarboxylates ne nous a pas permis d'observer la formation de liens thioéthers dans les conditions aqueuses choisies. Néanmoins, l'utilisation d'un agent phosphoré nous a conduit à observer un intermédiaire réactionnel particulièrement stabilisé dans l'eau.

De façon surprenante, lors de l'assemblage entre des briques dithiophenols dicarboxylates et benzenedithiol dipyridinium par pont disulfures, de l'extrusion spontanée de soufre a été observée menant à des espèces macrocycles présentant des liens thioéthers. Cette réaction lente cinétiquement, a permis de mettre en évidence la possibilité d'effectuer de l'extrusion de soufre entre des composés de richesses électroniques différentes dans des macrocycles. Une tentative de rationalisation des liens entre structure et réactivité a été initiée à l'aide des monothiols correspondants et n'a pas été concluante. Nous émettons ainsi l'hypothèse selon laquelle un effet macrocyclique serait à l'origine de réduction de taille de cycle qui est observée au travers du phénomène d'extrusion de soufre. A partir d'un modèle clé-serrure simpliste, on peut facilement penser que ces nouveaux cyclophanes zwitterioniques peuvent être des récepteurs potentiels des acides aminés et ainsi constituer une nouvelle classe de récepteur pour molécule d'intérêt biologique.



## CHAPITRE 3 : Conception de précurseur pour la synthèse d'iminothiocines

**Objectifs :** Dans ce chapitre, nous proposons la modification de ponts disulfures en motifs iminodithiocines pour l'obtention de nouvelles structures macrocycliques. La cavité de ces nouveaux objets pourrait avoir des caractéristiques originales avec des groupements fonctionnels orientés différemment par comparaison aux dynarènes. Les bases de Tröger sont décrites dans la littérature, quelques récepteurs présentant ces motifs sont capables de faire de la reconnaissance moléculaire en solution aqueuse. Les iminodithiocines présentent quant à eux de peu d'application dans la littérature. L'objectif principal sera d'étudier les conditions réactionnelles optimales permettant la formation des iminodithiocines (figure 167) et compatibles avec la présence de groupements hydrosolubles.

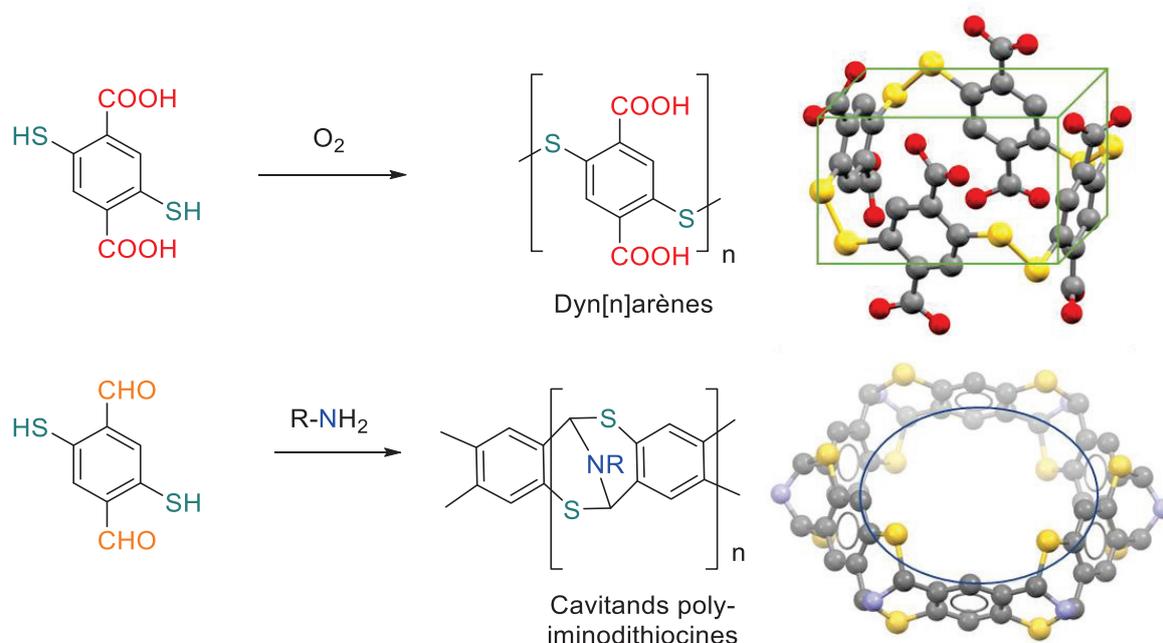


Figure 167 : Modifications structurales des briques pour la formation de cavitands poly-iminodithiocines et géométrie des macrocycles.

**Réalisations :** Après un rappel sur les travaux précédemment effectués dans le laboratoire mettant en évidence les fonctionnalisations réalisées sur ces motifs. Nous avons donc tenté de poursuivre cette étude spécifiquement par l'utilisation d'amines fonctionnalisées par des groupements hydrosolubles (figure 168a). Enfin, nous avons synthétisé de nouveaux précurseurs pour la formation de polydithiocines macrocycliques (figure 168b).

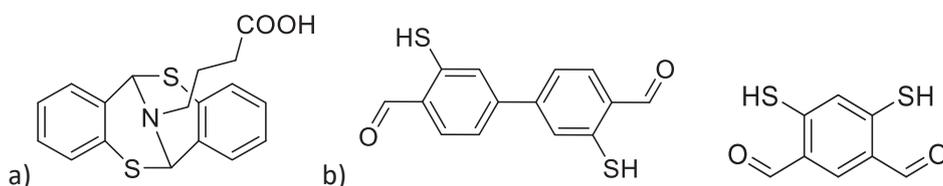


Figure 168 : a) imino-1,5-dithiocines présentant une chaîne latérale destinée à améliorer la solubilité de l'objet en milieu aqueux b) structures de briques polyfonctionnelles étudiées comme précurseurs de polydithiocines.

## Partie A : Etude bibliographique - les Dithiocines et analogues

### I) Études des bases de Tröger

#### 1) Description et synthèses des bases de Tröger

##### A) Présentation générale

Les composés appelés « bases de Tröger » initialement décrits par Tröger et coll sont étudiés depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle.<sup>124</sup> Elles sont composés d'au moins un cycle à 8 chaînons comprenant deux atomes d'azotes appelés diazocine. Les deux atomes d'azote de cette structure, en position 1 et 5, sont reliés par un pont méthylène. Une base de Tröger n'est pas plane, comme montré sur l'exemple de **III-A** en figure 169 : la présence de groupements aromatiques de part et d'autre de la diazocine rend l'édifice concave en forme de V.<sup>125</sup> Cette molécule de symétrie C<sub>2</sub> est chirale : les deux atomes d'azote de cette molécule ne peuvent pas subir d'inversion de configuration. Parmi les stéréoisomères possible, seul les énantiomères de **III-A** (*R,R*) et de **III-A** (*S,S*) peuvent être formés (figure 169). Le composé méso de **III-A** (*R,S*) ne peut se former à cause du pont méthylène. Prélog a mis en évidence, en 1944, la possibilité de séparer sur colonne chirale ces énantiomères.<sup>126</sup> Wilcox et coll. ont confirmé en 1986 les stéréodescripteurs assignés aux énantiomères à l'aide de la diffraction aux rayons X.<sup>127</sup> Enfin, Prelog a également prouvé que chaque énantiomère peut subir une racémisation en milieu acide.

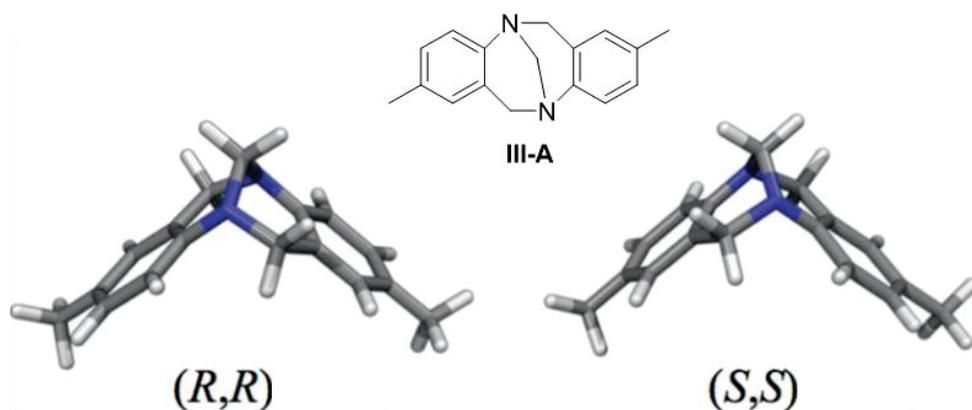


Figure 169 : description des énantiomères de la première base de Tröger

La voie de synthèse classique de ces composés est présentée à la figure 170. Une réaction de condensation est effectuée entre deux équivalents d'aniline substituée, ici le 4-amino-1-méthylbenzène **III-B**, et un équivalent d'un précurseur de groupement méthylène, ici le 1,1-diméthoxyéthane **III-C**, dans l'acide chlorhydrique concentré (ou dans l'acide trifluoroacétique).

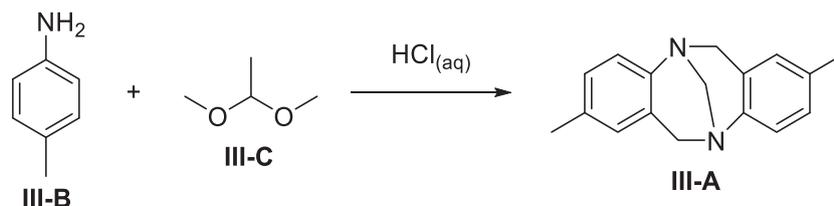


Figure 170 : Synthèse d'une base de Tröger **III-A** en milieu acide à partir du 4-amino-1-méthylbenzène **III-B** et du 1,1-diméthoxyéthane **III-C**.

## B) Analogues fonctionnalisés des bases de Tröger

De manière à obtenir une grande variété d'analogues fonctionnalisés des bases de Tröger, diverses stratégies sont décrites dans la littérature (figure 171). Il est ainsi possible de greffer des substituants sur le carbone du pont ou sur les positions aromatiques. De rares fonctionnalisations sont aussi décrites au niveau des azotes ou encore des carbones en alpha du cycle aromatique.

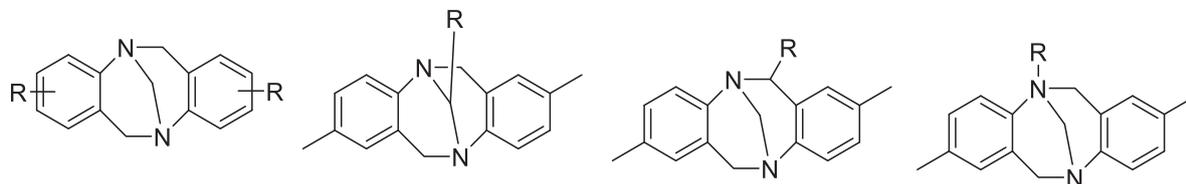


Figure 171 : diverses fonctionnalisations des bases de Tröger

### a) Fonctionnalisation/modification du pont méthylène

La fonctionnalisation du pont méthylène en plusieurs étapes à partir d'une base de Tröger **III-A** (figure 172). Dans une première étape, la rupture du pont méthylénique est induite par conversion en dinitrosamine **III-D** à l'aide de l'acide nitrique et de l'acide chlorhydrique.<sup>128</sup> Ensuite, le chlorure de cuivre en milieu acide chlorhydrique réagit sur la dinitrosamine **III-D** dans le but d'obtenir la diazocine **III-E**. Enfin, la condensation d'aldéhyde ou de cétones sur la diazocine permet de former un nouveau pont pour obtenir un analogue de la base de Tröger fonctionnalisé **III-F**. Par cette méthode, ces composés ont été synthétisés avec des rendements compris entre 52-92 % pour la dernière étape selon les carbonyles utilisés.<sup>129,130</sup>

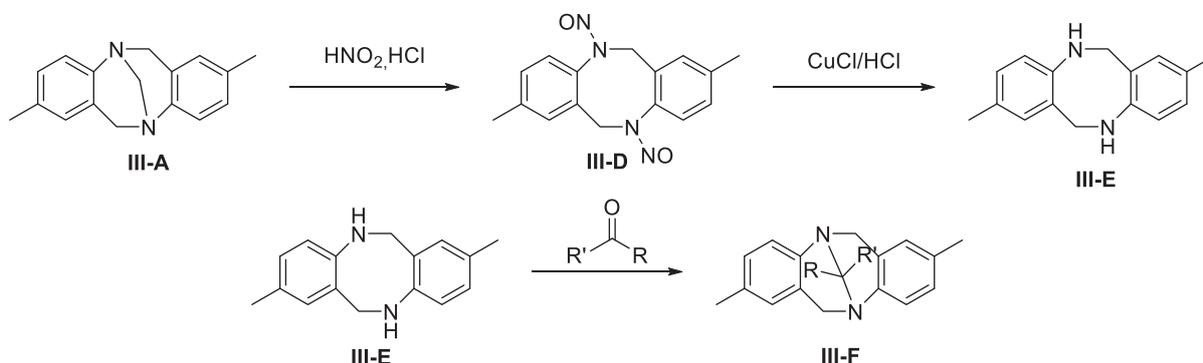


Figure 172 : Séquence réactionnelle pour la conception de bases de Tröger fonctionnalisée sur le pont méthylénique **III-F**

Des avancées plus récentes ont permis d'effectuer une fonctionnalisation en une étape à l'aide du tétrachlorure de titane ou d'agents phosphorés tel que  $\text{POCl}_3$  (figure 173).<sup>131</sup> Les auteurs de ces travaux ont montré qu'il était possible de fonctionnaliser des bases de Tröger à l'aide d'un large panel d'aldéhydes et cétones, les rendements obtenus allant jusqu'à 68%. Par exemple, la conversion de **III-A** en **III-G** s'effectue avec un rendement de 59%. Les mêmes auteurs ont décrit une variante basée sur les conditions de la réaction de Vilsmeier-Haack dans le but de fonctionnaliser le pont méthylénique par des amines. La fonctionnalisation du pont par la diméthylamine a été conduite sur le substrat **III-A** avec un rendement de 72% après 2h30 de réaction à température ambiante pour la formation de **III-H**.<sup>132</sup>

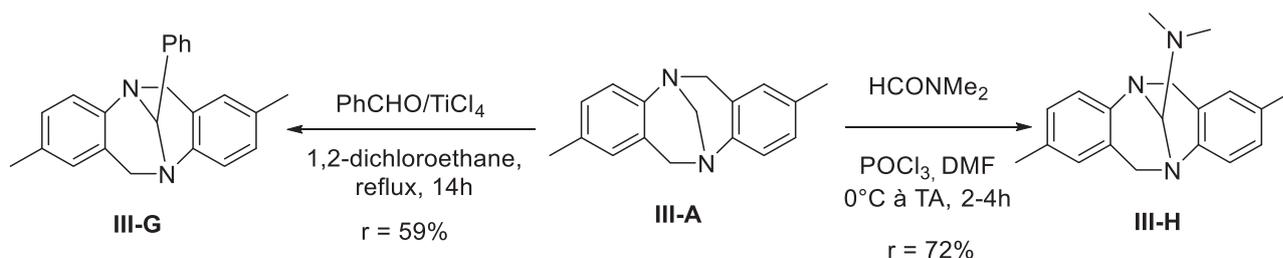


Figure 173 : Synthèse d'analogues de base de Tröger fonctionnalisés sur le pont méthylénique I

Enfin, plusieurs dérivés présentant des ponts éthyléniques fonctionnalisés ou non sont décrits dans la littérature (figure 174). A partir d'une base de Tröger **III-A**, une réaction de substitution nucléophile à l'aide du 1,2-dibromoéthane est effectuée formant l'intermédiaire ammonium quaternaire **III-I**. La présence de l'ion bromure mécanisme permet l'ouverture du bicyclic **III-J**. Enfin, la fermeture du pont est observée par départ du dibromométhane. Cette réaction est conduite dans le DMF en présence de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  à  $105^\circ\text{C}$  pendant 12 heures et permet l'obtention du produit **III-K** avec un rendement de 76%.<sup>133</sup> Ces diverses réactions sont donc très intéressantes, car elles montrent la possibilité d'ouvrir et de refermer le bicyclic.

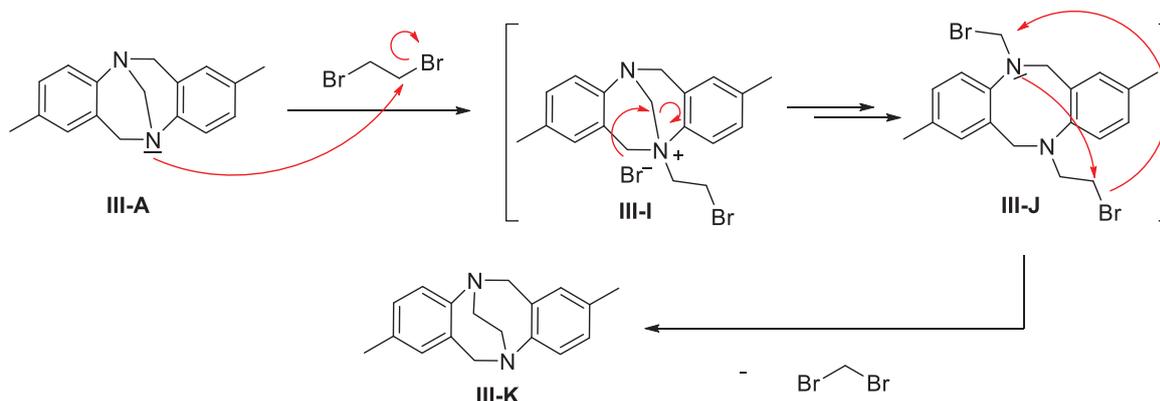


Figure 174 : Mécanisme réactionnel pour la synthèse d'analogue de bases de Tröger présentant un pont éthylénique.

### b) Fonctionnalisation du cycle aromatique

Les diverses stratégies de fonctionnalisation sur les cycles aromatiques des bases de Tröger sont présentées en figure 175. Elles reposent sur les grandes classes de couplage pallado-catalysées.

La fonctionnalisation des noyaux aromatiques des bases de Tröger passe principalement par la formation d'un substrat dihalogéné **III-M**, qui subit des réactions de couplages à l'aide de complexe de palladium. Le dérivé bromé **III-M** est formé avec un rendement de 63% à partir de la 4-bromoaniline **III-L** en présence de formaldéhyde à température ambiante dans le TFA et l'équivalent iodé est formé avec un rendement de 41%.<sup>134</sup> Divers produits issus de ces couplages sont présentés à la figure 175, résultent de l'introduction de groupements aryle, alcyne, cyano ou amino sur les cycles aromatiques (**III-N**, **III-O** et **III-P**).<sup>135,136</sup> Bew et al. ont synthétisé des bases de Tröger couplées à des acides aminés. Par des calculs *ab initio*, les auteurs ont montré de fortes restrictions conformationnelles au sein de ces édifices.<sup>137</sup> D'autres références dans la littérature présentent à des analogues polyfonctionnalisés sur les cycles aromatiques.<sup>138</sup>

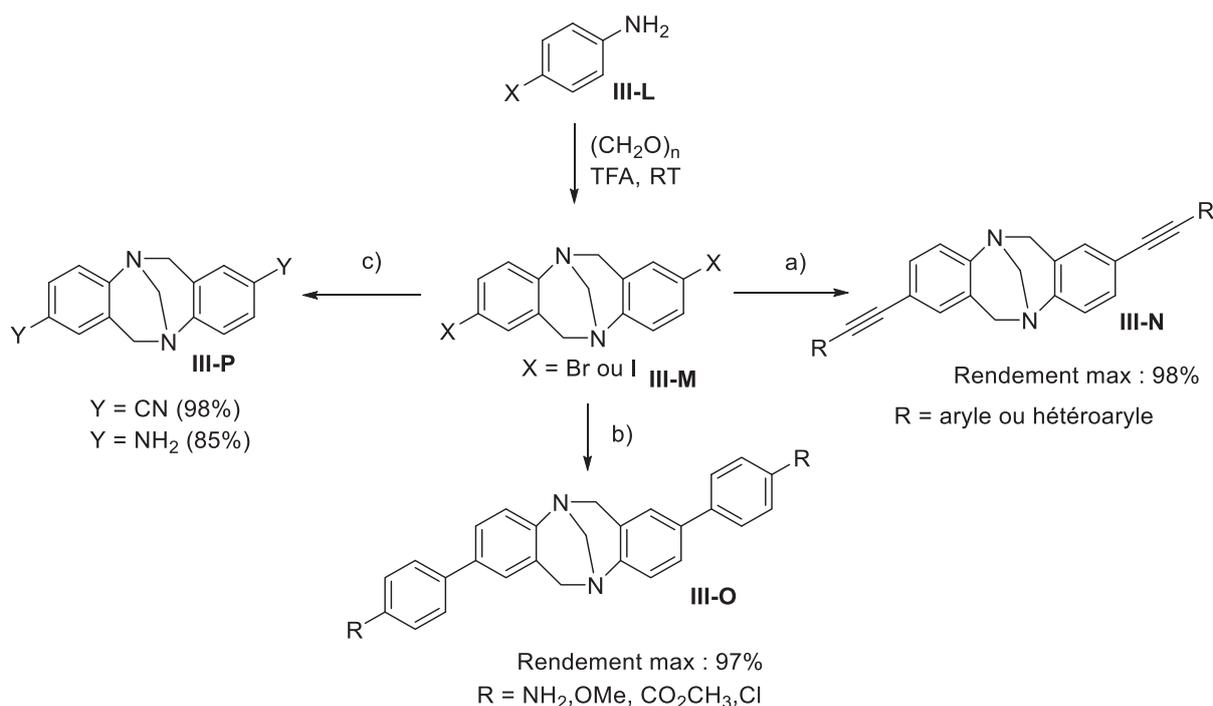


Figure 175 : Synthèse de bases de Tröger fonctionnalisées sur le cycle aromatique. Conditions réactionnelles : a) Pd(PhCN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, P(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>, alcyne vrai. b) Pd[P(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, acide phénylboronique substitué, CsF et c) pour le dérivé cyano : Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Zn(CN)<sub>2</sub>, Zn, 1,1-bis(diphénylphosphino)ferrocène, DMA ; pour le dérivé amino : Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, BINAP, NaOtBu, imine benzophénone puis HCl.

## 2) Applications des bases de Tröger

Les bases de Tröger sont décrites dans la littérature pour leurs nombreuses applications, notamment en catalyse asymétrique. Elles sont utilisées pour des réactions d'hydrogénation de carbonyle en présence de platine pour des réductions asymétriques<sup>139</sup> ou encore avec des métaux tels que l'iridium ou le rhodium pour des réactions d'hydrosilylation asymétriques d'alcynes.<sup>140</sup> La chiralité des bases de Tröger et leurs géométries permettent lors de la catalyse asymétrique, d'augmenter les excès énantiomériques obtenus à l'issue de ces réactions. Ces composés ont aussi été évalués pour la ligation avec l'ADN. En effet, certains dérivés ont été décrits comme agents anticancéreux. Ils sont capables d'inhiber l'activité de la télomérase, enzyme surexprimée dans les cellules cancéreuses et responsable de la conservation de la longueur des chromosomes lors de la réplication de l'ADN.<sup>141</sup> Nous nous focaliserons sur les oligomères qu'il est possible de former.

### A) Oligomères de Bases de Tröger et applications

Dolensky et *al.* ont synthétisé une nouvelle famille d'oligomère linéaire et cyclique de base de Tröger. Premièrement, ils ont formé différents dimères de base de Tröger de géométrie variable. Ces structures montre que le choix de la position des substituants sur les cycles aromatiques sont important pour générer une géométrie choisie (figure 176).<sup>142</sup> Les différentes géométries des cavités de chacune de ces molécules hôtes peuvent donc impacter sur leurs potentielles propriétés de reconnaissance moléculaire de molécules invitées.

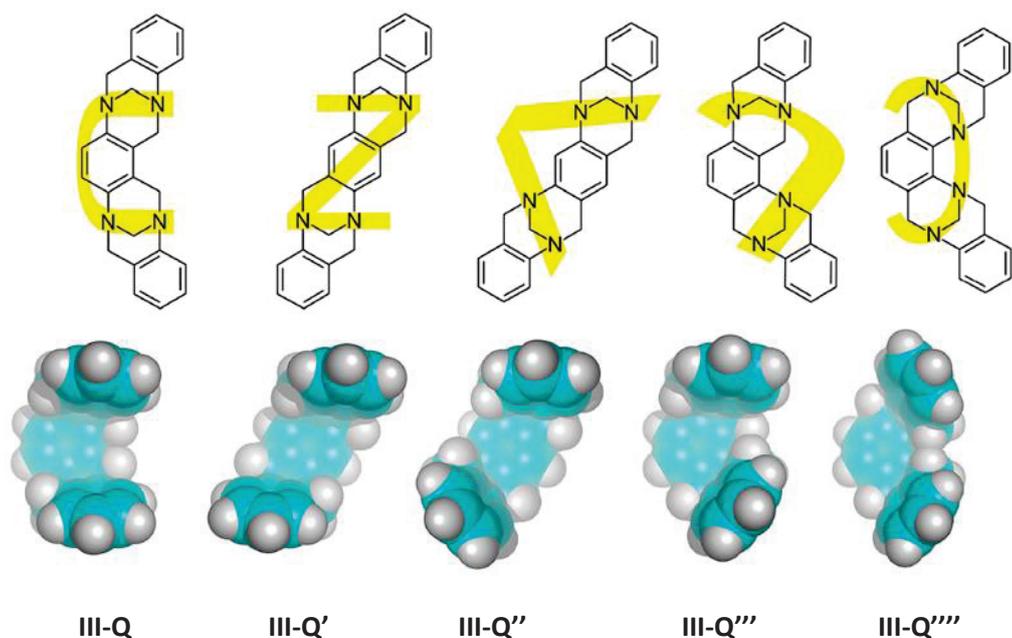


Figure 176 : géométries des dimères de base de Tröger décrit par Dolensky et al.

Ces auteurs ont aussi réussi à synthétiser des oligomères linéaires et macrocycliques des bases de Tröger de grande taille (nombre d'unité  $\geq 4$ , figure 177). Les auteurs ont décrit des pinces moléculaires ou des structures hélicoïdales **III-T** à partir des oligomères linéaires ainsi que des macrocycles présentant 4 ou 6 motifs base de Tröger **III-R** et **III-S**.<sup>143</sup> La structure hélicoïdale ou cyclique dépend à nouveau de la position des substituants sur le noyau aromatique initialement.

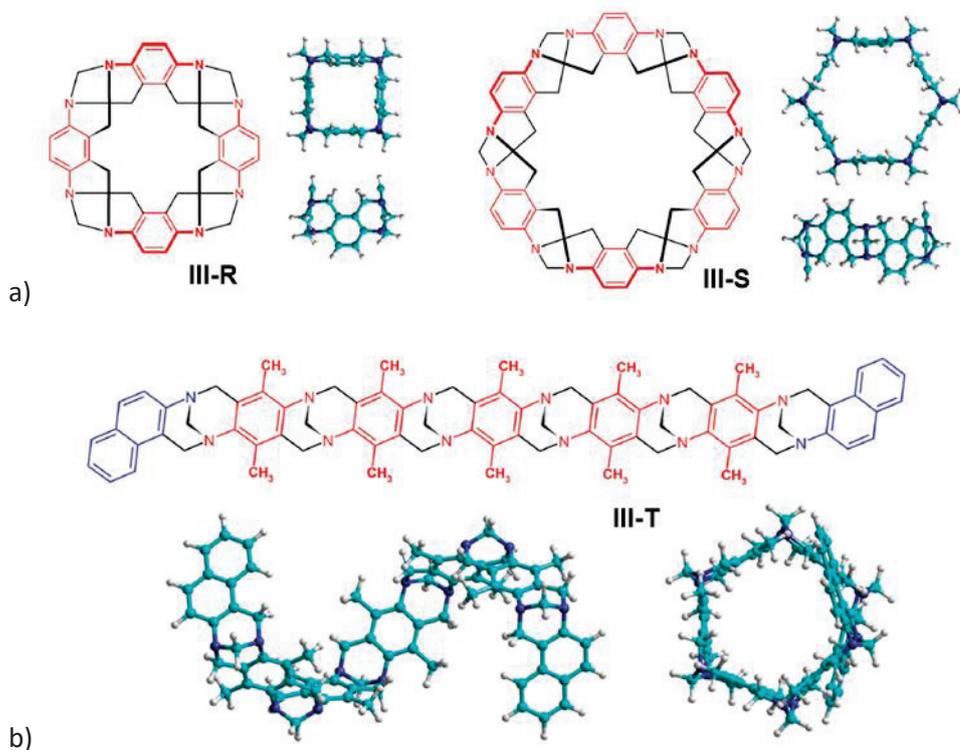


Figure 177 : a) Cyclotétramère et cyclohexamère de bases de Tröger », b) Cyclohexamère linéaire de base de Tröger de géométrie hélicoïdale.

L'analyse après diffraction aux rayons X a montré que le conformère *syn-C* de la base de Tröger **Bis-BT** de la figure 178 se comporte comme une pince moléculaire contrairement au composé *anti-Z*. Des titrations de la **Bis-BT** par le nitrobenzène ou par le tétracyanoéthylène (**TCNB**) ont été menées en spectroscopie UV. Le récepteur **Bis-BT** s'associe avec **TCNB** avec une constante de l'ordre de  $1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  pour la pince *syn-C* et de  $9,0 \text{ M}^{-1}$  pour le composé *anti-Z*. Ces résultats montrent ainsi une sélectivité pour la forme de pince. L'association de la forme *syn* avec TCNB a produit un complexe violet plus intense par rapport au cas de la forme *anti*.<sup>143</sup>

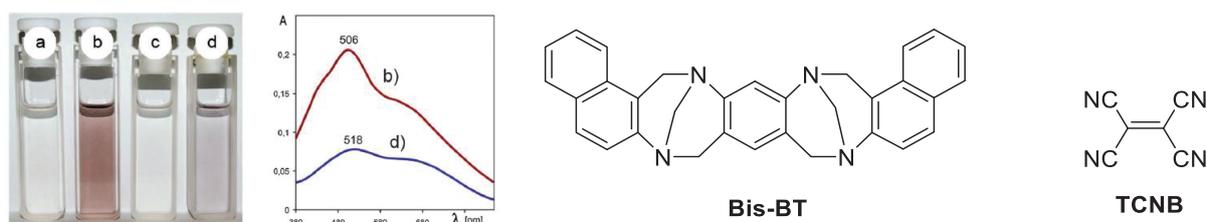


Figure 178 : étude spectroscopique de la complexation des conformères de Bis-BT avec TCNB. a) *syn* Bis-BT, b) *syn* bisBT + TCNB, c) *anti* bis-BT et d) *anti* bis-BT + TCNB

### B) Macrocycles mixtes incluant un motif base de Tröger

Plusieurs dérivés des motifs classiques de la chimie supramoléculaires sont décrits dans la littérature, appelés Trögerophanes. La figure suivante 179a présente un éther couronne comportant un motif base de Tröger **III-U**. Ils sont synthétisés en plusieurs étapes : d'abord formation de la chaîne polyéthylèneglycol entre les deux groupements aromatiques, puis formation du motif base de Tröger. Pour  $n = 0$ , le rendement de la synthèse du macrocycle est de 46% et pour  $n = 1$ , il est de 34%.<sup>144</sup> Pour  $n = 0$ , la taille de la chaîne est optimale ne pas observer de repliement dans la structure, contrairement au cas  $n = 1$  où la chaîne est trop étendue. Le cyclophane **III-V** présenté en figure 179b présente deux unités « base de Tröger » et a été isolé avec un rendement de 45%.<sup>145</sup> Néanmoins, pour ces deux familles de macrocycles, la cavité est d'un diamètre inférieur à 6 Å : ces potentiels récepteurs possèdent donc une cavité de faible volume et une structure trop rigide pour un ajustement induit permettant la reconnaissance moléculaire de petits composés organiques par inclusion.

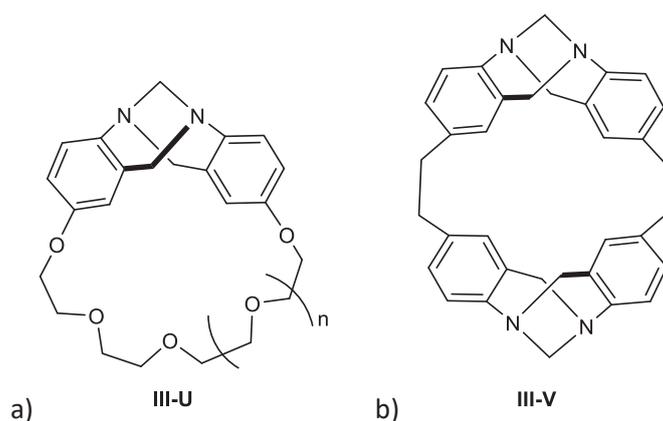
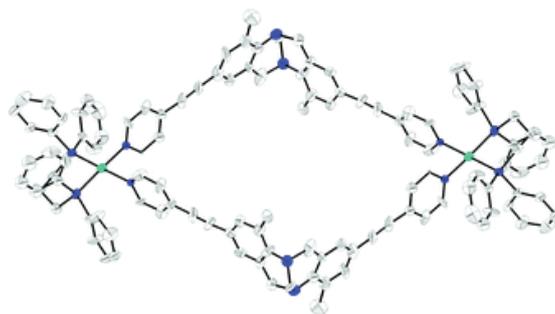


Figure 179 : a) Ether couronne couplé à une base de Tröger, b) cyclophanes de base de Tröger

Arribas et al. ont isolé un métallo-macrocycle **III-W** présentant dans sa structure un motif type « base de Tröger » (figure 180).<sup>146</sup> Le complexe hétérochiral a été obtenu avec un rendement de 66% sous forme diastéréoisomériquement pur et constitue l'un des rares cas d'auto-discrimination

diastéréosélective. Les auteurs ont décrit ce macrocyle comme une sonde fluorescente pour le fullerène.



III-W

Figure 180 : Structure du métallo-macrocyle de platine comprenant deux motifs bases de Tröger III-W. Les atomes d'azotes sont représentés en bleu et le platine en vert. Les contre-anions trifluoacétate ont été omis pour plus de clarté.

L'incorporation de bases de Tröger dans des assemblages hydrosolubles a également été décrite dans la littérature. Les trois macrocycles de la figure 181 ont été présentés comme des hôtes chiraux pour de petites molécules organiques. En effet, le macrocyle III-X est soluble en solution aqueuse grâce aux fonctions ammoniums secondaires des espaceurs aliphatiques. Une constante d'association de  $3,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  a été mesurée dans l'eau deutérée (en tampon DCl-KCl 0,1 M à pD = 1,9) lors de la complexation de l'acide paratoluènesulfonique par ce macrocyle.<sup>147</sup> Le récepteur III-Y présente des groupements carboxylates permettant de complexer des dérivés du cyclohexanol tel que le menthol, le (-)-menthol ( $K_f = 2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) et le (+)-menthol ( $K_f = 2,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>148</sup> Enfin, le cavitand III-Z incorporant dans sa structure des groupements imidazoles pour améliorer la solubilité dans l'eau se lie avec divers phosphates avec des constantes d'association de l'ordre de  $10^2 \text{ M}^{-1}$ .<sup>149</sup>

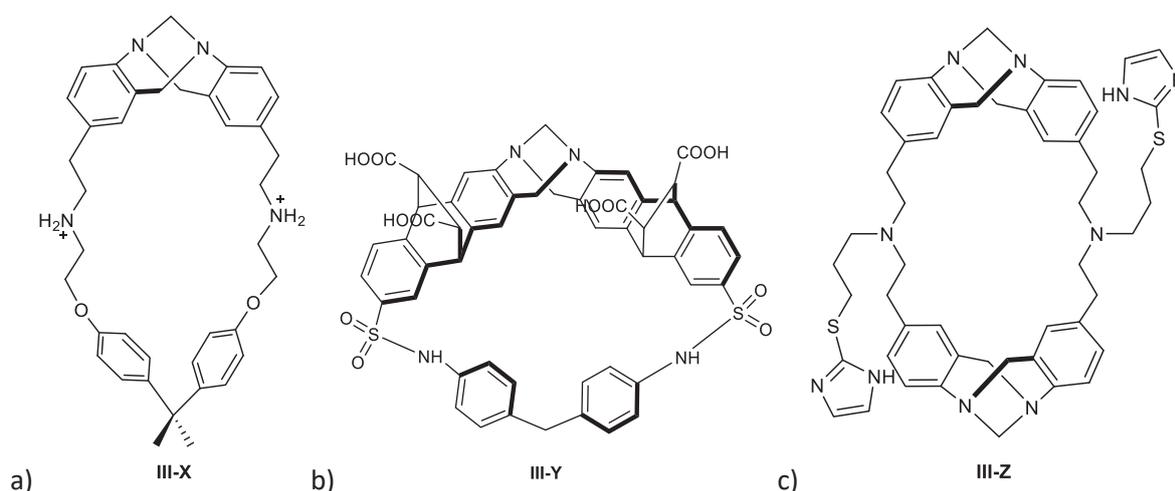


Figure 181 : structures macrocycliques hydrosolubles présentant des motifs « base de Tröger »

Ces cavitands incorporant des motifs de type base de Tröger ont donc, d'après la littérature, de nombreuses applications en chimie supramoléculaire dans la littérature. Dans le cadre de nos travaux, nous recherchons à concevoir des cavitands par chimie combinatoire dynamique à l'aide de briques de type thiophénol.

## II) Les imino-1,5-dithiocines : nouveaux analogues des bases de Tröger

### 1) Présentation générale des dithiocines

#### A) Définition et analyse structurale

Les imino-1,5-dithiocines sont des dérivés soufrés de structures comparables aux bases de Tröger. Une dithiocine est constituée d'un cycle à 8 chaînons contenant deux atomes de soufre et une ou plusieurs insaturations. La figure 182 présente la variété de dithiocines évoquée dans la littérature : on y distingue les 1,2 dithiocines **II-AA** synthétisées incorporant un pont disulfure par rapport aux 1,3-dithiocine **II-AB** ou 1,5-dithiocines (**II-AC**, **II-AD** et **II-AE**), les numéros dans la nomenclature indiquant la position des atomes de deux soufres dans la structure.<sup>150,151</sup> Les imino-1,5-dithiocines présentent une structure similaire aux bases de Tröger en forme de V avec deux cycles aromatiques quasi perpendiculaires. Cette caractéristique se retrouve aussi dans les époxy-1,5-dithiocines **III-AC**. Ces dernières ne peuvent cependant pas être fonctionnalisées sur le pont dû à la présence d'un oxygène.<sup>152,153</sup>

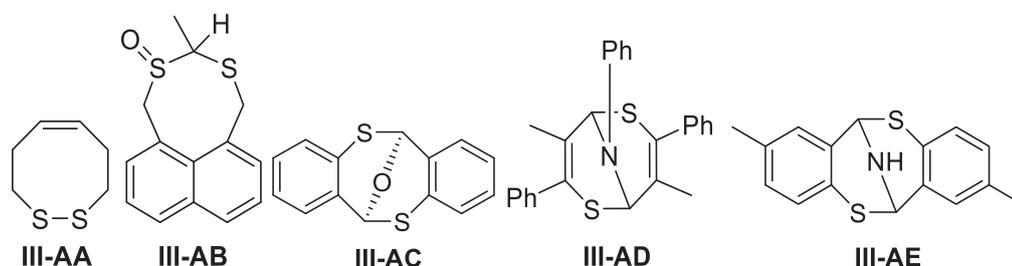


Figure 182 : présentation de diverses dithiocines

Dans la suite de ce manuscrit, seules les imino-1,5-dithiocines seront étudiées et plus particulièrement des iminodibenzo-1,5-dithiocines similaire à **III-AE**. La structure cristallographie de la 6H,12H-6,12-epiminodibenzo[b,f][1,5]dithiocine **III-AF** est présente à la figure 183.<sup>154</sup> La structure possède deux carbones asymétriques et seuls les deux énantiomères (*R,R*) et (*S,S*) peuvent être observés, du fait de la présence du pont azoté qui interdit la formation du diastéréoisomères méso (*S,R*). Les dithiocines sont parfois obtenues de façon inattendue comme sous-produit de réaction, comme par exemple lors de réactions multicomposantes de synthèse de 1,3-benzothiazine-2-thiones.<sup>155</sup>

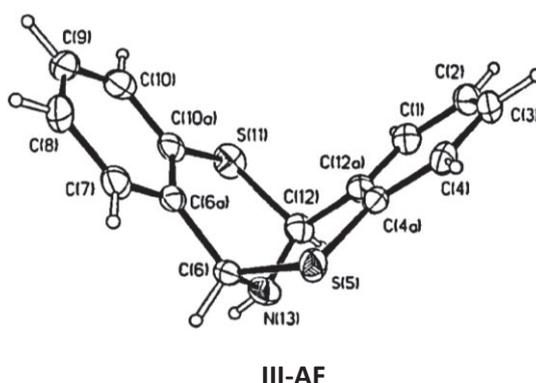


Figure 183 : structure cristallographique de la dithiocine **III-AF**

## B) Synthèse d'imino-1,5-dithiocines et mécanisme

Les différentes voies d'accès aux imino-1,5-dithiocine sont présentées sur la figure 184.

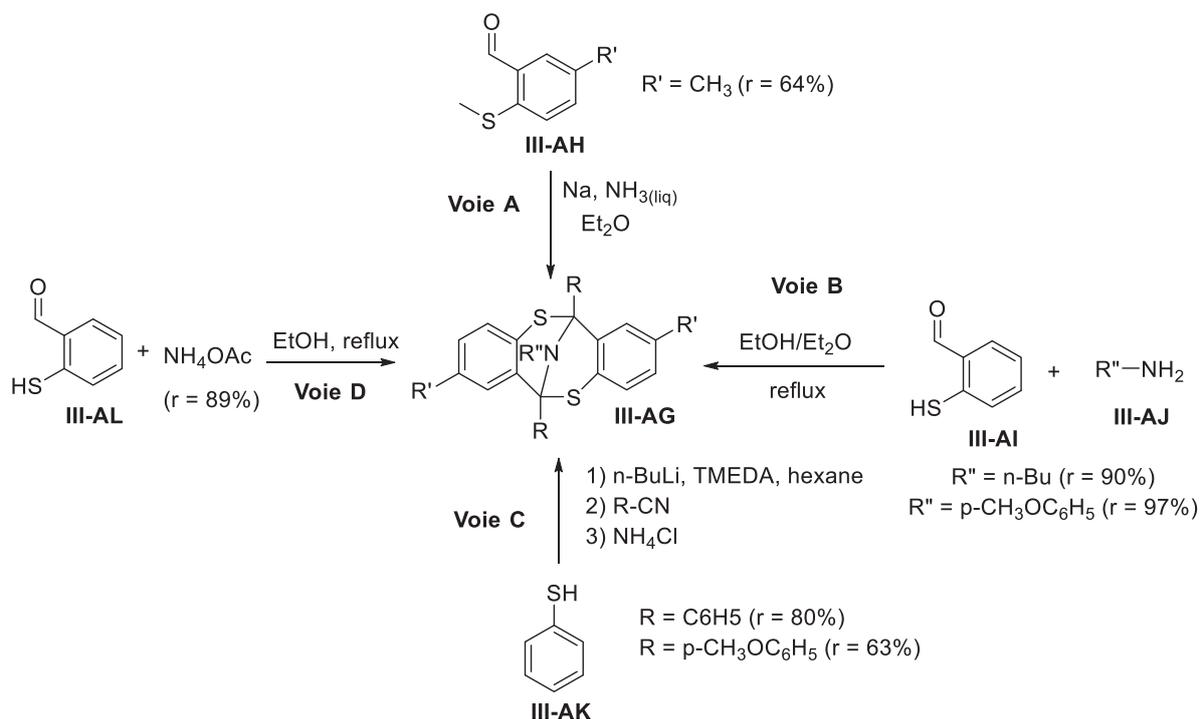


Figure 184 : différentes voies de synthèse de dithiocines.

La voie A est présente la synthèse décrite par Gol'dfarb et coll. qui fut la première synthèse historique conduisant aux imino-1,5-dithiocine **III-AG** publiée en 1966.<sup>156</sup> L'action du sodium dans l'ammoniaque liquide sur le 2-méthylmercaptobenzaldehyde **III-AH** permet sa conversion en dithiocine. La voie B présente la réaction entre le 2-mercaptobenzaldehyde **III-AI** avec différentes amines **III-AJ**, inspiré des découvertes de Corrigan et coll. Ces auteurs ont identifié la formation de dithiocines de façon inattendue lors de la formation de complexe métallique avec de l'acétate de cobalt et de 2-mercaptobenzaldimines N-substitué.<sup>157</sup> D'excellents rendements sont obtenus sans cobalt par cette voie de synthèse, qui donnent accès à des imino-1,5-dithiocines fonctionnalisées sur l'amine du pont. La voie C présente une séquence réactionnelle en 3 étapes à partir du thiophénol **III-AK**.<sup>158</sup> Cette classe de réaction permet de fonctionnaliser les atomes de carbone du cycle à huit chaînons de la dithiocine avec des rendements allant jusqu'à 80%. Enfin, la voie de synthèse D a été présentée avec des réactifs simples, éco-compatible en condition relativement douce. Initialement elle a été effectuée dans le nitrométhane pour être ensuite substitué par l'éthanol. La mise en contact du 2-mercaptobenzaldehyde **III-AL** en présence d'acétate d'ammonium à reflux permet d'accéder à l'imino-1,5-dithiocine associée avec un rendement de 71%.<sup>154</sup> Une optimisation du solvant a été effectuée et le rendement de la réaction s'élève à 89% dans l'éthanol en présence de 1,1 équivalent d'acétate d'ammonium.<sup>159</sup> Il s'agit de conditions relativement douces et le sous-produit formé est une molécule d'eau. On a ainsi une chimie qui s'apparente à la chimie click. Les amines sont facilement accessibles, mais les composés de type mercaptobenzaldéhyde sont rarement commerciaux.

Plusieurs mécanismes ont été proposés à partir des données expérimentales. Pour la voie D, le mécanisme généralement admis est représenté à la figure 185.<sup>154</sup> Une catalyse acide permet une activation électrophile de l'aldéhyde du substrat qui est ici le 2-mercaptobenzaldéhyde **III-AL**. Une

première séquence de condensation permet la conversion de l'aldéhyde en iminium **III-AM**. Une seconde molécule de substrat **III-AL** peut ainsi réagir par une attaque du thiol nucléophile sur l'iminium électrophile pour créer l'intermédiaire **III-AN** avec une première liaison carbone-soufre. Après une étape de prototropie, l'azote de la fonction hémithioaminal de **III-AO** est un assez bon nucléophile pour attaquer le second aldéhyde activé, permettant de former le futur pont azoté entre les atomes de carbones (**III-AP**). Enfin, une nouvelle prototropie intervient, pour menant à une nouvelle fonction imine sur l'intermédiaire **III-AQ**. Le carbone électrophile de l'imine est attaqué par le deuxième atome de soufre pour former, après libération du catalyseur acide, la dithiocine souhaitée **III-AG**.

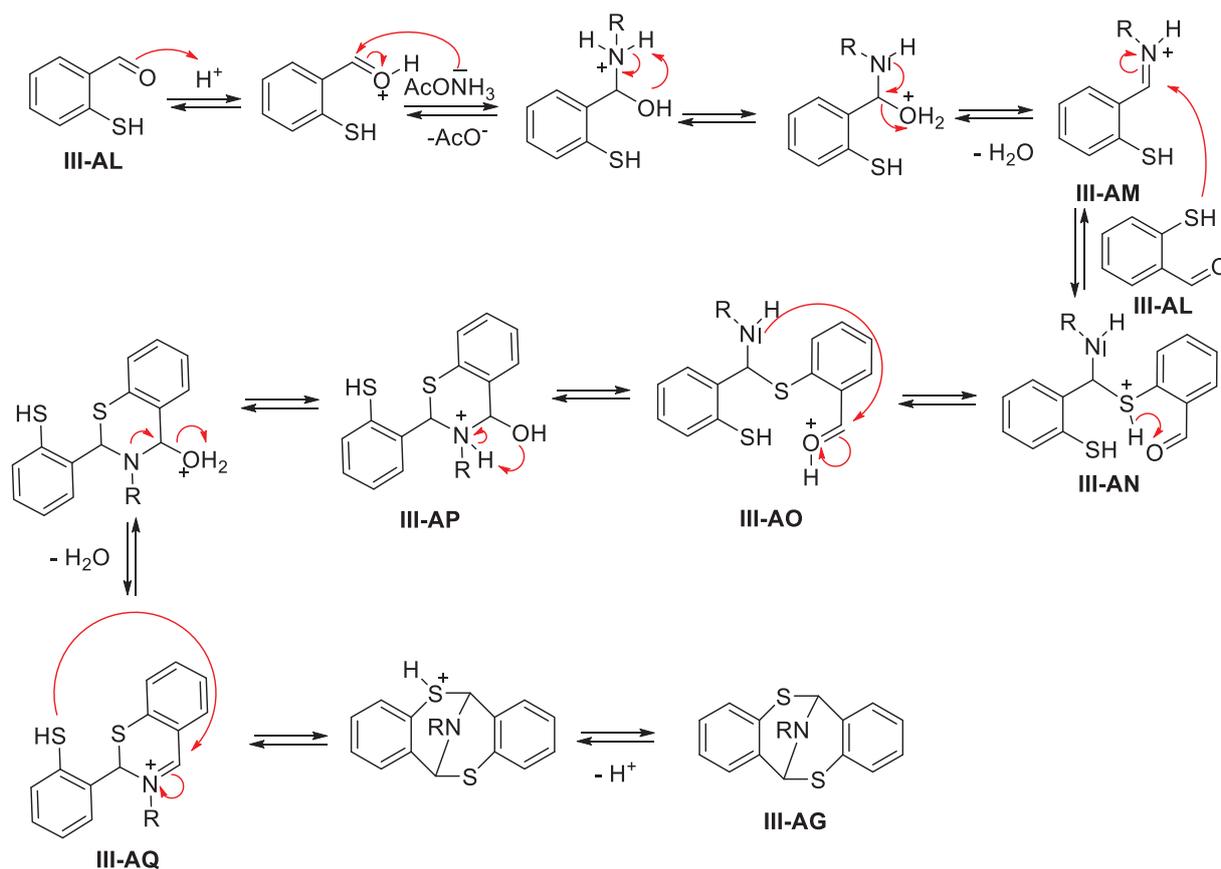
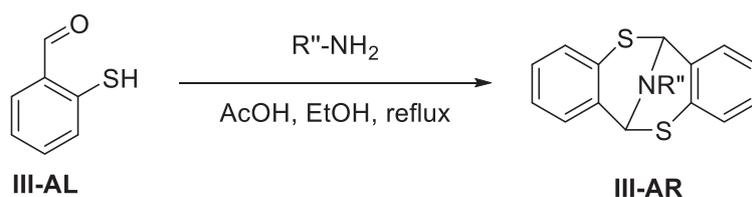


Figure 185 : mécanisme proposé pour la synthèse de **III-AG** par la voie D de la figure 184.<sup>159</sup>

## 2) Fonctionnalisation de dithiocines

### A) Fonctionnalisation du pont azoté

De manière à augmenter la diversité des structures qu'il est possible d'obtenir avec les dithiocines, plusieurs types de fonctionnalisation ont été entreprises en inspirant des méthodes synthétiques développées sur les bases de Tröger. Une source de diversité fonctionnelle peut provenir du choix de l'amine engagée pour former la dithiocine **III-AR** (figure 186). Plusieurs amines monoalkylées ont été utilisées par Still et al. pour synthétiser des dithiocines fonctionnalisées. Ces réactions ont été effectuées dans l'éthanol et l'acide acétique à reflux avec des rendements compris entre 71 et 88%.<sup>159</sup>



Groupement R''	Rendement
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	84%
CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	83%
C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	87%
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	75%
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	88%
CH(CO <sub>2</sub> <sup>t</sup> Bu)CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	71%

Figure 186 : synthèse de dithiocine N-fonctionnalisée

Les acides α-aminés présente une réactivité particulière illustrée à la figure 187. Lors de la condensation du 2-mercaptobenzaldéhyde **III-AL** avec la L-leucine, la dithiocine **III-AT** associée n'est pas celle attendue. Les auteurs observent une réaction de décarboxylation conduisant à la dithiocine **III-AS**. Ce phénomène a également été observé avec la phénylalanine. Ces exemples montrent une limitation pour l'obtention de dithiocines N-α-substituées par des groupements acides carboxyliques.

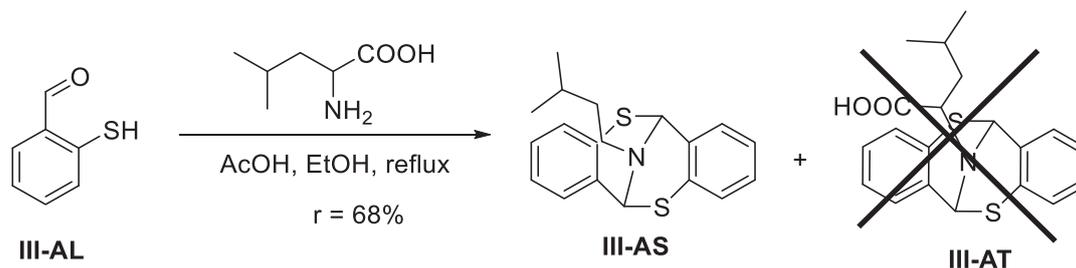


Figure 187 : formation de dithiocine avec réaction de décarboxylation.

Une stratégie alternative est de la post-fonctionnalisation, explorée par ces mêmes auteurs.<sup>160</sup> La réaction avec des chlorures d'acyles n'est à priori pas efficace, puisqu'aucune conversion de la dithiocine de départ n'a été observée. Une méthode de choix, utilise le chloroformate de méthyle avec le carbonate de césium à reflux, et permet d'obtention la dithiocine attendue **III-AU** à partir de la dithiocine **III-AF** avec un rendement de 67% (figure 188).

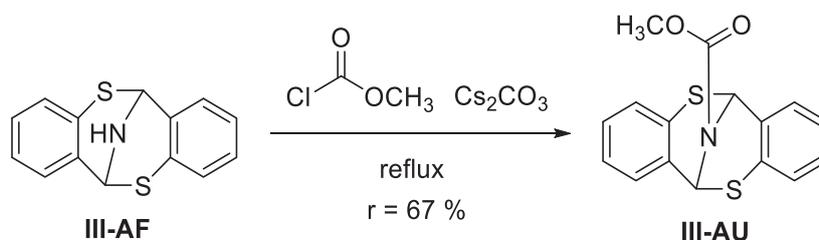


Figure 188 : Post-fonctionnalisation des dithiocines

Ces résultats montrent qu'il est possible de fonctionnaliser les dithiocines, mais aucune réaction d'échange de l'amine, comme celle décrite en figure 189, n'a été observée. Jusqu'ici. Aucune preuve de la réversibilité de la formation de dithiocine n'est ainsi décrite dans la littérature.

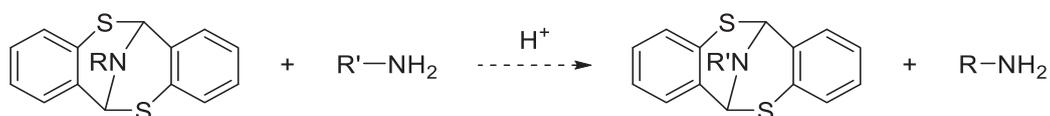


Figure 189 : Principe de la réaction d'échange de l'amine

### B) Fonctionnalisation des noyaux aromatiques

La voie de synthèse A présentée précédemment à la figure 184 montre qu'il est possible de synthétiser des dithiocines portant des groupes fonctionnels sur le cycle aromatique, comme cela est le cas pour les bases de Tröger. Aucun exemple de post-fonctionnalisation n'a été cependant décrit. En effet, seules deux dithiocines (**III-AE** et **III-AV**) sont synthétisées avec d'excellents rendements par une stratégie de pré-fonctionnalisation (figure 190).<sup>159</sup> De nombreux dérivés peuvent être envisagés pour compléter la diversité de structures accessibles pour cette famille de composé.

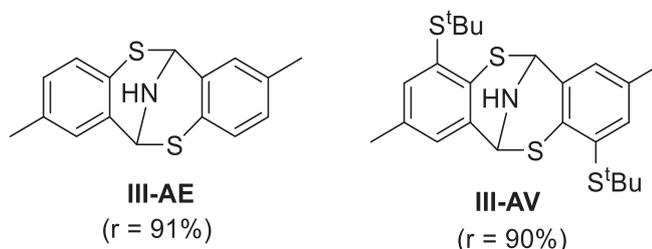


Figure 190 : Dithiocines fonctionnalisées sur le cycle aromatique

Enfin, ces mêmes auteurs ont aussi décrit des assemblages présentant une cavité plus importante par utilisation de substrats dérivés du naphthalène. Ces structures présentées en figure 191 sont obtenues avec d'excellents rendements (**III-AW**, **III-AX** et **III-AY**).

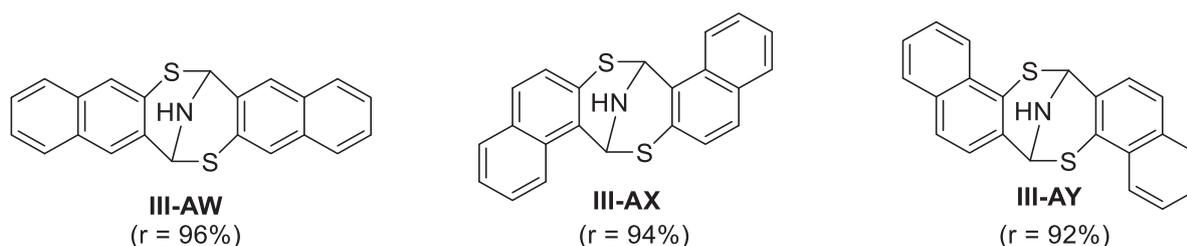


Figure 191 : Dithiocines dinaphtalènes.

En conclusion de cette étude bibliographique, nous avons vu dans un premier temps les bases de Tröger, molécules chirales fonctionnalisées utilisées en reconnaissance moléculaire, ou encore pour leurs propriétés catalytiques ou médicinales. Des analogues soufrés de ces molécules appelés imino-1,5-dithiocines sont de bons candidats à des applications similaires. Des exemples fonctionnalisations des dithiocines ont été décrits, mais aucune des dithiocines résultantes ne présente des groupements hydrosolubles. Aucune preuve de la réversibilité de la formation des liaisons de l'imino-dithiocine n'a été démontré, ou d'un simple échange du pont azoté. Enfin, aucun macrocycle contenant des dithiocines n'a été reportés à ce jour, contrairement aux bases de Tröger.

## Partie B : Vers de nouvelles structures dérivés des dithiocines

### I) Cadre de l'étude

#### 1) Mise en évidence des dithiocines dans le laboratoire

Dans le laboratoire, la première synthèse de dithiocine a été effectuée de façon inattendue. En effet, l'un des objectifs du laboratoire est de synthétiser des briques 1,4-dithiophénol fonctionnalisées pour l'auto-assemblage de macrocycles à l'aide de liaisons covalentes réversibles. Lors de l'imination de la brique **62** en **63**, la réaction de condensation a conduit à un mélange de produits. L'analyse par spectroscopie de masse a montré la présence de l'imine **63** attendue ainsi qu'un sous-produit inattendu **64** présentant un motif type imino-1,5-dithiocine (figure 192).

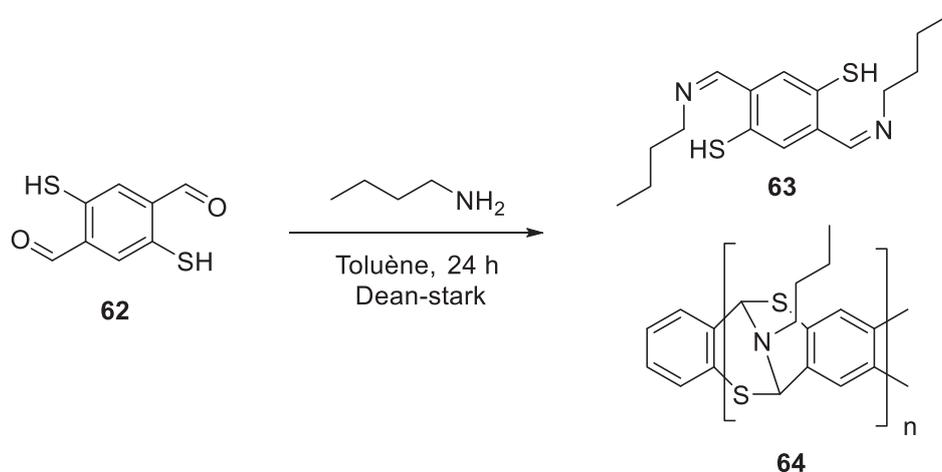


Figure 192 : Mise en évidence de la synthèse d'une dithiocine par réaction de condensation.

#### 2) Travaux antérieurs effectués dans le laboratoire

Le Dr. Jeamet a travaillé dans l'équipe sur le développement d'imino-1,5-dithiocines fonctionnalisées. Trois nouvelles dithiocines ont été obtenues lors de ce travail et sont présentées en figure 193. Elles ont été synthétisées à l'aide d'un substrat aromatique monosubstitué, en présence d'acétate d'ammonium dans l'éthanol à reflux en condition anaérobie. La dithiocine **65** montre la compatibilité du groupement nitro avec les conditions réactionnelles, et les dithiocines **66** et **67** montrent la compatibilité du groupement « o-méthoxy ». Les rendements sont compris entre 19 et 61% et ces résultats montrent l'influence de la position aromatique d'un groupement électrodonneur sur la réactivité.

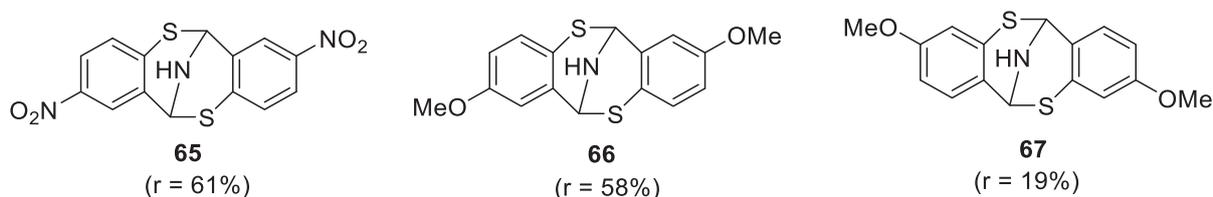


Figure 193 : dithiocines fonctionnalisées sur les positions aromatiques (synthétisée par Dr. Jeamet).

De nouvelles dithiocines ont également été synthétisées par le Dr. Jeamet à partir de différentes amines porteuses de groupements fonctionnels (figure 194). La dithiocine **68** a été synthétisée avec un rendement satisfaisant de 57% tandis que pour les dithiocines **69**, **70**, **71** et **72** les

rendements sont compris entre 30 et 40%. Les dithiocines **68**, **69** et **70** ont été synthétisées dans l'éthanol à reflux en présence d'acide éthanoïque. La synthèse de la dithiocine **71**, à partir de la glycine, donne lieu à une réaction de décarboxylation comme décrite dans la partie bibliographique. Enfin, la synthèse de la dithiocine **72** à l'aide d'un dipeptide du d'acide glutamique (L-Glu-L-Glu-OH) est décrite dans un mélange 75/25 DMF/eau (tampon acétate de sodium) compte tenu de la solubilité des réactifs. La synthèse de cette dithiocine montre la compatibilité des conditions réactionnelles avec des groupements acides carboxyliques. Des structures hydrosolubles sont alors envisageables.

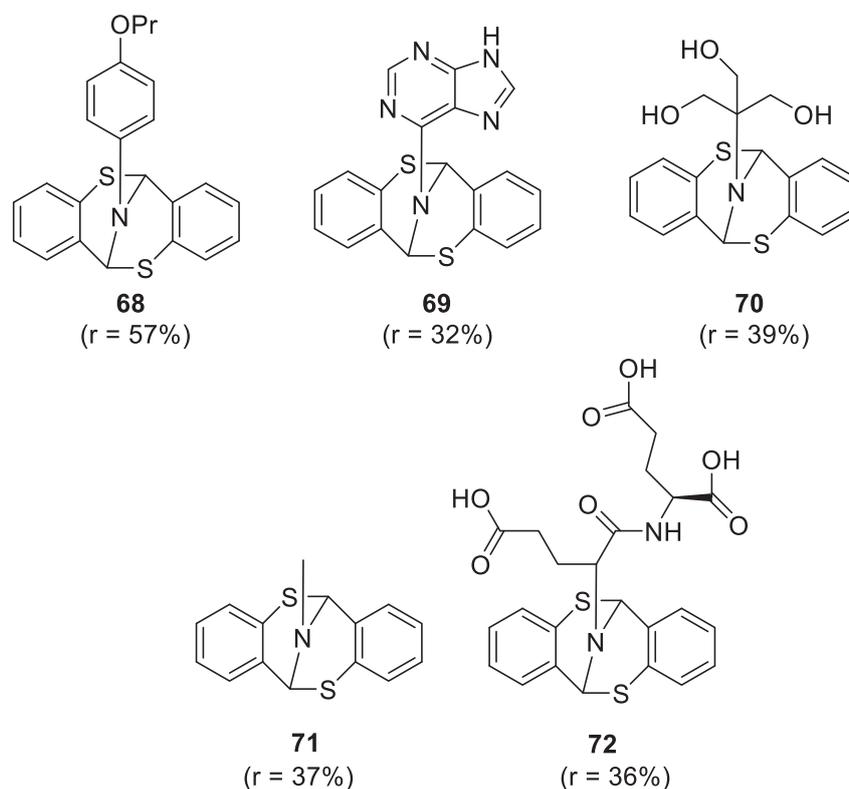


Figure 194 : Dithiocines avec des amines fonctionnalisées synthétisées par Dr. Jeamet.

Enfin, des structures plus complexes ont été isolées, comme des « calixarène-dithiocines » **73** ou encore de structures de type bis-« dithiocine » **74** présentées à la figure 195. Il semble donc à priori envisageable de synthétiser des polydithiocines.

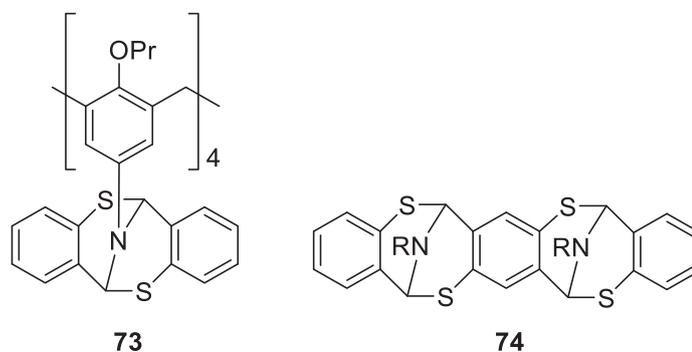


Figure 195 : Edifices présentant des motifs iminodithiocines isolés par Dr. Jeamet : **73** – Calix[4]arène tétra-iminodithiocine et **74** – bis-iminodithiocine.

### 3) Objectifs

A la suite de ces travaux, plusieurs livrables vers la synthèse de polydithiocines par auto-assemblage ont été identifiés :

- Étudier la réversibilité de la formation des dithiocines
- Identifier les précurseurs permettant d'obtenir des dithiocines hydrosolubles.
- Développer de nouveaux macrocycles basés exclusivement ou en partie sur des motifs dithiocines. L'objectif ici sera d'avoir accès à des macrocycles avec des cavités de type ovoïde contrairement aux cavités parallélépipédiques des dyn[4]arènes.
- Étudier leurs propriétés de reconnaissance moléculaire.

## II) Synthèse de nouvelles dithiocines hydrosolubles

### 1) Synthèse du précurseur thiolé

La brique **75** a été de nouveau synthétisée dans le but d'être assemblée avec des amines porteuses de groupements hydrophiles et ainsi obtenir des (poly)dithiocines hydrosolubles. Ces objets pourront également être substrats de réactions d'échange. Deux approches ont été testées.

La première voie réactionnelle est une séquence de trois étapes permettant la conversion du thiol en thiophénol comme évoquée en introduction (figure 196). Ainsi, en partant du 2-hydroxybenzaldéhyde **76**, une réaction de carbamatation à l'aide du chlorure de N,N-diméthylcarbamoyl en milieu basique dans le DMA est effectuée. Le composé **77** est obtenu avec un excellent rendement de 95%. Un réarrangement de Newman-Kwart à 200°C dans le diphenyléther permet ensuite la transformation du composé présentant une fonction O-thiocarbamate **77** en fonction S-thiocarbamate **78**. La présence de groupement aldéhyde électroattracteur favorise le réarrangement de Newman-Kwart ce qui permet d'abaisser la température de réaction. Enfin, une hydrolyse basique mène à la brique souhaitée **75** avec un rendement de 75%. Le rendement global de cette synthèse s'élève à 55% pour 3 étapes.

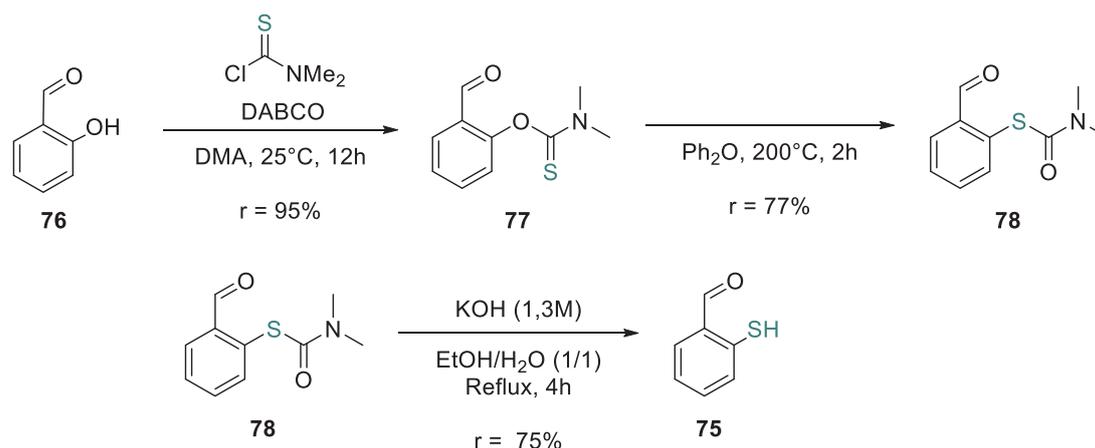


Figure 196 : première voie de synthèse du 2-mercaptobenzaldehyde **75**

La seconde voie de synthèse s'effectue en une étape (figure 197) d'ortholithiation à l'aide du BuLi et du TMEDA à partir du thiophénol **79**.<sup>154</sup> La 1-formylpiperidine est ensuite ajouté comme agent formylant. Le rendement de cette synthèse est de 44% et est donc légèrement inférieur à celui de la stratégie précédente, mais requiert uniquement une étape de synthèse.

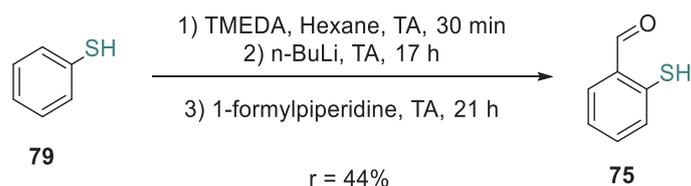


Figure 197 : Synthèse du 2-mercaptobenzaldéhyde **75** par ortholithiation-formylation de **79**

## 2) Synthèse d'amine hydrophile

Les amines utilisées jusqu'ici pour la synthèse de dithiocines ont principalement été des amines commerciales. L'amine **82**, non commercial, a été synthétisée en suivant la procédure de la littérature.<sup>161</sup> Cette amine présente 3 groupements acides carboxyliques, renforçant l'hydrosolubilité (Figure 198).

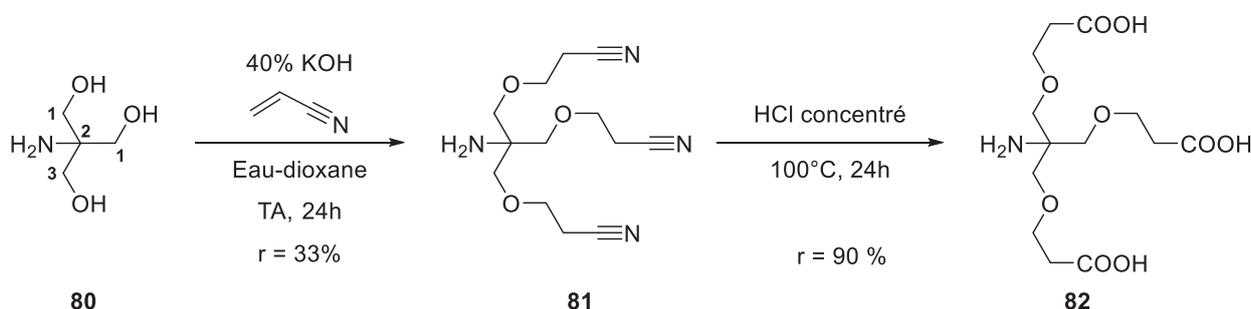


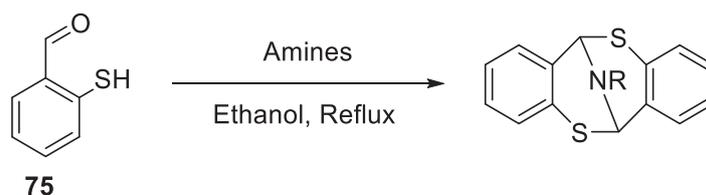
Figure 198 : Synthèse de l'amine **82**

Le 2-amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol **80** est éthérifié par l'acrylonitrile en présence de potasse dans un mélange eau : dioxane (1:1) menant au composé **81** avec un rendement de 33%. Ensuite, une solution concentrée d'acide chlorhydrique à reflux permet l'hydrolyse des groupements nitriles en groupements acides carboxyliques. La molécule **82** est ainsi obtenue avec un rendement de 90% pour un rendement global de 30%.

## 3) Synthèse de dithiocine fonctionnalisée

La synthèse de nouvelles dithiocines fonctionnalisées ont été envisagée à partir de deux équivalents de 2-mercaptobenzaldéhyde **75** et d'un équivalent d'amine. Les diverses expériences sont résumées dans la figure 199.

La dithiocine **85** a été synthétisée à partir du 2-mercaptobenzaldéhyde **75** et de l'acétate d'ammonium **83** avec un rendement de 84%.<sup>154</sup> Cette dithiocine n'est cependant pas soluble dans l'eau. Dans le but de concevoir des dithiocines hydrosolubles, des amines présentant des fonctions acides carboxyliques ont été utilisées comme réactifs : il s'agit des dithiocines **86** et **87** présentées à la figure 199. La condensation du GABA **11** avec le 2-mercaptobenzaldéhyde **75** en présence d'un équivalent d'acide acétique a permis la synthèse de la dithiocine **86** avec un rendement de 72%. Enfin, avec l'amine **82**, la dithiocine attendue **87** n'a pas été obtenue. L'analyse du brut réactionnel en RMN et en spectrométrie de masse indique la formation d'une autre espèce : sa structure n'a cependant pas été encore élucidée. Le spectre RMN montre la disparition de l'aldéhyde, la présence de signaux aromatique ainsi qu'une modification des déplacements chimiques des protons de **82**.



Amine	Conditions réactionnelles	Structure visée	Structure isolée et rendement
NH <sub>4</sub> OAc <b>83</b>	EtOH Reflux, 3 heures	 <b>85</b>	<b>85</b> : 84%
H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH <b>11</b>	EtOH, AcOH, Reflux, 3 heures	 <b>86</b>	<b>86</b> : 72 %
 <b>82</b>	EtOH, AcOH, Reflux, 3 heures	 <b>87</b>	Produit non identifié, pic m/z = 378.1 ne correspond pas à <b>87</b> .

Figure 199 : Synthèse de dithiocines fonctionnalisées sur l'amine.

#### 4) Etude de l'échange de l'amine sur les dithiocines

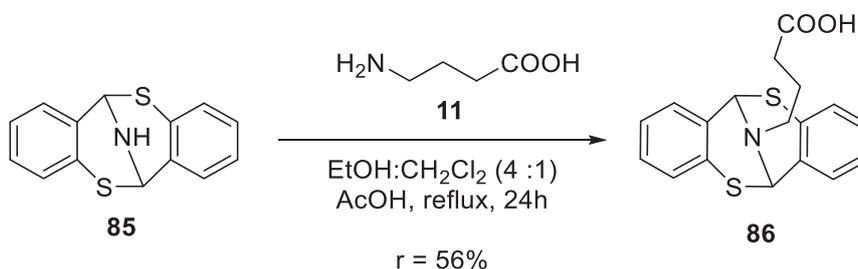


Figure 200 : Réaction d'échange du pont azoté.

Nous avons voulu déterminer si l'échange du pont azoté était réalisable ou non. Pour cela, une réaction d'échange a été étudiée à partir de la dithiocine **85** en présence de l'amine **11** pour former **86** (figure 200). **85** a été solubilisé dans un mélange éthanol-dichlorométhane et chauffé à reflux pendant 24 heures en présence du GABA **11**. Après 24 heures, le composé **86** est isolé avec un rendement de 56%, qui est inférieur au rendement obtenu lors de la synthèse à partir du 2-mercaptobenzaldéhyde **75**. Le spectre RMN correspondant aux sous-produits ne présente pas de trace de **85**, et s'apparente à

des produits de dégradation thermique. Néanmoins, ce résultat montre qu'il est possible, en partant d'une dithiocine déjà formée d'échanger l'amine pontante. Pour interpréter cette réaction, nous proposons un mécanisme d'ouverture du pont en milieu acide, présenté en figure 201. Dans le but de pouvoir allier synthèse de dithiocines et chimie combinatoire dynamique, il faudrait s'assurer dans un premier temps du caractère réversible de cet échange.

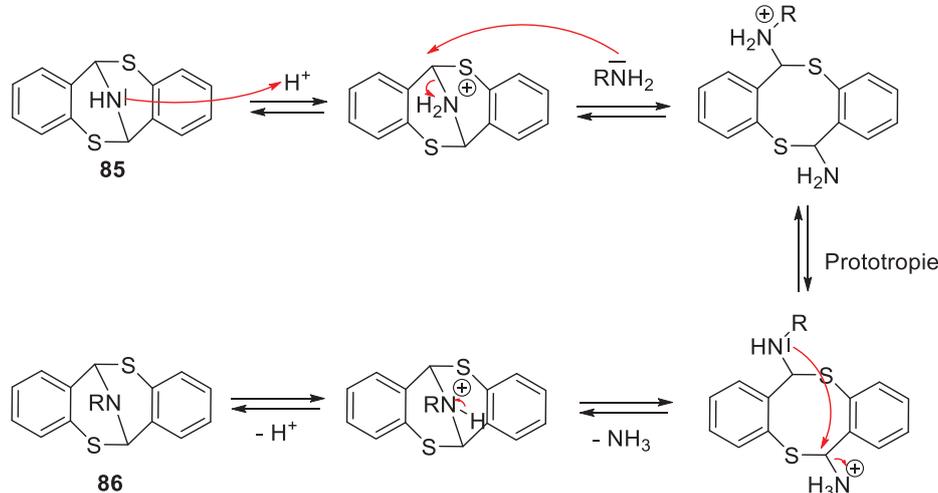


Figure 201 : proposition de mécanisme pour la réaction d'échange de l'amine

### III) Synthèse des précurseurs de polydithiocines

L'objectif principal de cette partie est donc de synthétiser des nouveaux précurseurs de polydithiocines.

#### 1) Précurseurs de polydithiocines macrocycliques

##### A) Synthèse de dithiophénol diformylés

La figure 202 présente les briques 1,4-dithiophénol **62** et 1,3-dithiophénol envisagées **88** pour la conception de polydithiocines macrocycliques.

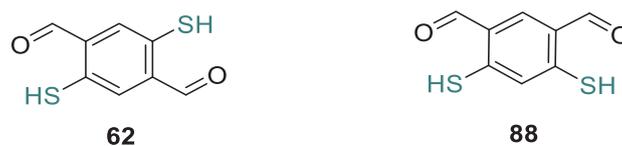


Figure 202 : Structure des précurseurs **62** et **88** de polydithiocines.

Pr. Leclaire a modélisé les structures oligomériques qu'il était a priori possible d'obtenir à l'issue de l'assemblage des briques **62** et **88** avec l'acétate d'ammonium **83**. Ces modélisations sont présentées en figure 203. La figure 203a représente l'assemblage issu de la brique **62** avec **83**. Cette brique semble conduire à une structure hélicoïdale due à l'orientation des groupements rigides dans les monomères. La figure 203b présente la structure issue la réaction entre la brique **88** et **83** qui est un homocyclohexamère. Enfin la figure 203c présente la structure issue de la réaction entre les briques **62**, **88** et **83** : la structure résultante est un hétérocyclotetramère alterné. On remarque sur ce macrocycle une alternance des briques **62** et **88** dans la structure. Ainsi, les macrocycles étudiés semblent posséder une cavité de géométrie ovoïde, différente de celles des dynarènes. De plus, contrairement aux dynarènes, ces macrocycliques présenteraient des substituants équatoriaux, et non

axiaux contrairement aux dynarènes. Ces objets sont un exemple parmi le champ de possibilité pour lesquels aucune contrainte ou défaut géométrique n'est détecté.

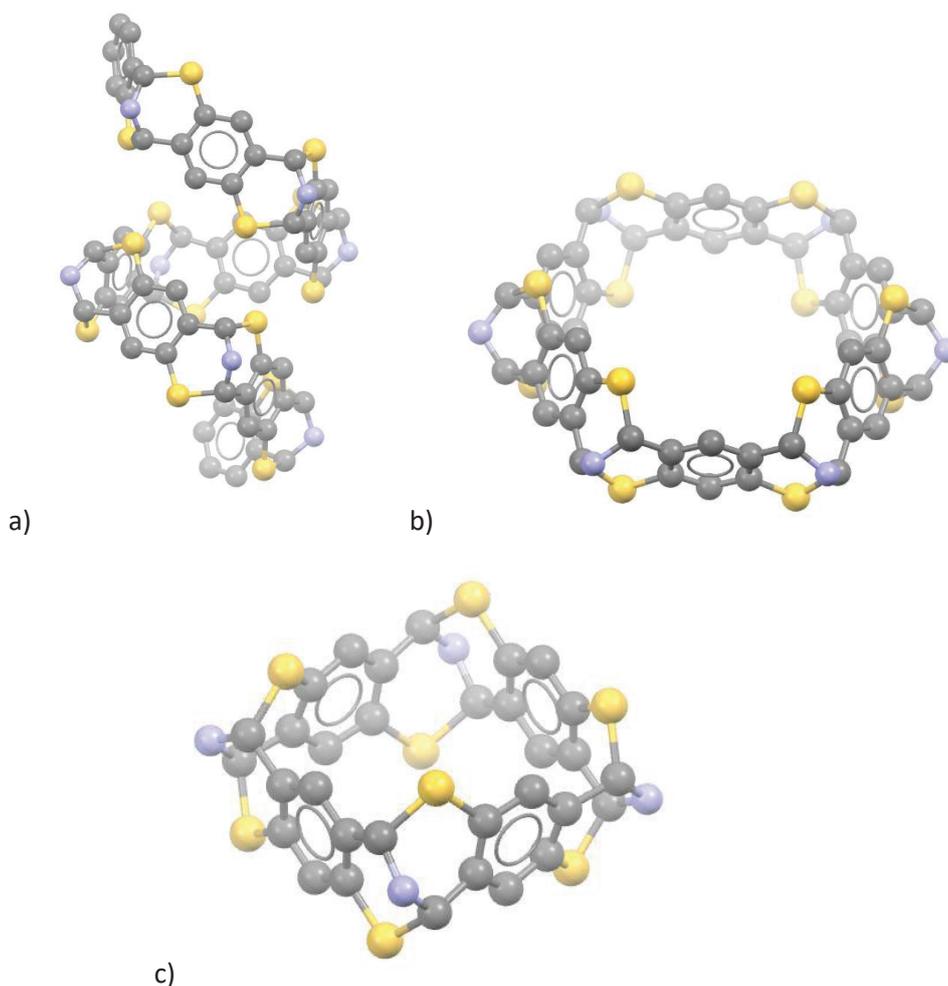


Figure 203 : Modélisation effectuée sur Spartan par Pr. Leclaire des différentes polydithiocines synthétisables à partir des briques **62** et **88**. (Calcul semi-empirique AM1 en phase gaz).

Ainsi, les briques **62** et **88** sont de bons candidats pour la synthèse de polydithiocines. La brique **62** a déjà été décrite par le Dr. Dumartin dans le laboratoire. Nous nous sommes donc focalisés sur la brique **88**. Une analyse rétrosynthétique est proposée à la figure 204. La stratégie adoptée consiste, en partant du 1,3-résorcinol **89**, à formyler le cycle aromatique en position 4 et 6 pour obtenir **93**. Ensuite, la stratégie habituelle de conversion des phénols en thiophénol doit être appliquée pour obtenir la brique souhaitée **88**.

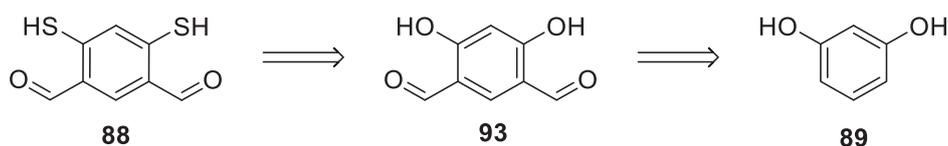


Figure 204 : analyse rétrosynthétique pour la synthèse de la brique **88**

La séquence réactionnelle de synthèse de la brique **88** à partir de la brique **89** est présentée à la figure 205.

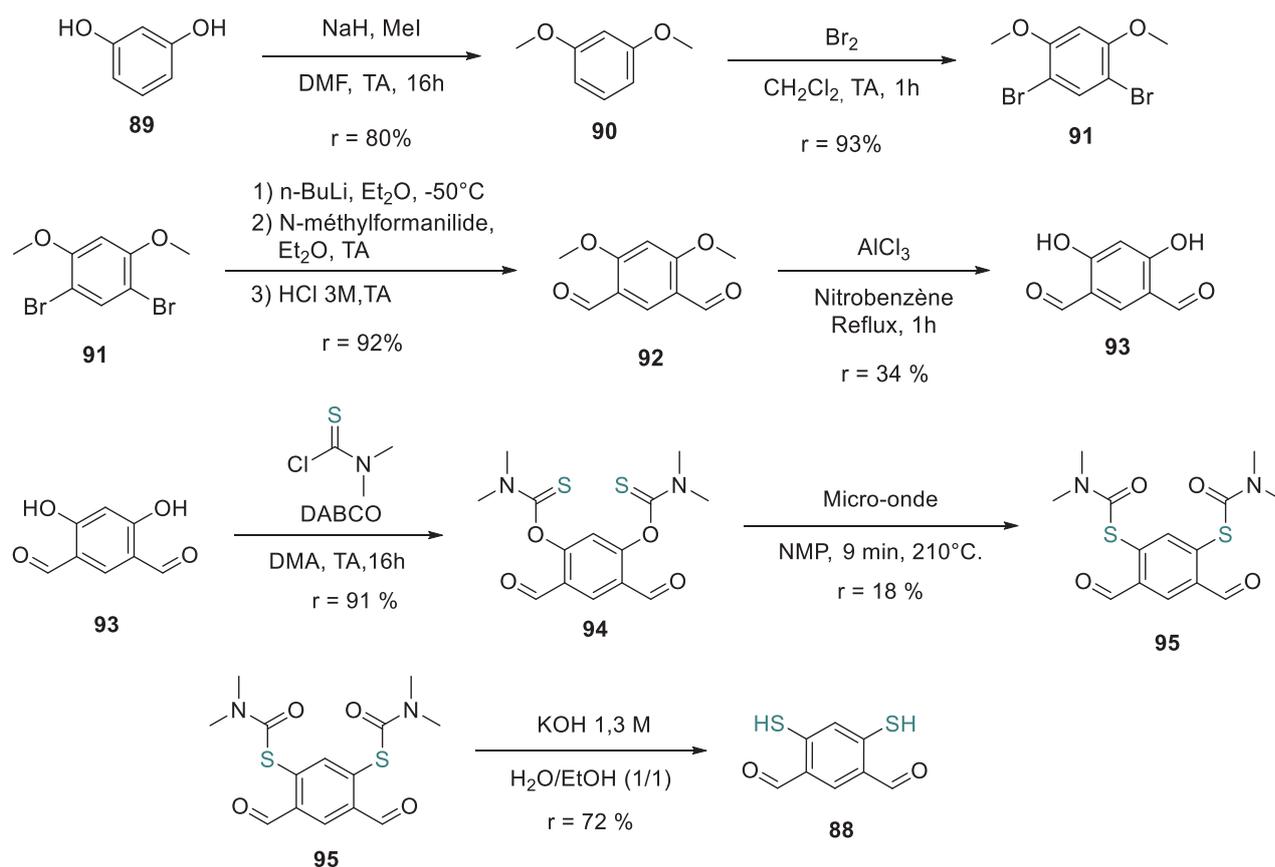


Figure 205 : **88** Conversion du 1,3-résorcinol **89** en **88**

La conversion de **89** à **93** avait déjà été décrite dans la littérature.<sup>162</sup> Cette première étape de la synthèse consiste à méthyler les groupements phénols du résorcinol **89**. Le 1,3-diméthoxybenzène **90** est obtenu avec un rendement de 80%. Ensuite, une réaction de dibromation aromatique est effectuée à l'aide du dibrome Br<sub>2</sub>. La régiosélectivité de cette réaction conduit au composé **91** avec excellent rendement de 93%. Ensuite, la réaction de formylation du composé **91** en **92** a été effectuée. Le DMF testé comme agent formylant n'a pas permis l'observation du composé **92**, mais ré-obtention du composé **90** : la lithiation semble avoir lieu, mais pas la formylation (l'intermédiaire dilithié a été hydrolysé). Le N-méthylformanilide s'avère être un meilleur agent formylant et a permis la synthèse de **92** avec un excellent rendement de 92%. La réaction de déprotection des groupements protecteurs des phénols. Une première série de conditions réactionnelles a été testée à l'aide du tribromure de bore BBr<sub>3</sub>. Malgré une tentative d'optimisation de la température et du temps de réaction, le produit **93** n'a pas été observé : on observe en spectrométrie de masse le produit monoprotégé et/ou des produits de dégradation. Les conditions décrites dans la littérature ont finalement été appliquées : après 1 heure à reflux dans le nitrobenzène en présence du trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub>, **93** a été obtenu avec un rendement de 34%.<sup>163</sup> La conversion de **93** en **88** n'a pas été décrite dans la littérature. **93** est converti en **94** par une réaction de carbamatation avec un rendement de 91%. La réaction la plus délicate de cette synthèse est le réarrangement de Newman-Kwart. En effet, la conversion de **94** en **95** a été tentée par voie thermique dans le diphényléther à 200°C dans un premier temps. Seuls des produits de dégradation thermique ont été observés ainsi que des traces du réactif. Lors de la synthèse de la brique **62**, seule l'activation par micro-ondes s'est avérée être efficace pour permettre le réarrangement de Newman Kwart. Parmi les conditions testées, un chauffage à 210°C pendant 9 minutes a conduit au meilleur rendement (18%). Cette faible valeur s'explique par la présence de sous-

produits (réactif, produits de conversion partielle et produits de dégradation thermique). Enfin, l'hydrolyse basique des fonctions S-thiocarbamate de **95** a été effectuée à l'aide de l'hydroxyde de potassium afin d'obtenir la brique **88** avec un rendement de 72%. Le rendement global de cette synthèse est de 2,7% pour 7 étapes de synthèse.

## B) Applications

### a) Applications pour l'élaboration de dérivés des dynarènes

Dans un premier temps, des tentatives de synthèse d'oligomérisation de la brique 1,3-dithiophénol **88** en dynarène ont été entreprises. La brique **88** peut être solubilisée en milieu aqueux à un pH supérieur à 6,2. Différentes chimiothèques ont été générées à pH = 7,4 avec les briques **4**, **60** et **5** utilisées dans les chapitres précédents. Les conditions réactionnelles et l'identité des espèces détectées par spectrométrie de masse après 72 heures d'incubation sont résumées au tableau 21 et à la figure 206. Aucune quantification n'a été effectuée : de manière à obtenir une quantification, ces manipulations doivent être à nouveau entreprise en HPLC.

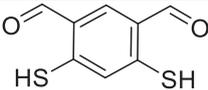
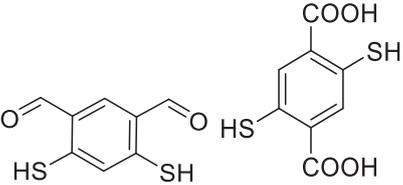
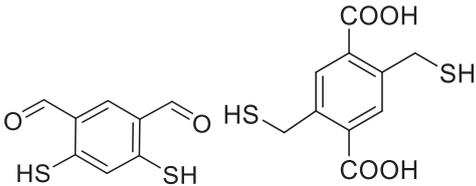
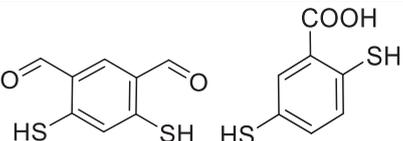
Précurseur de la chimiothèque	Espèces identifiées après 72 heures d'incubation en milieux aqueux aérobie. Spectrométrie : ESI (+) ou ESI (-).
 <p style="text-align: center;"><b>88</b></p>	Identification de l'espèce <b>88</b> n'ayant pas réagi
 <p style="text-align: center;"><b>88</b>                      <b>4</b></p>	Identification des espèces : <b>88</b> , <b>96</b> , <b>4<sub>3</sub></b> et <b>4<sub>4</sub></b> .
 <p style="text-align: center;"><b>88</b>                      <b>60</b></p>	Identification des espèces : <b>88</b> , <b>97</b> , <b>98</b> , <b>99</b> , <b>60<sub>3</sub></b> et <b>60<sub>4</sub></b>
 <p style="text-align: center;"><b>88</b>                      <b>5</b></p>	Identification des espèces : <b>88</b> <b>5<sub>3</sub></b> <b>5<sub>4</sub></b>

Tableau 21 : Chimiothèques effectuées à l'aide de la brique **88**

- Une première chimiothèque contenant la brique **88** seule a été effectuée. Seule cette brique **88** est détectée à 72 heures ce qui laisse supposer une cinétique d'oxydation très lente.
- Face à cette inertie, une seconde chimiothèque a été générée à partir des briques **88** et la brique **4**. Seul un hétérotrimère mixte **96** (ou **4<sub>2</sub>88<sub>1</sub>**) a été identifié. On remarque aussi la

formation des dynarènes **4**<sub>3</sub> et **4**<sub>4</sub> que nous avons étudiés dans le premier chapitre et encore du monomère **88** en solution.

- Une troisième chimiothèque a été étudiée entre la brique **89** et la brique **60**. De nombreuses espèces mixtes ont été identifiées dont un hétérodimère **97** (ou **60**<sub>1</sub>**88**<sub>1</sub>), un hétérotétramère **98** (ou **60**<sub>2</sub>**88**<sub>2</sub>), ainsi qu'un hétérotétramère **99** (ou **60**<sub>3</sub>**88**<sub>1</sub>). L'homotrimère **60**<sub>3</sub> et l'homotétramère **60**<sub>4</sub> ont aussi été identifiés.
- Une quatrième chimiothèque mettant en jeu la brique **5** et la brique **88**. Dans ce cas, aucune espèce mixte n'a été identifiée, seul le trimère **5**<sub>3</sub>, le tétramère **5**<sub>4</sub> et la brique **88** n'ayant pas réagi sont observés en solution après 72 heures, suggérant un phénomène de discrimination spontanée (« self-sorting »).

Ainsi, l'étude de ces diverses chimiothèques révèle a priori une faible réactivité de la brique **88** seule vis-à-vis de l'oxydation aérobie et indique la possibilité de générer des hétérodynarènes à l'aide de briques p-dihiophénols ortho substituée. Ces macrocycles possèdent en particulier des fonctions aldéhydes qui peuvent faire l'objet de post-fonctionnalisation avec des partenaires solubles ou supportés.

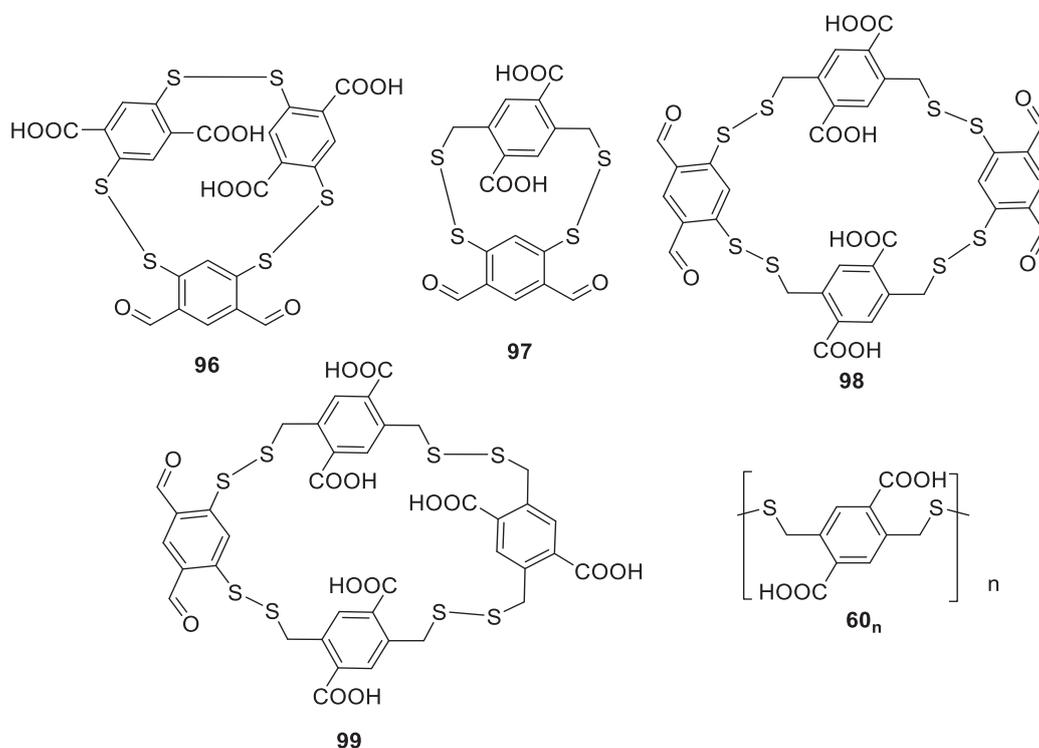


Figure 206 : Représentation des cyclophanes détectés dans des chimiothèques préparées selon les conditions décrites au tableau 21.

#### b) Applications pour l'élaboration polydithiocine

Le second objectif synthétique visé à partir de la brique **88** a été de synthétiser des polydithiocines **100** (figure 207). Un équivalent de brique **88** et un équivalent d'acétate d'ammonium ont été mélangés dans l'éthanol à reflux. Plusieurs espèces sont présentes après 24 heures de réactions d'après le spectre RMN <sup>1</sup>H, sur lequel on identifie des signaux correspondant à des protons d'aldéhydes, mais aussi des signaux dans la région 5-5,5 ppm correspondant aux protons des fonctions hémithioaminal. L'analyse en spectrométrie de masse montre la présence de deux espèces : il s'agit

des espèces **101** et **102** dont seuls deux isomères sont représentés en figure 208. L'hétérotétramère **101** présente deux motifs dithiocines et deux ponts disulfures, l'hétéropentamère **102** est constitué de trois motifs dithiocines et deux ponts disulfures.

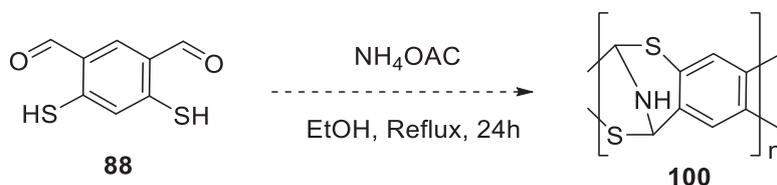


Figure 207 : Conditions opératoires pour la synthèse de polydithiocines

La présence de ponts disulfures indique qu'une exposition à l'oxygène a dû avoir lieu. Néanmoins, la formation de nouveaux macrocycles présentant des motifs dithiocines est encourageante. Dans le cas de la structure **102**, un motif bis-dithiocine est produit. Ces résultats expérimentaux indiquent a priori que les cinétiques des réactions de formation des motifs dithiocines et des ponts disulfures sont comparables.

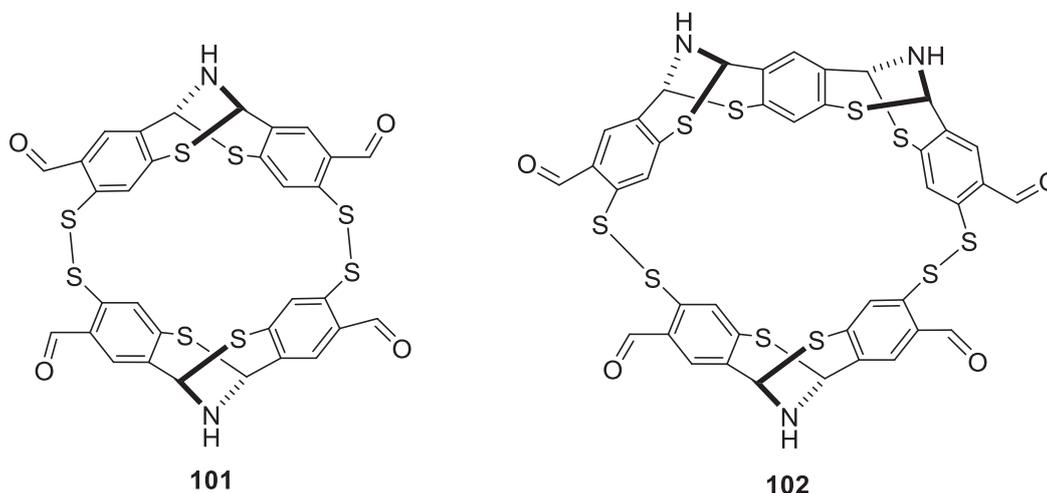


Figure 208 : structures des macrocycles identifiés présentant des dithiocines et disulfures

Dans l'optique de valoriser ces structures combinant deux classes de liaisons formées spontanément en milieu aqueux, nous avons synthétisé des analogues de la brique **88** équipés d'un seul groupement aldéhyde.

## 2) Précurseurs de poly-dithiocines disulfures

Dans le but de synthétiser de nouveaux macrocycles présentant des motifs dithiocines et disulfure, deux nouveaux précurseurs ont été envisagés. Il s'agit des briques **103** et **104** de la figure 209. La brique **103** est un para-dithiophénol alors que la brique **104** est un méta-dithiophénol.



Figure 209 : structures des précurseurs **103** et **104**.

La synthèse de la brique de type 1,4-dithiophénol **103** se déroule en 4 étapes à partir du 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde **105** (figure 210). Le composé **105** subit une déprotection du groupement méthoxy à l'aide de  $\text{BBr}_3$  dans le dichlorométhane à température ambiante pour conduire au 2,5-dihydroxybenzaldehyde **106** avec un rendement de 54%. Ce composé subit une conversion de ses groupements phénols en groupement O-thiocarbamate. Le composé **107** est obtenu avec un rendement de 69%. Un réarrangement de Newman-Kwart a été conduit à  $200^\circ\text{C}$  dans le diphenyléther sur le composé **107** dans le but de le convertir en **108**. Le produit **108** a été isolé avec un rendement de 24%. Le produit ayant subi un seul réarrangement (produit **109a** ou **109b**, figure 211) a été isolé après 2h de réaction à  $200^\circ\text{C}$ . Des tentatives d'optimisation des conditions réactionnelles ont conduit à des rendements plus faibles. Enfin, la conversion de **108** en **109** est effectuée via une réaction déprotection des thiols en milieu basique. Après 3 heures de réaction, la réaction a conduit à la formation d'un produit ayant subi une mono-déprotection (produit **110a** ou **110b**, figure 212). Ce produit a été mis à nouveau en contact avec l'hydroxyde de potassium, mais le produit **96** n'a pas été isolé. Un mélange de produit est observé en RMN et en masse, mais n'a pas pu être identifié. Aucune trace du réactif n'est présente en fin de réaction.

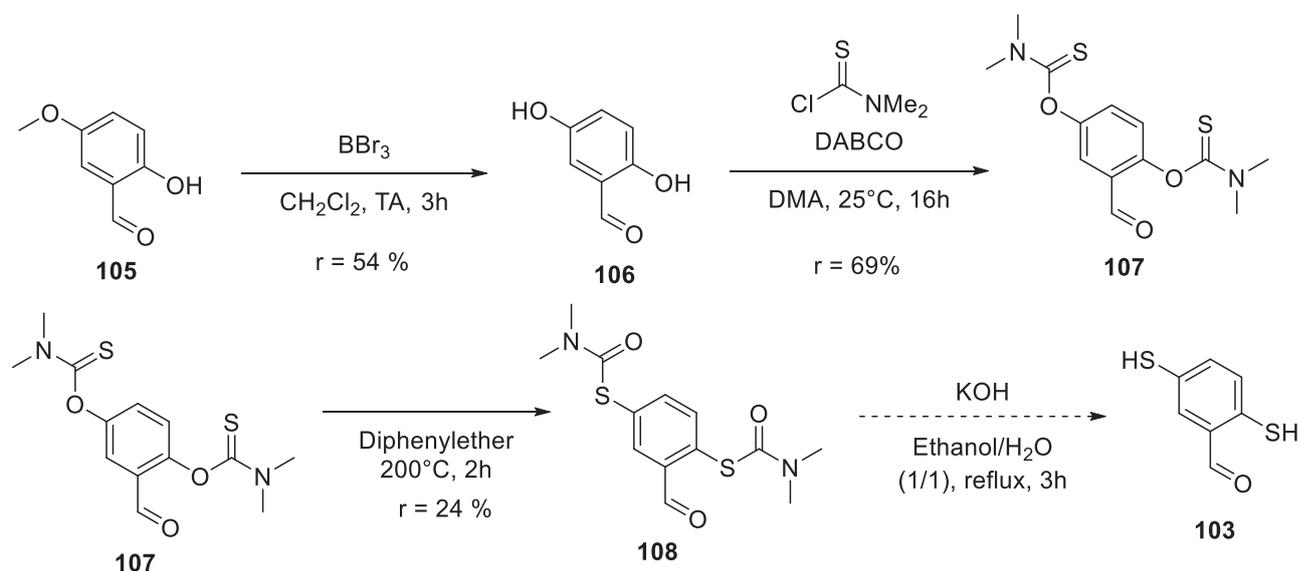


Figure 210 : Séquence réactionnelle pour la conversion de **105** en **103**

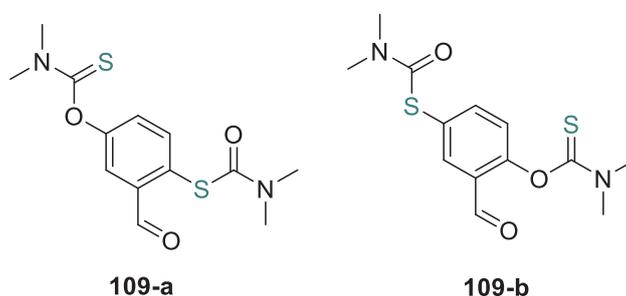


Figure 211 : Produits ayant subi une seule réaction de réarrangement **109-a** et **109-b**

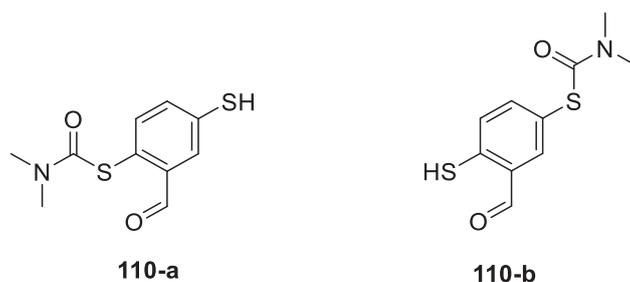


Figure 212 : Produits **110-a** et **110-b** issus d'une seule réaction d'hydrolyse

La synthèse de brique 1,3-dithiophénol **104** est présentée à la figure 213. La séquence réactionnelle envisagée consiste à convertir les phénols du 2,4-dihydroxybenzaldehyde **111** en thiophénol. **111** a donc subi une thiocarbamatation à l'aide des conditions classiquement appliquées. L'intermédiaire **112** a été obtenu avec un rendement de 76%. Ensuite, **112** subit un réarrangement de Newman-Kwart à 215°C dans le diphenylether pour former le composé **113**. Un faible rendement (10%) a été obtenu : ce score peut vraisemblablement être amélioré notamment sur le temps et la température de chauffage. En effet, des produits de dégradations sont observés, ainsi que le produit **114-a** ou **114-b** présentant une seule fonction ayant subi un réarrangement (figure 214). Par activation micro-onde ou par activation thermique sans solvant à 210°C, seule de la dégradation est observée. Enfin, l'hydrolyse des groupements S-thiocarbamate de **113** permet d'obtenir le dithiophénol **104** avec un rendement de 72%. Le rendement global est de 5% pour 3 étapes.

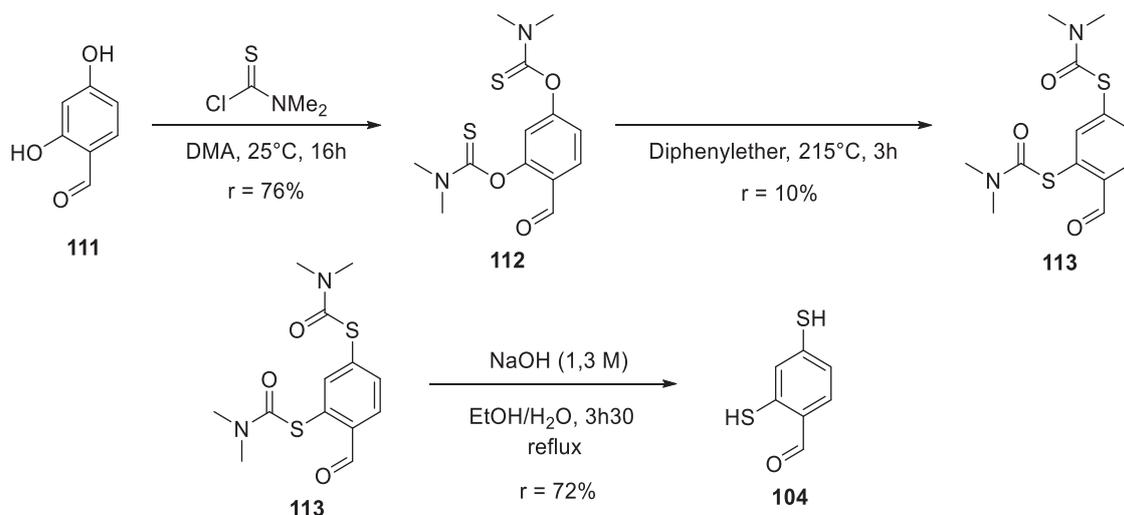


Figure 213 : Séquence réactionnelle menant au composé **96**

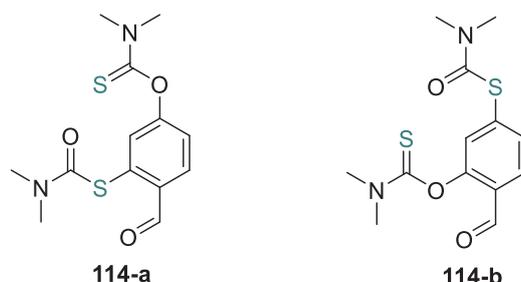


Figure 214 : Structures des isomères **114-a** et **114-b** observés lors du réarrangement de Newman-Kwart de l'intermédiaire **112**.

L'intérêt de ces deux briques réside dans la présence des fonctions nécessaires à la formation de pont disulfure et de dithiocine. En effet, il est envisagé dans un premier temps de mettre en réaction ces briques en milieu anaérobie, ce qui permettra la formation du motif dithiocine en inhibant celle des disulfures. Puis, l'introduction d'oxygène permettra alors la formation de disulfure. Cette stratégie de synthèse n'a pas encore été testée à ce jour.

### 3) Précurseurs de polydithiocines présentant des unités biphenyles

Une nouvelle brique **115**, présentée à la figure 215 a également été envisagée. Cette brique moléculaire combine sur un noyau biphenyle, les fonctions thiols et aldéhydes nécessaires à l'obtention des polydithiocines. L'avantage du noyau biphenyle est de permettre, via la libre rotation de la liaison entre les deux cycles aromatique un ajustement conformationnel favorable à la macrocyclisation.

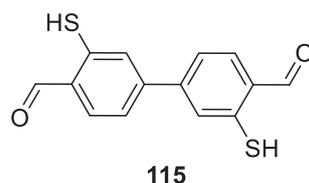


Figure 215 : structure de la brique **115**

L'analyse rétrosynthétique, présentée à la figure 216, a été effectuée à partir du précurseur 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde **116**. Une réaction de couplage sera envisagée dans un premier temps dans le but de créer l'axe biphenyle. Ensuite, la stratégie classique de la conversion des phénols en thiophénols sera appliquée.

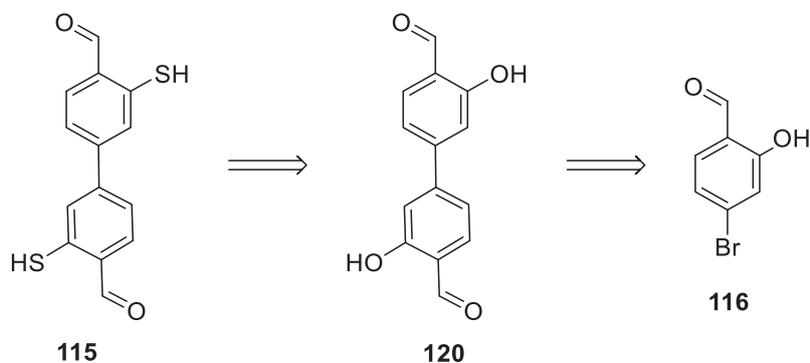


Figure 216 : analyse rétrosynthétique pour la synthèse de **106**

La conversion de **116** en **120** est présentée en figure 217.<sup>164,165</sup> En partant du 4-bromo-2-hydroxybenzène **116**, la réaction de protection du phénol donne accès au **117**. Le rendement de cette réaction est de 45% : il est relativement faible du fait de la présence du brome sur le cycle aromatique qui augmente le pKa du couple phénol/phénolate. Cette réaction pourrait être optimisée en choisissant une base de pKa plus élevé. Ensuite, une réaction de borylation a été effectuée à l'aide du bis(pinacolato)diborane en présence d'un équivalent d'acétate de potassium et d'un complexe de palladium pour conduire à la formation de **118** avec un rendement de 86%. Ensuite, un couplage de Suzuki a été effectué entre **117** et **118** pour former le dérivé biphenyl **119**. Le rendement de cette étape est de 41%. Ensuite, une réaction de déprotection quantitative des phénols est effectuée à l'aide du tribromure de bore BBr<sub>3</sub> pour former le composé **120**. Ensuite, la stratégie de

conversion du phénol **120** en thiophénol **115** est présentée à cette même figure 217 et donne accès à des composés non décrits dans la littérature. D'abord, la première étape convertit les groupements phénols de **120** en O-thiocarbamate pour former **121** avec un rendement de 69%. Ensuite, un réarrangement de Newmann-Kwart est effectué en condition thermique, à 210°C dans le diphenyléther pendant 2h. Après purification par chromatographie, le composé **122** est obtenu avec un rendement de 43%. L'abaissement de la température de la réaction à 210°C a permis d'améliorer le rendement à 53%. Enfin, une hydrolyse basique permet la conversion de **122** en dithiophénol **115**. Cette hydrolyse a été effectuée avec un rendement de 63%. Le rendement global des 7 étapes de synthèses pour former **115** de 3,6%. Le produit **115** étant obtenu en trop faible quantité, aucune application n'a été ainsi envisagée. Néanmoins, ce précurseur de poly-dithiocine a pu être isolé.

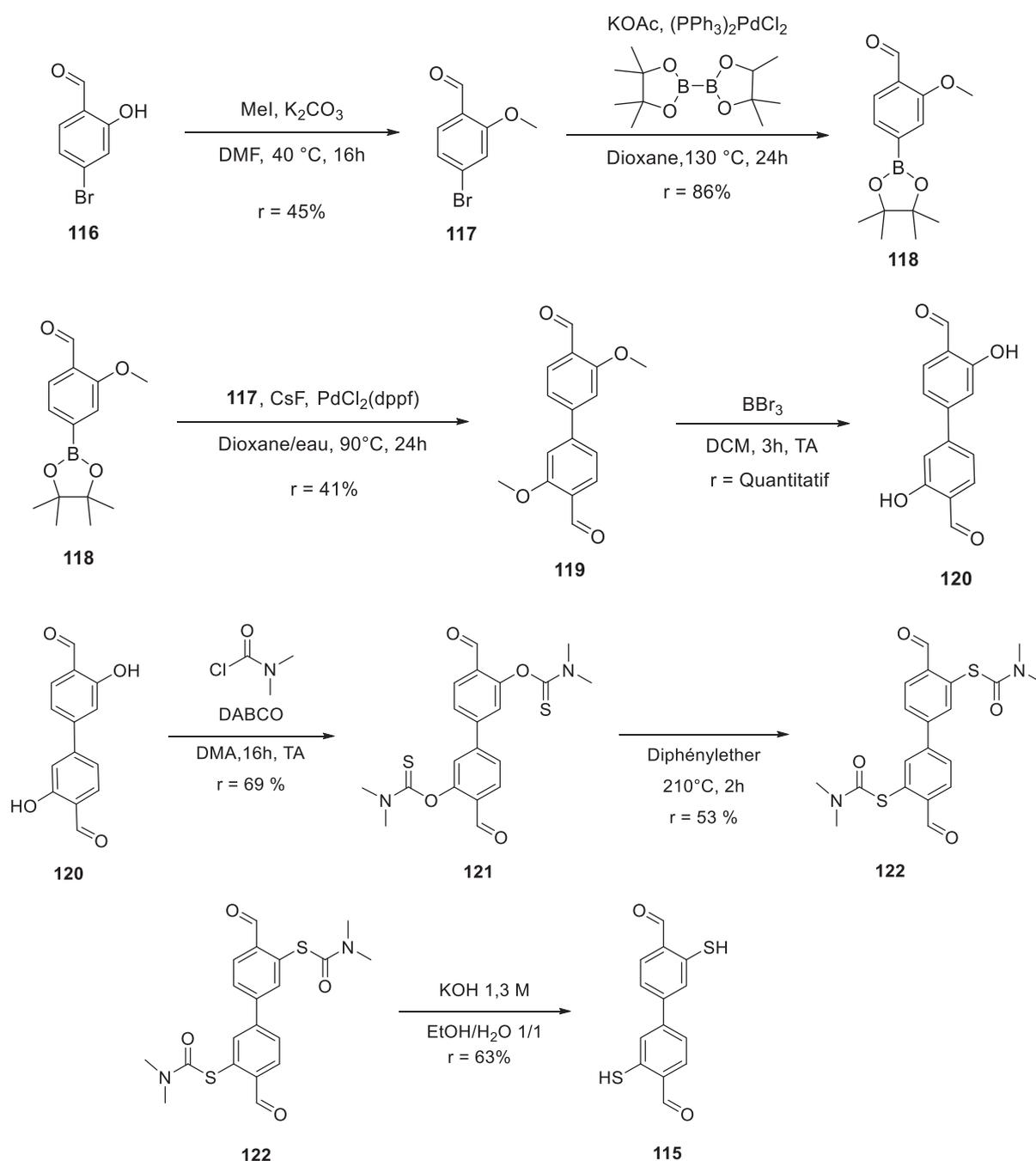


Figure 217 : conversion de l'intermédiaire de synthèse **116** en **115**

## CONCLUSION DU CHAPITRE 3

Les bases de Tröger, structures originales de par leur chiralité et leur forme de V, ont été étudiées depuis plus d'une centaine d'années. De nombreux travaux de synthèse ont été effectués en termes de fonctionnalisation de ces structures. Les bases de Tröger présentent des applications en biologie, en catalyse asymétrique ou encore en chimie supramoléculaire. Les imino-1,5-dithiocines sont très similaires aux bases de Tröger. Leur rigidité et leur chiralité laissent supposer des applications similaires, mais très peu d'informations sur ces objets sont décrites dans la littérature et aucune structure macrocyclique présentant de tels motifs n'a été isolé.

Après l'obtention surprenante d'une dithiocine lors de la conception de nouvelles briques dithiophénol, l'équipe a décidé d'entreprendre une étude autour de la synthèse des imino-1,5-dithiocines. Le Dr. Jeamet a précédemment isolé des dithiocines fonctionnalisées sur leurs cycles aromatiques ou encore sur l'amine et a montré qu'il était possible de synthétiser des polydithiocines. Nous avons donc poursuivi ces travaux, en synthétisant de nouvelles dithiocines présentant des groupements hydrosolubles et en présentant de premiers résultats sur une nouvelle voie de fonctionnalisation par échange d'amine. Ensuite, nous nous sommes focalisés sur la synthèse de nouveaux précurseurs de polydithiocines : les réactions globalement limitantes sont les réarrangements de Newman-Kwart, qui doivent subir des fortes optimisations des conditions réactionnelles. De nouveaux macrocycles présentant plusieurs motifs dithiocines ont été identifiés ainsi que de nouveaux dérivés des dynarènes. Ces premiers résultats encourageants permettent de valider la formation de polydithiocines au sein de macrocycle. Enfin, dans le but de synthétiser de nouveaux hôtes pour des molécules d'intérêts biologiques, ces études doivent être poursuivies pour allier macrocyclisation et hydrosolubilité.

## Experimental section

## I) General informations

### 1) Reagents and solvents

All the commercially available reagents were obtained from Sigma-Aldrich, ThermoFischer Scientific, Fluorochem or TCI chemicals. The solvents were obtained from VWR or Sigma-Aldrich. The dry solvents were purified thanks to a PureSolv solvent purification system from Innovative Technology. Ultrapure water was collected from an ACCU 20 Ultra-Pure Water from Fischer Scientific. TLC were performed with Macherey-Nagel silica gel 60 F254 and revealed with UV lamp a 254 nm and with a phosphomolybdic acid solution. Purification by chromatography was performed on a column with a Macherey-Nagel Silica 60 M (0.04 – 0.063 mm).

### 2) NMR

All the experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , COSY, HSQC, HMBC, DOSY) were performed on Bruker spectrometers: AVL 300, AV 300 and AV400 at the CCRMN of the University of Lyon. The chemical shifts are indicated in ppm (parts per million) in reference to the TMS. Coupling constants (J) were given in Hertz (Hz). Abbreviations used for the description of the multiplicity are: s (singlet), d (doublet), dd (doublet doubled), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet).  $^1\text{H}$  NMR titrations were performed on AV 400.

### 3) Mass spectra, HRMS and LC-MS

All the experiments have been performed at the CCSM of the University of Lyon. High Resolution Mass Spectroscopy was performed on a QTOF-MicroTof QII (50 – 20000 m/z) apparatus from Bruker. For LCMS, the column used was an Agilent Poroshell 120 EC  $\text{C}_8$ , 2.7  $\mu\text{m}$ , 5 x 2.1 mn, ( $V_{\text{inj}}$  = 3  $\mu\text{L}$ , flow 0.8 mL/min and gradient water + 0.1% formic acid/ MeCN:MeOH (50/50) or MeCN + 0.1% formic acid for typical run). Low resolution mass spectroscopy was performed on a linear quadrupole ion trap LCQ Advantage (50-2000 m/z) apparatus from Thermofinnigan.

### 4) Melting point

Melting points were measured with a Buchi Melting B-540.

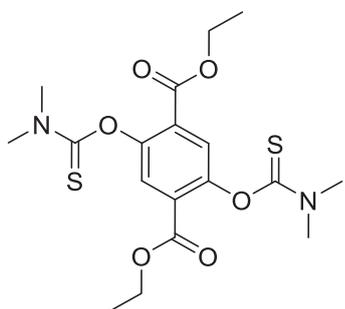
### 5) Potentiometric titration

All titrations were performed on a 702 SM Titrino automatic titrator. Solutions were prepared in 18 M $\Omega$  water. Experiments were performed in duplicate. Homemade Python scripts were used to fit experimental data and are available on a simple request.

## II) Organic Syntheses

### 1) Syntheses from the first chapter

- 2,5-Bis(dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalic acid diethyl ester 2 :

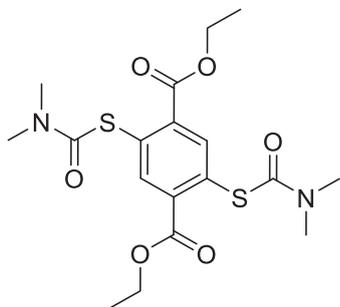


Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 428.52 g.mol<sup>-1</sup>

To a solution of 2,5-dihydroxyterephthalic diethyl ester **1** (10 g, 39 mmol) and DABCO (17.6 g, 156 mmol) in 100 mL of dry DMA was added dimethylthiocarbamoyl chloride (19.4 g, 156 mmol) in 50 mL of DMA under nitrogen at 0°C. The resulting suspension was stirred during 16 hours at room temperature. After the addition of a large amount of water, the precipitate was filtered off, washed with water (3 × 200 mL) and dried under vacuum. Compound **2** was collected as a white solid without further purification. **Yield** = 97% (m = 16.2 g).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) = 7.75 (s, 2H, Ar-H), 4.33 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.49 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.43 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>84</sup>

- 2,5-Bis(dimethylthiocarbamoylsulfanyl)terephthalic acid diethyl ester 3 :

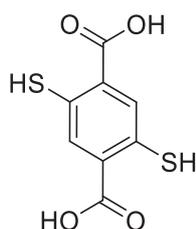


Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 428.52 g.mol<sup>-1</sup>

2,5-Bis(dimethylthiocarbamoyloxy)terephthalic acid diethyl ester **2** (3.00 g, 7.05 mmol) was heated under nitrogen at 215°C without any solvent for 2 hours. The resulting mixture was cooled to 70°C and 90 mL of ethanol was added. After one night at 0°C, pale brown crystals appeared. The crystals were filtered off, washed with cold ethanol (2 × 100 mL) yielding **3** as a brown powder. **Yield** = 97 % (m = 2.89 g).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) = 8.13 (s, 2H, Ar-H), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.13 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.05 (s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>84</sup>

- 2,5-dimercaptoterephthalic acid **4** :

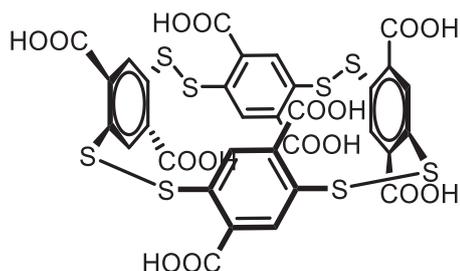


Chemical Formula:  $C_8H_6O_4S_2$   
Molecular Weight:  $230.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A solution of 2,5-Bis(dimethylthiocarbamoylsulfanyl)terephthalic acid diethyl ester **3** (1.3 g, 3.02 mmol) in degassed 1.3 M KOH in EtOH/H<sub>2</sub>O 1/1 (11.6 mL, 15.08 mmol) was refluxed under nitrogen for 3 hours. After cooling down to room temperature, concentrated HCl was added until pH = 1. A yellow precipitate was formed and filtered off, washed with water (3 × 100 mL) and dried under vacuum to provide compound **4** as a yellow solid. **Yield** = 95% (m = 698 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ(ppm) = 8.08 (s, 2H, Ar-H). Data matched with literature.<sup>84</sup>

- 2,3,5,6,8,9,11,12-octathia-1,4,7,10(1,4)-tetrabenzenacyclododecaphan-12,15,42,45,72,75,102,105-octacarboxylic acid **4<sub>4</sub>** :



Chemical Formula:  $C_{32}H_{16}O_{16}S_8$   
Molecular Weight:  $912,94 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

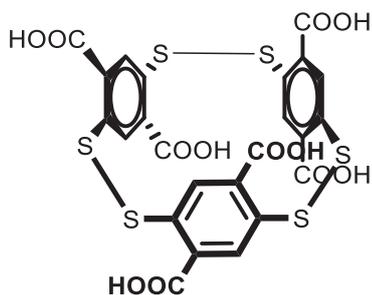
2,5-dimercaptoterephthalic acid **4** (230.0 mg, 1.00 mmol) and spermine **T<sub>1</sub> or 8** (50.6 mg, 0.25 mmol) were dissolved in 100 mL solution of 200 mM TRIS buffer pH 7.4. The resulting mixture was stirred open air for 24 hours at room temperature. After the addition of TFA until pH 1, the formed precipitate was filtered. The solid was then triturated with a borate buffer 200 mM pH = 9 (40 mL), then addition of TFA was done again. This process has been done three times. Then, the solid was triturated with water (3 × 20 mL) and filtered. The resulting product is obtained as a yellow powder. **Yield** = 66% (m = 150 mg). The same reaction was performed without TRIS buffer: instead, compounds **4** and **8** were dissolved with water and NaOH was added until pH = 7.4. **Yield** = 81% (m = 185 mg).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, pD = 7.4, 1 mM): δ(ppm) = 7.97 (s, 8H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO): δ(ppm) = 166.9 (COOH), 137.1 (C<sub>Ar</sub>), 132.4 (C<sub>Ar</sub>), 128.9 (CH<sub>Ar</sub>).

HRMS (ESI): m/z : Calcd for  $C_{32}H_{15}O_{16}S_8^-$  = 910.8131 [M-H]<sup>-</sup>, found = 910.8166. Data matched with literature.<sup>84</sup>

- 2,3,5,6,8,9-hexathia-1,4,7(1,4)-tribenzenacyclononaphane-12,15,42,45,72,75-hexacarboxylic acid **4<sub>3</sub>**:



Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>6</sub>  
Molecular Weight: 684.71 g.mol<sup>-1</sup>

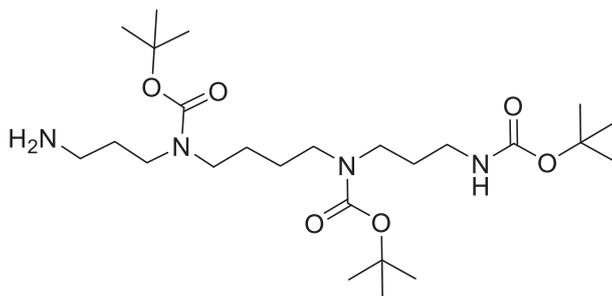
2,5-dimercaptoterephthalic acid **4** (98.7 mg, 0.43 mmol) and 2,4,6-triethyl-1,3,5-benzenetrimethanamine trihydrochloride **T<sub>0</sub>** (100.0 mg, 0.28 mmol) were dissolved with 107 mL of a 200 mM TRIS buffer pH 7.4 solution. The resulting mixture was stirred open air for 48 hours at room temperature. A white precipitate appeared and was filtered and triturated with 20 mL of a mixture TFA/water at pH 1. The solid was filtered again and the trituration was made three times. Then, the solid was washed with water (3 × 20 mL) and dried under vacuum to afford a yellow solid as final product without any other purification. **Yield** = 59% (m = 58 mg).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + NaOD): δ(ppm) = 8.01 (s, 6H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + NaOD): δ(ppm) = 173.8 (COOH), 137.7 (C<sub>Ar</sub>), 133.8 (C<sub>Ar</sub>), 126.8 (CH<sub>Ar</sub>).

HRMS (ESI): m/z : Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>11</sub>O<sub>12</sub>S<sub>6</sub><sup>-</sup> = 682.8580 [M-H]<sup>-</sup>, found = 682.8594. Data matched with literature.<sup>85</sup>

- tert-butyl (3-aminopropyl)(4-((tert-butoxycarbonyl)(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)butyl)carbamate **16** :



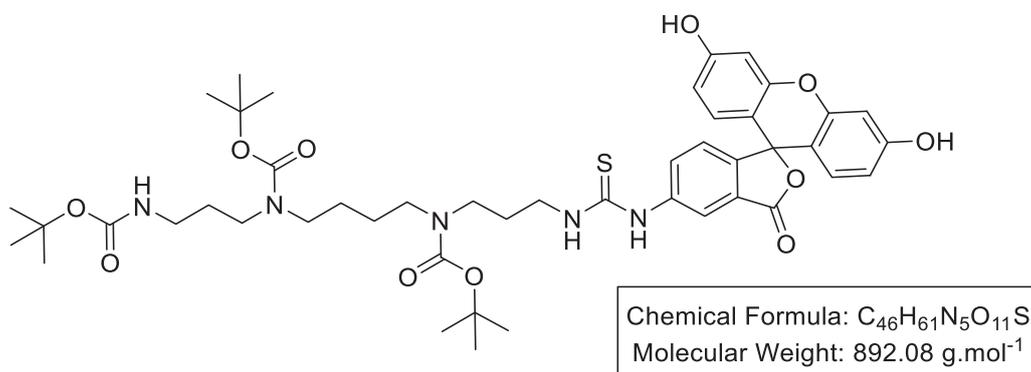
Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>  
Molecular Weight: 502,70 g.mol<sup>-1</sup>

Spermine **8** (202 mg, 1 mmol) was dissolved with MeOH (10 mL) under nitrogen at -50°C with acetone/c. Ethyl 2,2,2-trifluoroacetate (136 μL, 1.16 mmol) was added dropwise for 30 minutes to the mixture. Stirring was continued at 0°C for 30 minutes until completion. Then, di-tert-butyl dicarbonate (1.00 g, 13.5 mmol) in 2 mL of MeOH were added to the mixture dropwise for 10 minutes. The solution was stirred for 16 hours at room temperature. Then, 7 mL of a 1 M NaOH solution was added and the mixture was stirred for 6 hours at room temperature and 16 hours at 4°C. After removing the solvent, dichloromethane (10 mL) and water (10 mL) were added and after layer separation, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (5 x 10 mL). The combined organic layer was then washed with saturated NaCl solution (50 mL), dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under vacuum.

Purification with chromatography (Eluent: DCM-MeOH-NH<sub>3</sub> (100:5:1 to 50:10:1)) was performed to afford **16** as a colourless oil. **Yield** = 30%. (m = 151 mg)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 3.15 (m, 10H, 5 x NH(BOC)CH<sub>2</sub>), 2.70 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.35 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.65 (m, 4H, 2 x NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.44 (s, 27H, BOC hydrogens). Data matched with literature.<sup>101</sup>

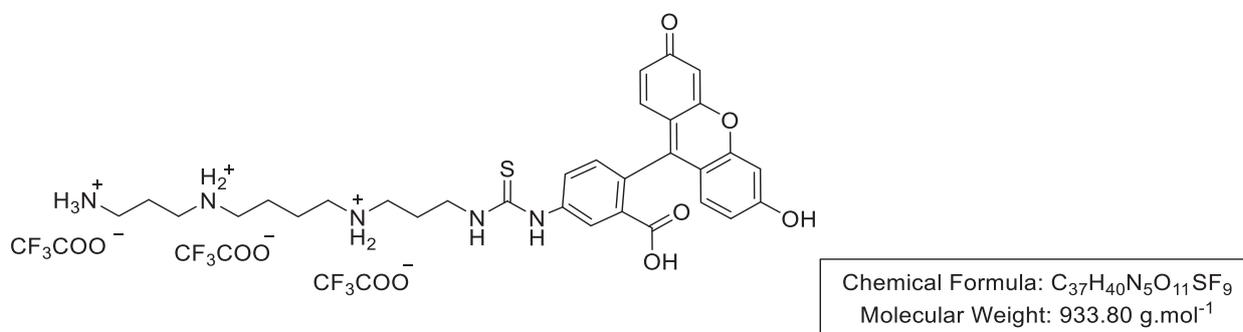
- tert-butyl(4-((tert-butoxycarbonyl)(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)butyl)(3-(3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thioureido)propyl)carbamate **18** :



To a solution of **16** (97 mg, 0.192 mmol) in 10 mL of anhydrous THF were added dropwise a solution of FITC **17** (62,15 mg, 0.192 mmol) in 10 mL of THF. The resulting mixture was heated for 24 hours at 50°C. After evaporation of THF, purification by chromatography was performed (Eluent: DCM/MeOH (100:0 to 85 :15)) to afford **18** as an orange oil. **Yield** = 81% (m = 115 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.91 (m, 2H, Ar-H), 7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.22 (m, 1H, Ar-H), 6.74 (m, 1H, Ar-H), 6.69 (m, 2H, Ar-H), 6.51 (s, 2H, Ar-H), 3.66 (m, 2H, SCNH-CH<sub>2</sub>), 3.30-3.02 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>), 1.82-1.63 (m, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N and NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.46 (s, 27H, 9 CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>101</sup>

- N<sup>1</sup>-(3-ammoniopropyl)-N<sup>4</sup>-(3-(3-(3-carboxy-4-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl)thioureido)propyl)butane-1,4-diaminium tri(trifluoroacetic acid) **15** :

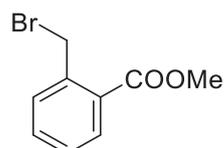


**18** (115 mg, 0.13 mmol) were dissolved with dichloromethane (3 mL) under nitrogen. Then, TFA (1,45 mL, 15 mmol), was added dropwise and the mixture was stirred for 24 hours at room temperature. After evaporation, the product **15** is obtained as an orange oil without further purification. **Yield** = 82% (m = 100,1 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ(ppm) = 8.23 (s, 1H, Ar-H), 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.24 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.09 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 2H, Ar-H), 3.79 (s, 2H, SCNH-CH<sub>2</sub>), 3.28 – 3.01 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.80 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N). Data matched with literature.<sup>101</sup>

## 2) Synthesis from second chapter

- Methyl 2-(bromomethyl)benzoate **22** :

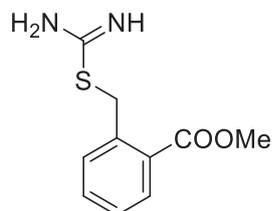


Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 229.07 g.mol<sup>-1</sup>

Methyl-2-methylbenzoate **21** (4.20 mL, 30.0 mmol), NBS (5.34 g, 30.0 mmol) and AIBN (186 mg, 1.17 mmol) were dissolved with 10 mL of dichloromethane under nitrogen. The solution was refluxing for 2 hours. NBS (0.87 g, 4.8 mmol) were added again and the mixture was heated overnight. After cooling to room temperature, the mixture was washed with NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. Purification by chromatography (Eluent : Cyclohexane/DCM from 90/10 to 50/50) was performed to provide **22** as a yellow oil. **Yield** = 47 %. (m = 3,184 g).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) = 7.99 (dd, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.56- 7.35 (m, 3H, Ar-H), 4.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>120</sup>

- methyl 2-((carbamimidoylthio)methyl)benzoate **23** :

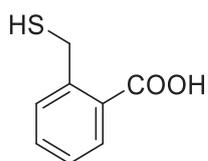


Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S  
Molecular Weight: 224.28 g.mol<sup>-1</sup>

Thiourea (122 mg, 1.60 mmol) was dissolved with 15 mL of dry methanol under nitrogen. A solution of methyl 2-(bromomethyl)benzoate **22** (368 mg, 1.60 mmol) in 15 mL of MeOH was added dropwise to the mixture which was stirred overnight at room temperature. After evaporation under vacuum, **23** was obtained as a white powder without further purification. **Yield** = 97% (m = 350 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) :**δ(ppm) = 8.03 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.63- 7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.49 (ddd, *J* = 7.8, 5.2, 3.7 Hz, 1H, Ar-H), 4.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.85 (broad s, 3H, NH<sub>2</sub> and NH), 3.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>121</sup>

▪ 2-(mercaptomethyl)benzoic acid **20** :

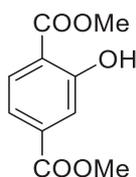


Chemical Formula:  $C_8H_8O_2S$   
Molecular Weight:  $168.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **23** (200 mg, 0.89 mmol) was dissolved under nitrogen with 6 mL of a degassed 2 M KOH solution of MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1). After 3 hours refluxing, the mixture was cooled down to room temperature and 0,8 mL of TFA were added. Methanol was evaporated and the resulting precipitate was filtered, washed with water (3 x 10 mL) and evaporated under vacuum to afford **20** as a white powder. **Yield** = 36% (m = 54 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) : :  $\delta(\text{ppm}) = 7.83$  (dd,  $J = 7.8, 1.3 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.55- 7.01 (m, 3H, Ar-H), 3.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). Data matched with literature.<sup>121</sup>

▪ dimethyl 2-hydroxyterephthalate **27** :

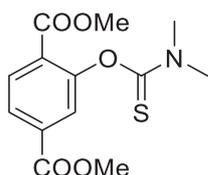


Chemical Formula:  $C_{10}H_{10}O_5$   
Molecular Weight:  $210.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a suspension of acid 2-hydroxyterephthalic **26** (1.812 g, 9.95 mmol) in 30 mL of dry methanol was added dropwise thionyl chloride (2.56 mL, 35.37 mmol) at 0°C under nitrogen. The mixture was heated at reflux and stirred overnight under inert atmosphere. After cooling, the resulting solid was washed with methanol (2 x 10 mL), then with hexane (3 x 15 mL). The solid was dried under vacuum to give **27** as a yellowish powder. **Yield** = 87% (m = 1.824 g).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta(\text{ppm}) = 10.68$  (s, 1H, OH), 7.84 (d,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.57 (d,  $J = 1.6 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.46 (dd,  $J = 8.3, 1.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>83</sup>

▪ dimethyl 2-((dimethylcarbamothioyl)oxy)terephthalate **28** :

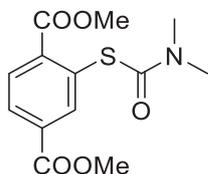


Chemical Formula:  $C_{13}H_{15}NO_5S$   
Molecular Weight:  $297.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a suspension of diethyl 2-hydroxyterephthalate **27** (1.824 g, 8.65 mmol) and DABCO (1.95 g, 17.36 mmol) in dry DMA was added a solution of N,N-dimethylthiocarbonyl chloride (1.87 g, 17.36 mmol) in 5 mL DMA. The resulting mixture was stirred overnight under nitrogen. The resulting precipitate was filtered, washed with water (3 x 20 mL) and dried under vacuum to collect **28** as a beige solid. **Yield** = 67% (m = 1.71 g).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) : 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.40 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.34 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>83</sup>

▪ dimethyl 2-((dimethylcarbamoyl)thio)terephthalate **29** :

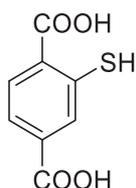


Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S  
Molecular Weight: 297.33 g.mol<sup>-1</sup>

Dimethyl 2-((dimethylcarbamothioyl)oxy)terephthalate **28** (290.0 mg, 0.97 mmol) was heating neat at 215°C for 2 hours. Purification by chromatography (Eluent : Cyclohexane/Ethyl acetate – 90/10 to 75/25) provide **29** as a yellowish oil. **Yield** = 63% (m = 184 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm) = 8.19 (dd, J = 1.7, 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.01 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.86 (dd, J = 8.1, 0.5 Hz, 1H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.96 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>83</sup>

▪ 2-mercaptoterephthalic acid **24** :

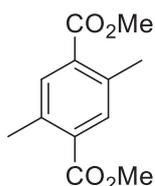


Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S  
Molecular Weight: 198.19 g.mol<sup>-1</sup>

To 15 mL of a 1.3 M degassed solution of potassium hydroxide in EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) was added dimethyl 2-((dimethylcarbamoyl)thio)terephthalate **29** (162 mg, 0.54 mmol). The mixture was refluxing under nitrogen for 3 hours. After cooling, concentrated HCl was added until pH = 1. The yellow precipitate was filtered off, washed with water (3 × 35 mL) and dried under vacuum to provide 2-mercaptoterephthalic acid **24** as a beige solid. **Yield** = 76% (m = 82 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ(ppm) = 7.80 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H). Data matched with literature.<sup>83</sup>

▪ Dimethyl 2,5-dimethylterephthalate **32**:



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 222.24 g.mol<sup>-1</sup>

To a suspension of 2,5-dimethylterephthalic acid **31** (800 mg, 4.12 mmol) in 12.5 mL dry methanol was added dropwise at 0°C thionyl chloride (1.25 mL, 17.1 mmol). The mixture was heated at reflux and stirred overnight under inert atmosphere. After cooling, the resulting solid was washed with methanol

(10 mL) and twice with hexane (2 × 10 mL). The solid was dried under vacuum to give **32** as a white powder. **Yield** = 99%. (m = 915 mg).

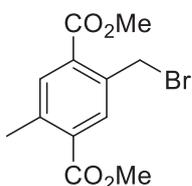
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) = 7.76 (s, 2 H, Ar-H), 3.91 (s, 6 H, 2 × COOCH<sub>3</sub>), 2.57 (s, 6 H, Ar-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) = 167.5 (CO), 137.0 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 133.5 (C<sub>Ar</sub>-CO), 132.4 (C<sub>Ar</sub>H), 52.0 (OCH<sub>3</sub>), 20.9 (Ar-CH<sub>3</sub>).

**Melting point:** 113.7-115.1 °C.

**HRMS (ESI +):** m/z : calcd for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> = 223.0965 [M + H]<sup>+</sup>, found = 223.0954.

▪ Dimethyl 2-(bromomethyl)-5-methylterephthalate **33**:



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 301.14 g.mol<sup>-1</sup>

A solution of dimethyl 2,5-dimethylterephthalate **32** (400 mg, 1.80 mmol), NBS (320 mg, 1.80 mmol), AIBN (23 mg, 0.144 mmol) in 6 mL of dry DCM was heated at reflux until conversion of the starting material. The reaction is monitored by NMR (approximately 16 h). After cooling, the organic phase was washed with a solution of NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) and brine (2 × 10 mL). The organic phase was dried with MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Purification by chromatography (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 9/1) afforded **33** as a white powder. **Yield** = 92% (m = 542 mg).

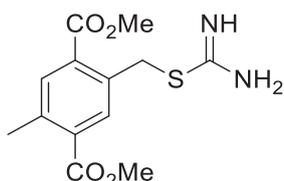
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 8.06 - 7.97 (m, 1 H, Ar-H), 7.84 - 7.74 (m, 1 H, Ar-H), 4.95 - 4.89 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Br), 3.99 - 3.89 (m, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 2.63 - 2.55 (m, 3 H, Ar-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 166.6 (CO), 166.4 (CO), 140.5 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 136.4 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2</sub>), 134.4 (C<sub>Ar</sub>-CO), 133.6 (C<sub>Ar</sub>H), 52.5 (OCH<sub>3</sub>), 52.2 (OCH<sub>3</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>).

**Melting point:** 52.9 – 55.4 °C.

**HRMS (ESI +):** m/z : calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BrNaO<sub>4</sub><sup>+</sup> = 322.9889 [M + Na]<sup>+</sup>, found = 322.9876.

▪ Dimethyl 2-((carbamimidoylthio)methyl)-5-methylterephthalate **34**:



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S  
Molecular Weight: 296.34 g.mol<sup>-1</sup>

A suspension of dimethyl 2-(bromomethyl)-5-methylterephthalate **33** (510 mg, 1.69 mmol) and thiourea (155 mg, 2.03 mmol) in MeOH (24 mL) was stirred at room temperature for 16 h. The solvent was evaporated, and the crude mixture was purified by column chromatography (C<sub>18</sub> reverse phase,

water (TFA 0.05 %) / MeCN (TFA 0.05 %) : 8/2). **34** was obtained as a white powder. **Yield** = 68% (m = 343 mg).

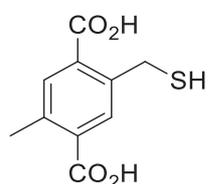
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : δ(ppm): 9.54 (broad s, 1 H, NH), 9.22 (broad s, 1 H, NH), 8.01 (s, 1 H, Ar-H), 7.87 (s, 1 H, Ar-H), 4.72 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.87 - 3.85 (m, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.53 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ (ppm) = 169.2 (C=NH), 166.3 (CO), 166.1 (CO), 139.4 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2</sub>), 134.0 (C<sub>Ar</sub>-CO), 134.0 (C<sub>Ar</sub>-CO), 133.0 (C<sub>Ar</sub>H), 132.5 (C<sub>Ar</sub>H), 131.6 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 52.7 (OCH<sub>3</sub>), 52.4 (OCH<sub>3</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>-S), 20.5 (CH<sub>3</sub>)

**Melting point:** 150.0 – 152.6 °C

**HRMS (ESI):** m/z : calcd for C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> = 397.0904 [M + H]<sup>+</sup>, found = 297.0890.

▪ 2-(mercaptomethyl)-5-methylterephthalic acid **25**:



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>S  
Molecular Weight: 226,25 g.mol<sup>-1</sup>

A solution of dimethyl 2-((carbamimidoylthio)methyl)-5-methylterephthalate **34** (343 mg, 0.866 mmol) in degassed 2 M KOH (2.86 g, 51 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 24 mL) was refluxed under an inert atmosphere for 2 h. The reaction mixture was cooled in ice, and concentrated TFA was added until pH 1. The methanol was evaporated, and the water phase was cooled. A white-yellow precipitate was formed, filtered, and washed with water, yielding compound **25** as a white solid. **Yield** = 67% (m = 132 mg)

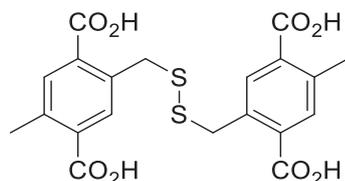
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)**: δ(ppm) = 7.90 (s, 1 H, Ar-H), 7.82 (s, 1 H, Ar-H), 4.06 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.59 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, MeOD)**: δ(ppm) = 170.2 (CO), 169.9 (CO), 142.7 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2</sub>), 139.5 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 135.3 (C<sub>Ar</sub>H), 135.0 (C<sub>Ar</sub>H), 133.7 (C<sub>Ar</sub>-CO<sub>2</sub>H), 133.1 (C<sub>Ar</sub>-CO<sub>2</sub>H), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>)

**Melting point:** degradation 196.1 °C

**HRMS (ESI +):** m/z : calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>4</sub>S<sup>+</sup> = 249.0192 [M + Na]<sup>+</sup>, found = 249.0184

▪ 2-(((5-carboxy-2-(hydroperoxy-l2-methyl)-4-methylphenyl)methyl)disulfaneyl)methyl)-5-methylterephthalic acid **35** :



Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 450.5 g.mol<sup>-1</sup>

**Oxidation with O<sub>2</sub>:** A solution of 2-(mercaptomethyl)-5-methylterephthalic acid **25** (76 mg, 0,17 mmol) with 2 mL of water adjusted at pH 9.8 with NaOH (6,7 mL) was stirred open air. The reaction was monitoring by HPLC. After 5 days, HCl were added to the mixture until pH = 1 and the precipitate was filtered and washed with water to afford **35** as a white powder. **Yield** = 56% (m = 43 mg).

**Oxidation with I<sub>2</sub>:** To a stirred solution of 2-(mercaptomethyl)-5-methylterephthalic acid **25** (20 mg, 0.088 mmol) in methanol (2 mL) was added dropwise over 5 min a 50 mM iodine solution in MeOH until a yellow colour was persistent. A white precipitate was formed, filtered, and washed with water, yielding compound **35** as a white powder. **Yield** = 70% (m = 14 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + NaOD)** δ(ppm) = 7.27 (s, 2H, Ar-H), 7.20 (s, 2H, Ar-H), 3.98 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

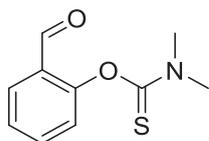
**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + NaOD):** δ(ppm) = 178.3 (CO), 177.2 (CO), 140.0 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2</sub>), 138.7 (C<sub>Ar</sub>-CH<sub>3</sub>), 1335.3 (C<sub>Ar</sub>H), 132.0 (C<sub>Ar</sub>H), 129.7 (C<sub>Ar</sub>-CO<sub>2</sub>H), 128.4 (C<sub>Ar</sub>-CO<sub>2</sub>H), 39.8 (CH<sub>2</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>)

**Melting point:** degradation 196.1 °C

**HRMS (ESI +):** m/z : calcd for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>8</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> = 473.0335 [M + Na]<sup>+</sup>, found = 473.0324

### 3) Synthesis from third chapter

- O-(2-formylphenyl) dimethylcarbamothioate **77** :



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S  
Molecular Weight: 209.26 g.mol<sup>-1</sup>

Salicylaldehyde **76** (2.0 mL, 18.95 mmol) and DABCO (4.68 g, 37.90 mmol) were dissolved with 45 mL of DMA under argon at 0°C. Dimethylthiocarbamoyl chloride (4.25 g, 37.90 mmol) was dissolved with 10 mL of DMA under nitrogen and added dropwise to the mixture at 0°C. After stirring for 24 hours, cold water (100 mL) was added and the resulting precipitate was filtered off, washed with cold water (3 × 100 mL) and dried under vacuum to afford compound **77** as a white crystal. **Yield** = 95% (m = 3.77 mg).

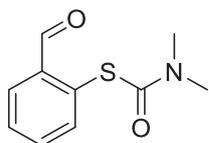
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ(ppm) 10.07 (s, 1H, CHO), 7.91 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.63 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 3.47 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.42 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) 188.51 (CHO), 187.32 (CNSO), 155.37 (C<sub>Ar</sub>-O), 134.97 (C<sub>Ar</sub>H), 129.9 (C<sub>Ar</sub>H), 129.31 (C<sub>Ar</sub>-CHO), 126.62 (C<sub>Ar</sub>H), 124.6 (C<sub>Ar</sub>H), 43.6 (NCH<sub>3</sub>), 39.1 (NCH<sub>3</sub>).

**Melting point:** 74.3°C – 75.1°C.

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> = 232.0403 [M+Na]<sup>+</sup>, found = 232.0402.

▪ S-(2-formylphenyl) dimethylcarbamothioate **78** :



Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S  
Molecular Weight: 209.26 g.mol<sup>-1</sup>

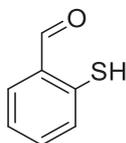
Compound **77** (1.00 g, 4.79 mmol) was dissolved with 5 mL of diphenylether under argon. After heating 2 hours at 200°C, the mixture was cooled down to room temperature. Purification by chromatography (Petroleum spirit/AcOEt : 100/0 to 40/60) was performed to afford **78** an orange oil. **Yield** = 77% (m = 772 mg).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 10.36 (s, 1H, CHO), 8.02 (m, 1H, Ar-H), 7.57 (m, 3H, 3 x Ar-H), 3.17 (broad s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.03 (broad s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 191.42 (CHO), 165.37 (CNSO), 137.89 (C<sub>Ar</sub>-CHO), 137.60 (C<sub>Ar</sub>H), 133.91 (C<sub>Ar</sub>H), 132.44 (C<sub>Ar</sub>-S), 130.17 (C<sub>Ar</sub>H), 128.90 (C<sub>Ar</sub>H), 37.34 (NCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> = 232.0403 [M+Na]<sup>+</sup>, Found = 232.0403.

▪ 2-mercaptobenzaldehyde **75** :



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>OS  
Molecular Weight: 138.18 g.mol<sup>-1</sup>

First method:

Compound **78** (600 mg, 2.86 mmol) was dissolved with a degassed solution of NaOH 1.5 M in water/ethanol 1/1 (1.15 mL, 1.5 mmol). The mixture was refluxing under argon for 3h30. After cooling to 0°C, HCl 4 M was added until pH = 2. The resulting mixture was extracted with dichloromethane (3 × 10 mL) and the combined organic layers were washed with water (3 × 15 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to afford compound **75** as a yellow-green oil. **Yield** : 75% (m = 297 mg).

Second method:

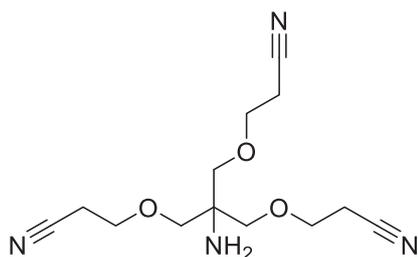
To a solution of thiophenol **79** (1.32 mL, 12.85 mmol) in 30 mL of dry hexane under argon, TMEDA (4.25 mL, 28.30 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred for 5 minutes and cooled to 0°C. Then, a solution of 2.5 M of n-BuLi (11.32 mL, 28.30 mmol) was added dropwise for 1 hour at 0°C and then stirred at room temperature for 17 hours. N-formylpiperidine (2.88 mL, 25.70 mmol) was slowly added at 0°C and the resulting mixture is stirred 18 hours at 25°C. 1 M HCl (90 mL) was added and extraction with dichloromethane (3 x 50 mL) was performed. The organic layers were combined and washed with saturated NaCl (1 x 50 mL). After evaporation under vacuum, compound **75** is obtained as a green-yellow oil. **Yield** : 44% (m = 771 mg).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm) 10.06 (s, 1H, CHO), 7.73 (dd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H Ar-H), 7.37 (m, 1H, Ar-H), 7.32 (m, 1H, Ar-H), 7.29 (m, 1H, Ar-H), 5.53 (s, 1H, SH). Data matched with literature.<sup>154</sup>

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm) : 192.99 (CHO), 138.01 ( $\text{C}_{\text{Ar-S}}$ ), 136.31 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.54 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131.27 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 131.21 ( $\text{C}_{\text{Ar-CHO}}$ ), 125.00 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ).

HRMS (ESI +):  $m/z$ : Calcd for  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5^- = 137.0067$  [M-H]<sup>-</sup>, Found = 137.0067

- 3,3'-((2-amino-2-((2-cyanoethoxy)methyl)propane-1,3-diyl)bis(oxy))dipropanenitrile **81** :

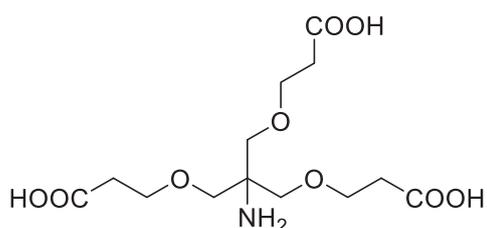


Chemical Formula:  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$   
Molecular Weight:  $280.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol **80** (2.5 g, 20.6 mmol) was dissolved with 2.5 mL of dioxane and 333  $\mu\text{L}$  of an aqueous 40% KOH under nitrogen. Then, acrylonitrile (4.2 mL, 64.2 mmol) were added dropwise and the mixture was stirred for 24 hours at room temperature. HCl was added and extraction with dichloromethane was performed (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over sulfate magnesium, filtered and evaporated to afford **81**. Yield = 33% ( $m = 1.894$  g)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ (ppm) 3.76 (t, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COOH), 3.62 (s, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ -C-NH<sub>2</sub>), 2.65 (t, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COOH). Data matched with literature.<sup>161</sup>

- 3,3'-((2-amino-2-((2-carboxyethoxy)methyl)propane-1,3-diyl)bis(oxy))dipropionic acid **82**:

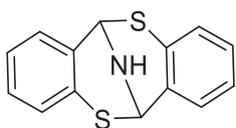


Chemical Formula:  $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_9$   
Molecular Weight:  $337.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **81** (1.70 g, 6.06 mmol) was dissolved with concentrated HCl (6 mL) refluxing at 100°C for 4 hours. After cooling to room temperature, water (40 mL) was added. The resulting solution was evaporated to provide a white solid without further purification. Yield = 90% ( $m = 1.840$  g).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$ (ppm) 3.76 (t, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COOH), 3.62 (s, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ -C-NH<sub>2</sub>), 2.65 (t, 6H, 3 x O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -COOH). Data matched with literature.<sup>161</sup>

- 6H,12H-6,12-epiminodibenzo[b,f][1,5]dithiocine **85**:



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NS<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 257,37 g.mol<sup>-1</sup>

2-mercaptobenzaldehyde **75** (50 mg, 0.36 mmol) and ammonium acetate **83** (30 mg, 0.39 mmol) was refluxed with 2.6 mL of ethanol under argon for 3h30. After cooling to room temperature, saturated solution of sodium chloride was added (5 mL) and extraction with dichloromethane (3 x 5 mL) was performed. The combined organic layers were washed with water, dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum to afford **85** as a yellow solid. **Yield** = 84% (m = 38 mg).

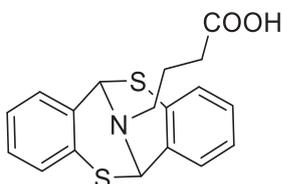
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ(ppm) = 7.34 (dd, 2H, J = 2.0 Hz, J = 7.3 Hz, Ar-H), 7.05 (m, 4H, Ar-H), 6.96 (d, 2H, J = 2.0 Hz, J = 7.3 Hz, Ar-H), 5.94 (d, 2H, J = 4.1 Hz, Ar-CH), 4.63 (t, 1H, J = 4.1 Hz, NH). Data matched with literature.<sup>154</sup>

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ(ppm) = 135.0 (C<sub>ar</sub>), 130.5 (C<sub>ar</sub>), 128.7 (C<sub>ar</sub>), 127.4 (C<sub>ar</sub>), 127.1 (C<sub>ar</sub>), 124.1 (C<sub>ar</sub>), 55.3 (CH).

**Melting point** : 146.9 – 149.5 °C

**HRMS (ESI +)**: m/z: Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>NS<sub>2</sub><sup>+</sup> = 258.0406 [M+H]<sup>+</sup>, Found = 258.0406

- 4-(6H,12H-6,12-epiminodibenzo[b,f][1,5]dithiocin-13-yl)butanoic acid **86** :



Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 343,46 g.mol<sup>-1</sup>

First method :

2-mercaptobenzaldehyde **75** (50 mg, 0.36 mmol), γ-aminobutyric acid **11** (19 mg, 0.18 mmol) and ethanoic acid (10,31 μL, 0.18 mmol) were dissolved with 2 mL of degassed ethanol. The mixture was stirred for 3 hours under argon. After evaporation of the solvent, purification by chromatography (EP/DCM : 30/70 to DCM/MeOH 90/10) was performed to afford **86** a yellowish-brown oil. **Yield** : 72% (m = 45 mg).

Second method :

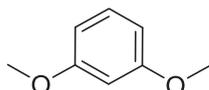
Dithiocine **85** (32 mg, 0.12 mmol), γ-aminobutyric acid **11** (13 mg, 0.13 mmol) and ethanoic acid (7,46 μL, 0.13 mmol) were refluxed with a mixture CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (4/1) for 24 hours under argon. After evaporation of the solvent, purification by chromatography (EP/DCM : 30/70 to DCM/MeOH 90/10) was performed to afford **86** a yellowish-brown oil. **Yield** : 57% (m = 24 mg).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 7.24 (dt, J = 7.2, 3.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.10 – 7.04 (m, 4H, Ar-H), 7.03-6.97 (m, 2H, Ar-H), 5.41 (s, 2H, 2 x CH), 3.17-3.04 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>), 2.84-2.71 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>), 2.44 (td, J = 7.2, 1.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 2.09-1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) = 173.31 (COOH), 133.12 (2 C<sub>ar</sub>), 129.84 (2 C<sub>ar</sub>), 129.14 (2 C<sub>ar</sub>H), 127.72 (2 C<sub>ar</sub>H), 127.53 (2 C<sub>ar</sub>H), 124.65 (2 C<sub>ar</sub>H), 53.49 (2 CH), 31.85 (NCH<sub>2</sub>), 31.85 (CH<sub>2</sub>-COOH), 14.17 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> = 334.0773 [M+H]<sup>+</sup>, Found = 334.0774

▪ **1,3-dimethoxybenzène 90 :**

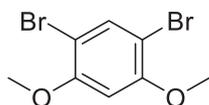


Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 138.17 g.mol<sup>-1</sup>

Resorcinol **89** (3.0 g, 27.3 mmol) and potassium carbonate (11.27 g, 81.9 mmol) were dissolved in 30 mL of acetone at 0°C. Then, iodomethane (4.21 mL, 68.2 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 48 hours under argon. The mixture was evaporated and dissolved with 50 mL of dichloromethane. The organic layer was washed with water (2 x 50 mL), with NaOH 1 M (2 x 50 mL) and with saturated NaCl (2 x 50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>. After filtration and evaporation, **90** was obtained as a yellow oil without further purification. **Yield = 80%** (m = 3.015 g)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ(ppm) : 7.23 (t, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.57 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.56 – 6.53 (m, 1H, , Ar-H), 6.52 (t, J = 2.3 Hz, 1H, , Ar-H), 3.83 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>162</sup>

▪ **1,5-dibromo-2,4-dimethoxybenzene 91 :**

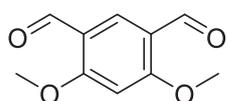


Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 295.96 g.mol<sup>-1</sup>

1,3-dimethoxybenzene **90** (3.015 g, 21.8 mmol) was dissolved with 20 mL of anhydrous dichloromethane under argon at 0°C. Then, bromide (2.25 mL, 43.9 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred 1 hour. Then, an aqueous solution of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> was added to the mixture. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The reunited organic layers were washed with water (3 x 80 mL) and dried over sulfate magnesium. After filtration and evaporation, **91** was obtained as a white solid without further purification. **Yield = 93%** (m = 5.96 g)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ(ppm) : 7.68 (s, 1H, Ar-H), 6.51 (s, 1H, Ar-H), 3.93 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>162</sup>

▪ **4,6-dimethoxyisophthalaldehyde 92 :**

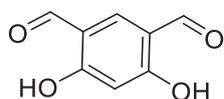


Chemical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 194.19 g.mol<sup>-1</sup>

1,5-dibromo-2,4-dimethoxybenzene **91** (3.815 g, 12.8 mmol) were dissolved with 150 mL anhydrous diethylether under argon at -50°C. Then, 20.5 mL of BuLi 2,5 M in solution with diethylether (51.8 mmol) was added dropwise to the mixture, stirring one minute. Then mixture was stirred at room temperature during another minute and then N-methylformanilide (9.50 mL, 76.9 mmol) was slowly added dropwise. After 5 minutes stirring, 70 mL of a 3 M solution of HCl was added to the mixture and stirred overnight. The mixture was filtered and the precipitated was washed with water (3 × 50 mL) and with Et<sub>2</sub>O (3 × 50 mL), to afford **92** as a white solid without further purification. **Yield** = 92 % (m = 2.32 g)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 10.29 (s, 2H, 2 CHO), 8.36 (s, 1H, Ar-H), 6.48 (s, 1H, Ar-H), 4.05 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>162</sup>

▪ 4,6-dihydroxyisophthalaldehyde **93** :

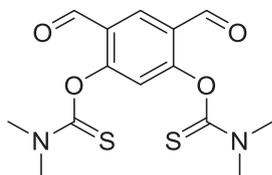


Chemical Formula: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 166.13 g.mol<sup>-1</sup>

Anhydrous AlCl<sub>3</sub> (9.87 g, 73.9 mmol) were dissolved with 100 mL of nitrobenzene refluxing at 120°C under argon. After the dissolution, 4,6-dimethoxyisophthalaldehyde **92** (1.562 g, 8.05 mmol) were added and the resulting mixture is stirred for 1 hour. After cooling to room temperature, 100 mL of HCl 10% were added and the solution was extracted with 100 mL of Et<sub>2</sub>O. The organic layer is washed with a 1M NaOH solution (3 × 50 mL). The resulting aqueous layer was acidified with a 1 M HCl solution and extracted with CHCl<sub>3</sub> (3 × 100 mL). These organic layers were gathered and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. Purification by chromatography was performed (Eluent: AcOEt/Petroleum spirit from 50/50 to 100/0) to give 4,6-dihydroxyisophthalaldehyde **93** as a yellow solid. **Yield** = 34% (m = 459 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 11.81 (s, 2H, 2 x OH), 9.82 (s, 2H, 2 CHO), 7.86 (s, 1H, Ar-H), 6.50 (s, 1H, Ar-H). Data matched with literature.<sup>162</sup>

▪ O,O'-(4,6-diformyl-1,3-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) **94** :



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 340.41 g.mol<sup>-1</sup>

4,6-dihydroxyisophthalaldehyde **93** (459 mg, 2.76 mmol) and DABCO (1.23 g, 11.0 mmol) were dissolved with 5 mL of DMA under nitrogen at 0°C. Then, dimethylthiocarbamoyl chloride (1.35 g, 11.0 mmol) was dissolved with 3 mL of DMA under argon and added dropwise to the mixture at 0°C. After stirring for 24 hours, cold water (50 mL) was added. The resulting precipitate was filtered off and washed with cold water (3 × 20 mL) and dried under vacuum to afford compound **94** as a white-pink powder. **Yield** = 91% (m = 861 mg).

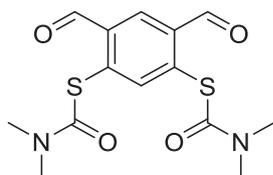
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ (ppm) = 9.99 (s, 2H, 2 CHO), 8.37 (s, 1H, Ar-H), 6.95 (s, 1H, Ar-H), 3.40 (s, 6H, 2  $\text{NCH}_3$ ), 3.36 (s, 6H, 2  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ (ppm) = 186.52 (2  $\text{C}_{\text{aldHO}}$ ), 185.77 (2 x  $\text{C}_{\text{SON}}$ ), 158.76 (2  $\text{C}_{\text{Ar-O}}$ ), 132.60 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 127.69 (2  $\text{C}_{\text{Ar-Cald}}$ ), 121.44 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 43.51 (2  $\text{CH}_3$ ), 39.24 (2  $\text{CH}_3$ ).

**Melting point** : 127,5 – 128,3 °C

**HRMS (ESI +)**: m/z: Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}_2^+$  = 363.0444  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , Found = 363.0448

- **S,S'-(4,6-diformyl-1,3-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) 95:**



Chemical Formula:  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$   
Molecular Weight:  $340.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **94** (715 mg, 2.10 mmol) was dissolved in 30 mL of N-methyl-2-pyrrolidinone in a sealed tube. The mixture was heated at 210°C with microwave for 9 minutes. After cooling, water (20 mL) were added and layers were separated. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with saturated NaCl (2 x 20 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated. Purification by chromatography (Petroleum spirit/DCM/MeOH: 50/50/0 to 0/90/10) gave compound **95** as a yellow solid. **Yield** = 18% (m = 130 mg).

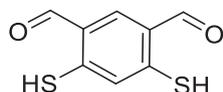
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm) 10.29 (s, 2H, 2 CHO), 8.59 (s, 1H, Ar-H), 7.86 (s, 1H, Ar-H), 3.17 (broad s, 6H, 2  $\text{NCH}_3$ ), 3.04 (broad s, 6H, 2  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ (ppm) 189.51 (2 CHO), 163.83 (2  $\text{CNSO}$ ), 144.81 (2  $\text{C}_{\text{Ar-S}}$ ), 138.17 ( $\text{C}_{\text{ArH}}$ ), 137.19 ( $\text{C}_{\text{ArH}}$ ), 129.17 (2  $\text{C}_{\text{Ar-CHO}}$ ), 37.4 (4  $\text{NCH}_3$ ).

**Melting point**: 128,8°C – 130,2°C.

**HRMS (ESI +)**: m/z: Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}_2^+$  = 363.0444  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , Found = 363.0440.

- **4,6-dimercaptoisophthalaldehyde 88 :**



Chemical Formula:  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{S}_2$   
Molecular Weight:  $198.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**95** (130 mg, 0,38 mmol) were dissolved with a degassed solution of NaOH 1,3 M (1,15 mL, 1,5 mmol). The mixture was refluxing under argon for 3 hours. After cooling to 0°C, HCl 4 M was added until pH = 2. The resulting mixture was then extraction with dichloromethane (3 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with water (3 x 50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to afford compound **88** as a white-brown powder. **Yield** = 72% (m = 54 mg).

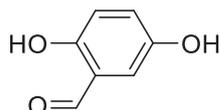
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ ):  $\delta$ (ppm) : 10.49 (s, 2H, CHO), 7.89 (s, 1H, Ar-H), 7,62 (s, 1H, Ar-H).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O + NaOD):** δ(ppm) : 196.66 (2 CHO), 143.13 (C<sub>Ar</sub>H), 134.13 (C<sub>Ar</sub>SH), 130.45 (C<sub>Ar</sub>CHO), 128.55 (C<sub>Ar</sub>H).

**Melting point:** Decomposition 190°C.

**HRMS (ESI -):** m/z: Calcd for C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> = 196.9736 [M-H]<sup>-</sup>, Found = 196.9738.

▪ 2,5-dihydroxybenzaldehyde **106**:

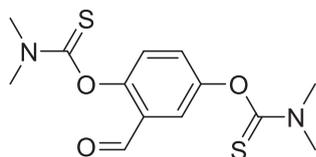


Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Molecular Weight: 138.12 g.mol<sup>-1</sup>

2-hydro-5-methoxybenzaldehyde **105** (1 mL, 8.01 mmol) was dissolved with dichloromethane (3 mL). Boron tribromide 1 M in dichloromethane (32 mL, 32 mmol) were added dropwise at 0°C, and the mixture was stirred for 3 hours under argon. Then, water was added at 0°C and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 × 200 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under vacuum to afford **106** as a white powder without further purification. **Yield** : 54% (m = 602 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ(ppm) : 10.62 (s, 1H, OH), 9.82 (s, 1H, CHO), 7.10 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.91 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 3.84 (s, 1H, OH). Data matched with literature.<sup>166</sup>

▪ O,O'-(2-formyl-1,4-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) **107** :



Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 312.40 g.mol<sup>-1</sup>

2,5-dihydroxybenzaldehyde **106** (570 mg, 4.13 mmol) and DABCO (1.86 g, 16.5 mmol) were dissolved with 5 mL of dry DMA under argon at 0°C. Then, dimethylthiocarbamoyl chloride (1.80 g, 16.5 mmol) was dissolved with dry DMA (5 mL) under nitrogen and added dropwise to the mixture at 0°C. The resulting suspension was stirred for 16 hours at room temperature. After addition of a large amount of water, the precipitate was filtered off, washed with water (3 × 30 mL) and dried under vacuum. Compound **107** as a white solid was collected without further purification. **Yield** : 69% (m = 881 mg).

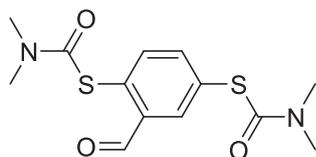
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ(ppm) : 10.04 (s, 1H,CHO), 7.61 (d, J = 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.37 (dd, J = 8.7, 2.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 3.50 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.48 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.44 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.38 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ(ppm) : 187.31 (CHO), 187.12 (2 x CSNO), 152.82 (C<sub>Ar</sub>O), 151.76 (C<sub>Ar</sub>O), 129.74 (C<sub>Ar</sub>CHO), 129.60 (C<sub>Ar</sub>), 125.22 (C<sub>Ar</sub>), 123.13 (C<sub>Ar</sub>), 43.52 (NCH<sub>3</sub>), 43.39 (NCH<sub>3</sub>), 39.00 (NCH<sub>3</sub>), 38.85 (NCH<sub>3</sub>).

**Melting point:** 144,8°C – 146,2°C

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{13}H_{16}N_2Na_1O_3S_2^+$  = 335.0495  $[M+Na]^+$ , Found = 335.0496.

- S,S'-(2-formyl-1,4-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) **108** :



Chemical Formula:  $C_{13}H_{16}N_2O_3S_2$   
Molecular Weight:  $312.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The reactant **107** (360 mg, 1.15 mmol) were dissolved with 4 mL of diphenylether under argon. The mixture was heating at 200°C for 2 hours. Purification by chromatography (eluent: Petroleum spirit/DCM/MeOH : 60/40/0 to 0/97/3) give **108** as a brown solid. **Yield:** 24 % (m = 87 mg).

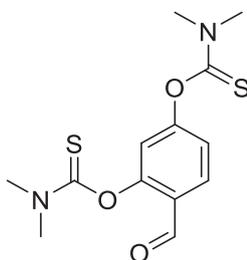
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$ (ppm) = 10.29 (s, 1H, CHO), 8.11 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 3.16 (broad s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.11 (broad s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.09 (broad s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.03 (broad s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$ (ppm) = 190.29 (CHO), 165.47 ( $\text{CSNO}$ ), 164.79 ( $\text{CSNO}$ ), 140.27 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHO}$ ), 137.83 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$ ), 137.46 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$ ), 135.11 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 133.09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 132.17 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 36.78 ( $\text{NCH}_3$ ), 36.68 ( $\text{NCH}_3$ ), 36.53 ( $\text{NCH}_3$ ), 29.69 ( $\text{NCH}_3$ ).

**Melting point:** 98,7°C – 100,1°C

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{13}H_{17}N_2O_3S_2^+$  = 313.0675  $[M+H]^+$ , Found = 313.0677.

- O,O'-(4-formyl-1,3-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) **112**:



Chemical Formula:  $C_{13}H_{16}N_2O_3S_2$   
Molecular Weight:  $312,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

2,4-dihydroxybenzaldehyde **111** (1.0 g, 7,25 mmol) and DABCO (3.25 g, 29 mmol) were dissolved with 10 mL of dry DMA under argon at 0°C. Then, dimethylthiocarbamoyl chloride (3.58 g, 29 mmol) was dissolved with dry DMA (10 mL) under nitrogen and added dropwise to the mixture at 0°C. The resulting suspension was stirred for 16 hours at room temperature. After addition of a large amount of water, the precipitate was filtered off, washed with water (3 × 30 mL) and dried under vacuum. A white-beige solid was collected without further purification. **Yield** : 76% (m = 1,73 g).

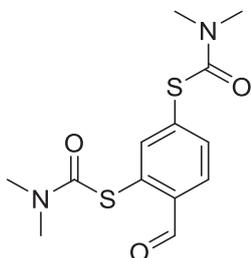
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$ (ppm) = 10.03 (s, 1H, CHO), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.12 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.93 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 3.47 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.45 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.41 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.35 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta$ (ppm) = 187.34 (CHO), 186.73 ( $\text{CSNO}$ ), 186.22 ( $\text{CSNO}$ ), 158.38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{O}$ ), 155.78 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{O}$ ), 130.38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHO}$ ), 127.02 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 121.38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 119.55 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 43.51 ( $\text{NCH}_3$ ), 43.36 ( $\text{NCH}_3$ ), 39.10 ( $\text{NCH}_3$ ), 39.03 ( $\text{NCH}_3$ ).

**Melting point:** 133,5 – 134,6 °C

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{13}H_{16}N_2O_3S_2Na^+$  = 335.0495  $[M+H]^+$ , Found = 335.0494

- S,S'-(4-formyl-1,3-phenylene) bis(dimethylcarbamothioate) **113** :



Chemical Formula:  $C_{13}H_{16}N_2O_3S_2$   
Molecular Weight:  $312,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

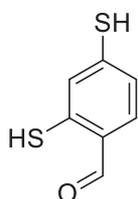
Compound **112** (643 mg, 2,06 mmol) were dissolved with 5 mL of diphenylether under argon. The mixture was heating at 200°C for 3 hours. Purification by chromatography (Eluent : Petroleum spirit/AcOEt : 80/20 to 100/0) gave **113** as a brown oil. **Yield** : 10% (m = 63 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$ (ppm) = 10.32 (s, 1H, CHO), 8.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (ddd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 3.16 (broad s, 6H, 2 x NCH<sub>3</sub>), 3.04 (broad s, 6H, 2 x NCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$ (ppm) = 190.61 (CHO), 185.08 (C<sub>SON</sub>), 184.95 (C<sub>SON</sub>), 143.04 (C<sub>Ar</sub>CHO), 137.60 (C<sub>Ar</sub>S), 136.39 (C<sub>Ar</sub>S), 135.88 (C<sub>Ar</sub>), 132.72 (C<sub>Ar</sub>), 128.67 (C<sub>Ar</sub>), 37.18 (2 NCH<sub>3</sub>), 36.99 (2 x NCH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{13}H_{17}N_2O_3S_2^+$  = 313,0675  $[M+H]^+$ , Found = 313,0676.

- 2,4-dimercaptobenzaldehyde **104** :



Chemical Formula:  $C_7H_6OS_2$   
Molecular Weight:  $170.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

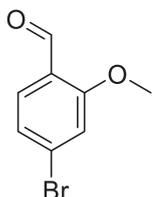
Compound **113** (40 mg, ) is dissolved with 480 mL of degassed 1,3 M of NaOH in water/ethanol 1/1 refluxing for 3 hours under argon. After cooling to 0°C, 5 mL of HCl 1 M was added and the resulting precipitate was filtered, washed with water and liophilised. Compound **104** appeared as a brown solid. **Yield** = 72% (m = 17 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$ (ppm) = 9.95 (s, 1H, CHO), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 5.82 (s, 1H, SH), 3.64 (s, 6H, SH).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** :  $\delta$ (ppm) = 191.71 (CHO), 140.41 (C<sub>Ar</sub>CHO), 139.13 (C<sub>Ar</sub>S), 136.60 (C<sub>Ar</sub>S), 129.26 (C<sub>Ar</sub>), 128.28 (C<sub>Ar</sub>), 124.46 (C<sub>Ar</sub>).

**HRMS (ESI -):** m/z: Calcd for  $C_8H_5O_2S_2^-$  = 168.9787  $[M-H]^-$ , Found = 168.9788

▪ 4-bromo-2-methoxybenzaldehyde **117** :

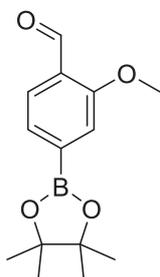


Chemical Formula:  $C_8H_7BrO_2$   
Molecular Weight:  $215.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde **116** (1.482 g, 7.3 mmol) and potassium carbonate (4.0 g, 29.0 mmol) were dissolved with 30 mL of DMF. Then, MeI (1.407 mL, 18.25 mmol) were added dropwise and the mixture was stirred at  $40^\circ\text{C}$  for 16 hours. After cooling, dichloromethane (50 mL) and water (50 mL) were added. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane ( $3 \times 50 \text{ mL}$ ). Combined organic layers were washed with brine ( $7 \times 100 \text{ mL}$ ), dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. 4-bromo-2-methoxybenzaldehyde **117** was obtained as beige solid without further purification. **Yield** : 45% ( $m = 704 \text{ mg}$ ).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ (ppm) 10.38 (s, 1H, CHO), 7.69 – 7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.19 – 7.13 (m, 2H, Ar-H), 3.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ). Data matched with literature.<sup>164</sup>

▪ 2-methoxy-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzaldehyde **118** :

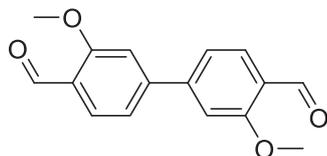


Chemical Formula:  $C_{14}H_{19}BO_4$   
Molecular Weight:  $262.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4-bromo-2-methoxybenzaldehyde **117** (350 mg, 1,63 mmol), bis(pinacolato)diboron (458 mg, 1,81 mmol), NaOAc (405 mg, 4,94 mmol) and  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$  (22 mg, 0,032 mmol) were dissolved with 5 mL of dioxane and degassed under nitrogen for 30 minutes and heated at  $130^\circ\text{C}$  for 24 hours. Then, the mixture was filtered and the resulting insoluble was washed with AcOEt. The filtrate was concentrated under vacuum and dissolved with AcOEt. Charcoal activated was added to the mixture, refluxing for 15 minutes, followed by a hot filtration on Celite®. The remaining filtrate was concentrated under vacuum. Hexane was added, and the mixture was concentrated again under vacuum. A yellow solid has been obtained for **118** without further purification. **Yield** : 86% ( $m = 389 \text{ mg}$ ).

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ (ppm) : 10.52 (s, 1H, CHO), 7.83 (d,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.48 (d,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 4.00 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.38 (s, 12H,  $\text{CCH}_3$ ). Data matched with literature.<sup>164</sup>

- 3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4,4'-dicarbaldehyde **119** :

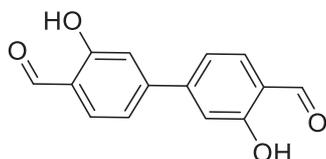


Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 270.28 g.mol<sup>-1</sup>

Compounds **118** (369 mg, 1,41 mmol) and 5-bromo-2-methoxybenzaldehyde **117** (303 mg, 1,41 mmol) were dissolved in 15 mL of dioxane/water mixture (2/1). Then, CsF (643 mg, 4,23 mmol) and PdCl<sub>2</sub>(dppf) (52 mg, 0,07 mol) were added and the resulting solution was stirred and heating at 90°C refluxing for 24 hours. After cooling to room temperature, water was added (20 mL) and extractions with dichloromethane (3 x 30 mL) has been performed. The combined organic layer was washed with a saturated solution of NaCl (2 x 50 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated, and concentrated under vacuum. Purification by chromatography (Petroleum spirit/ethyl acetate: 100/0 to 0/100 ) was performed and gave **119** as a brown powder. **Yield** : 41% (m = 154 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 10.51 (s, 2H, CHO), 7.93 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.29 – 7.24 (m, 2H, Ar-H), 7.17 (d, J = 1.4 Hz, 2H, Ar-H), 4.03 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). Data matched with literature.<sup>165</sup>

- 3,3'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-4,4'-dicarbaldehyde **120** :

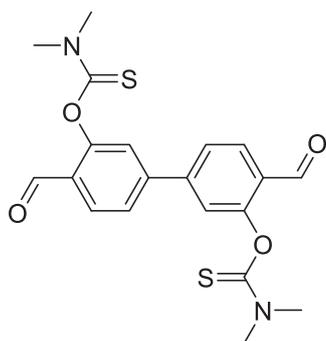


Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 242.23 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **119** (154 mg, 0.57 mmol) were dissolved with 5 mL of anhydrous dichloromethane under argon at 0°C. Then, a 1 M solution BBr<sub>3</sub> in dichloromethane (2.28 mL, 2.28 mmol) was added dropwise to the mixture. After 3 hours stirring at room temperature, water (10 mL) was added at 0°C and extraction with dichloromethane (3 x 15 mL) was performed. The combined organic layer was washed with brine (2 x 40 mL), dried with anhydrous sodium sulfate, filtrated, and concentrated under vacuum. Compound **120** was obtained as a brown solid without further purification. **Yield**: quantitative (m = 135 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm) : 11.10 (s, 2H, OH), 9.96 (s, 2H, CHO), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-H) and 7.29 – 7.22 (m, 4H, Ar-H). Data matched with literature.<sup>165</sup>

- O,O'-(4,4'-diformyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl) bis(dimethylcarbamothioate) **121** :



Chemical Formula:  $C_{20}H_{20}N_2O_4S_2$   
Molecular Weight:  $416.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **120** (134 mg, 0,53 mmol, 1 eq.) and DABCO (229 mg, 2,05 mmol, 4 eq.) were dissolved with 5 mL of anhydrous DMA under argon at  $0^\circ\text{C}$ . Then and carbamoyl chloride (250 mg, 2,05 mmol) with 5 mL of anhydrous DMA was added to the mixture, which was stirred overnight at room temperature. Then, water was added and a precipitated was collected after filtration. The solid was washed with water (3 x 20 mL) and dried under vacuum. Compound **121** was obtained as a beige solid. **Yield:** 69% (m = 161 mg).

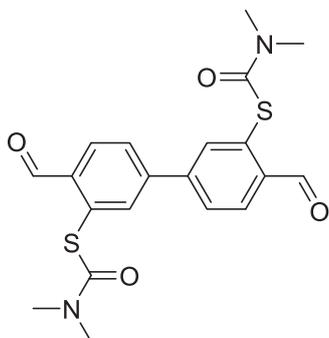
$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  : 10.11 (s, 2H, 2 x CHO), 8.00 (d,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 7.66 (dd,  $J = 8.1, 1.3 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 7.41 (d,  $J = 1.6 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 3.50 (s, 6H, 2 x  $\text{NCH}_3$ ), 3.46 (s, 6H, 2 x  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  : 187.82 (CHO), 187.00 (CSNO), 155.72 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 145.26 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 130.24 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 125.23 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 123.42 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 43.56 (2  $\text{NCH}_3$ ), 39.07 (2  $\text{NCH}_3$ ).

**Melting point:**  $216,5 - 217,2^\circ\text{C}$ .

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{20}H_{20}N_2Na_1O_4S_2^+$  = 439.0757 [M+H]<sup>+</sup>, Found = 439.0751

- $S,S'$ -(4,4'-diformyl-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl) bis(dimethylcarbamothioate) **122**:



Chemical Formula:  $C_{20}H_{20}N_2O_4S_2$   
Molecular Weight:  $416.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **121** (85 mg, 0.20 mmol) was dissolved with 3 mL of diphenylether and the resulting mixture was stirred at  $215^\circ\text{C}$  under argon. Purification by column chromatography (Petroleum spirit/ Ethyl acetate, 100/0 to 25/75) gave **122** as a white-pink powder. **Yield** = 53% (m = 45 mg).

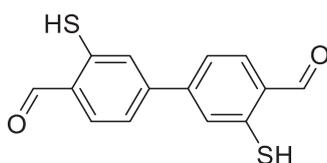
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  : 10.40 (d,  $J = 0.7 \text{ Hz}$ , 2H, CHO), 8.14 (d,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 7.84 (d,  $J = 1.5 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 7.81 (ddd,  $J = 8.0, 1.8, 0.7 \text{ Hz}$ , 2H, Ar-H), 3.14 (d,  $J = 57.2 \text{ Hz}$ , 12H,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm})$  : 190.69 (CHO), 164.95 (CSNO), 144.19 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHO}$ ), 137.33 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$ ), 136.23 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{S}$ ), 133.18 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 129.36 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 128.89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ), 53.43 (2  $\text{NCH}_3$ ), 37.28 (2  $\text{NCH}_3$ ).

**Melting point** =  $210,0 - 211,5^\circ\text{C}$ .

**HRMS (ESI +):** m/z: Calcd for  $C_{20}H_{20}N_2Na_1O_4S_2^+$  = 439.0757 [M+H]<sup>+</sup>, Found = 439.0759

- 3,3'-dimercapto-[1,1'-biphenyl]-4,4'-dicarbaldehyde **115**:



Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 274.35 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **122** (38.0 mg, 0.09 mmol) was dissolved with 700  $\mu$ L of a degassed 1.3 M solution of KOH with ethanol/water 1/1, refluxing under argon for 3 hours. After cooling, HCl 4 M was added (5 mL). Extraction with dichloromethane (2 x 10 mL) was performed and the combined organic layers were washed with water (10 mL) and NaCl saturated (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered off and evaporated. Compound **115** was obtained as a yellow solid. **Yield** = 63% (m = 16 mg).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$ (ppm) = 10.13 (s, 2H, CHO), 7.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar-H), 7.58 – 7.48 (m, 4H, Ar-H), 5.84 (s, 2H, SH).

HRMS (ESI -): m/z: Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> = 273.0049 [M-H]<sup>-</sup>, Found = 273.0051.

### III) ITC experiments

#### 1) General procedures

ITC experiments have been performed with a microcal calorimeter Malvern ITC200. Temperature was set to 298 K. In every experiment, the host solution is at concentration [Host] in a Tris buffer (200 mM) and placed in the cell (200  $\mu$ L), and the guest at the concentration [Guest] and is placed in the syringe (40  $\mu$ L). Then, successive aliquots of guest solution were added thanks to a computer-automated injector with 2 min intervals. Heat changes were recorded after each addition. The first injection was discarded from each dataset to remove effect of guest diffusion across the syringe tip during the equilibration process. For the following tables, thermodynamic parameters were obtained from binding model of the MicroCal ITC Origin software. Concentration [Guest] and [Host] are expressed in mM, Stoichiometry (*n*), the association constant (*K*) in M<sup>-1</sup> and the enthalpy of binding ( $\Delta H$ ) cal.mol<sup>-1</sup> were obtained. Other thermodynamics parameters were calculated from the equation  $\Delta H - T\Delta S = -RT\ln K$  with *T* the temperature and *R* = 8.314 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>.  $\Delta S$  in cal. mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> is the Wiseman parameter :  $c = n [\text{host}] K$ . All the corresponding thermograms is presented in the appendix C.

#### 2) Results

##### A) Macrocycle 4<sub>3</sub>

TRIS buffer used at pH = 8.3. [Guest] is ten times more concentrated than [Host]. 2  $\mu$ L was added for each measurement. Therefore, 20 points were plotted to get 2 equivalents. If the number of equivalents is different, concentration has been modified using the same method.

##### a) With diamine

Thermodynamic parameters were obtained from 1:1 binding model of the MicroCal ITC Origin software. Only hexanediamine was able to give a correct modelisation. For the other diamine, only dilution was observed for [host] = 1.0 mM and [Guest] = 10.0 mM.

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n	c
<b>4<sub>3</sub> VS 6<sub>7</sub> #1</b>	1.0	15.0	1.22 10 <sup>4</sup>	8.74 10 <sup>2</sup>	0.07	-2599	52.26	9.98	0.55	7
<b>4<sub>3</sub> VS 6<sub>7</sub> #2</b>	1.0	10.0	1.69 10 <sup>4</sup>	2.98 10 <sup>3</sup>	0.18	-2091	87.79	12.3	0.51	8
<b>4<sub>3</sub> VS 6<sub>7</sub> #3</b>	1.0	10.0	1.69 10 <sup>4</sup>	3.24 10 <sup>3</sup>	0.19	-1984	77.27	12.7	0.54	9

*b) With spermidine and spermine*

- 4<sub>3</sub> VS spermidine 7 :

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n	c
<b>4<sub>3</sub> VS 7</b>	1.0	10.0	8.70 10 <sup>3</sup>	1.04 10 <sup>3</sup>	0.12	- 714	11.93	16.5	0.88	8

- 4<sub>3</sub> VS spermine 8 : 4<sub>3</sub> was in the cell and spermine in the syringe. Thermodynamic parameters were obtained from the “two set of sites” fitted but only integration was collected for further analysis.

**4<sub>3</sub> VS 8 #1**: cell [4<sub>3</sub>] = 0,5 mM et syringe [8] = 6,25 mM

**4<sub>3</sub> VS 8 #2**: cell [4<sub>3</sub>] = 0,5 mM et syringe [8] = 6,25 mM

**4<sub>3</sub> VS 8 #3**: cell [4<sub>3</sub>] = 1 mM et syringe [8] = 10 mM (40 injections)

- Spermine 8 VS 4<sub>3</sub> (reverse titration) : Spermine was in the cell and dyn[3]arene in the syringe

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n
<b>8 VS 4<sub>3</sub> #1</b>	0.50	5.0	8.85 10 <sup>4</sup>	1.85 10 <sup>4</sup>	0.21	-2187	57.60	15.3	0.70
<b>8 VS 4<sub>3</sub> #2</b>	0.25	5.0	7.26 10 <sup>4</sup>	1.34 10 <sup>4</sup>	0.18	-2560	65.85	13.7	0.69
<b>8 VS 4<sub>3</sub> #3</b>	0.25	5.0	8.54 10 <sup>4</sup>	6.66 10 <sup>3</sup>	0.07	-2995	40.24	12.5	0.77

**B) Macrocycle 4<sub>4</sub>**

TRIS buffer used at pH = 7.4. [Guest] is fifteen times more concentrated than [Host] in the initial procedure, but optimisations could have been done. 1 $\mu$ L was added for each measurement. Therefore, 26 points were plotted to get 2 equivalents. If the number of equivalents is different, concentration has been modified using the same method.

*a) With diamines*

	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n	c
$4_4$ VS $6_2$ #1	1.2	20	$3.07 \cdot 10^4$	$3.59 \cdot 10^3$	0.12	-1037	15.48	17.1	0.8	27
$4_4$ VS $6_2$ #2	1.1	20	$3.32 \cdot 10^4$	$4.57 \cdot 10^3$	0.14	-951.8	17.09	17.5	0.8	29
$4_4$ VS $6_2$ #3	1.3	20	$2.83 \cdot 10^4$	$2.24 \cdot 10^3$	0.09	-1028	10.56	16.9	0.9	33
$4_4$ VS $6_3$ #1	0.07	1	$3.00 \cdot 10^5$	$3.70 \cdot 10^4$	0.12	-1449	26.42	20.2	0.8	17
$4_4$ VS $6_3$ #2	0.30	7.5	$1.53 \cdot 10^5$	$7.70 \cdot 10^3$	0.05	-1251	7.23	19.5	0.7	33
$4_4$ VS $6_3$ #3	0.40	7.5	$1.27 \cdot 10^5$	$6.61 \cdot 10^3$	0.05	-1173	6.37	19.4	0.9	45
$4_4$ VS $6_4$ #1	0.02	0.3	$8.65 \cdot 10^6$	$8.30 \cdot 10^5$	0.09	-4811	34.17	15.6	0.9	131
$4_4$ VS $6_4$ #2	0.02	0.3	$1.24 \cdot 10^7$	$8.80 \cdot 10^5$	0.07	-5444	24.91	14.2	0.9	193
$4_4$ VS $6_4$ #3	0.02	0.3	$1.04 \cdot 10^7$	$1.07 \cdot 10^6$	0.10	-6112	45.66	11.6	1.0	183
$4_4$ VS $6_5$ #1	0.009	0.1	$3.32 \cdot 10^7$	$5.31 \cdot 10^6$	0.16	-6171	52.12	13.2	1.0	283
$4_4$ VS $6_5$ #2	0.016	0.3	$3.64 \cdot 10^7$	$3.88 \cdot 10^6$	0.11	-5691	26.45	15.5	0.9	534
$4_4$ VS $6_5$ #3	0.016	0.3	$2.36 \cdot 10^7$	$2.02 \cdot 10^6$	0.09	-6530	30.51	11.8	0.9	316
$4_4$ VS $6_6$ #1	0.02	0.3	$3.38 \cdot 10^7$	$2.94 \cdot 10^6$	0.08	-6580	23.09	13.2	1.1	570
$4_4$ VS $6_6$ #2	0.02	0.3	$5.19 \cdot 10^7$	$4.32 \cdot 10^6$	0.13	-5937	34.59	14.2	1.0	570
$4_4$ VS $6_6$ #3	0.01	0.1	$4.04 \cdot 10^7$	$2.61 \cdot 10^6$	0.06	-6557	20.01	12.8	1.1	458
$4_4$ VS $6_7$ #1	0.02	0.3	$5.31 \cdot 10^7$	$1.12 \cdot 10^7$	0.21	-7482	60.25	10.2	0.9	892
$4_4$ VS $6_7$ #2	0.01	0.2	$5.27 \cdot 10^7$	$1.29 \cdot 10^7$	0.24	-7616	66.80	9.78	1.0	557
$4_4$ VS $6_7$ #3	0.01	0.2	$2.01 \cdot 10^7$	$3.24 \cdot 10^6$	0.16	-7440	67.97	8.46	1.1	320
$4_4$ VS $6_8$ #1	0.008	0.1	$2.02 \cdot 10^7$	$3.12 \cdot 10^6$	0.15	-9257	94.28	2.37	0.9	147
$4_4$ VS $6_8$ #2	0.018	0.3	$1.62 \cdot 10^7$	$1.49 \cdot 10^6$	0.09	-8392	45.04	4.84	0.9	260
$4_4$ VS $6_8$ #3	0.018	0.2	$2.68 \cdot 10^7$	$2.02 \cdot 10^6$	0.07	-9027	44.97	3.71	0.8	390

b) With FITC-spm 15

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n	c
4 <sub>4</sub> VS 15 #1	0.10	1.50	1.64 10 <sup>6</sup>	1.44 10 <sup>5</sup>	0.09	-5689	32.34	9.35	1.13	169
4 <sub>4</sub> VS 15 #2	0.10	1.50	1.07 10 <sup>6</sup>	1.24 10 <sup>5</sup>	0.11	-5996	53.14	7.49	1.06	113
4 <sub>4</sub> VS 15 #3	0.10	1.50	2.30 10 <sup>6</sup>	3.12 10 <sup>5</sup>	0.13	-5688	44.79	10.0	1.11	346

c) Interaction with metals

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	$\Delta K$	$\Delta K/K$	$\Delta H$	$\Delta(\Delta H)$	$\Delta S$	n	c
4 <sub>4</sub> VS CaCl <sub>2</sub> #1	1.1	15.0	4.16 10 <sup>4</sup>	1.62 10 <sup>3</sup>	0.04	3372	13.66	32.4	1.18	54
4 <sub>4</sub> VS CaCl <sub>2</sub> #2	1.0	15.0	3.75 10 <sup>4</sup>	2.46 10 <sup>3</sup>	0.06	6040	58.28	41.2	0.72	40
4 <sub>4</sub> VS CaCl <sub>2</sub> #3	1.0	15.0	6.90 10 <sup>4</sup>	4.99 10 <sup>3</sup>	0.07	4966	38.87	38.8	0.79	54
4 <sub>4</sub> VS EuCl <sub>3</sub>	0.22	3.0	5.01 10 <sup>5</sup>	4.29 10 <sup>4</sup>	0.09	6335	41.39	47.3	1.19	131
4 <sub>4</sub> VS ZnCl <sub>2</sub>	1.1	15.0	2.30 10 <sup>4</sup>	1.91 10 <sup>3</sup>	0.08	3759	47.54	32.6	0.89	21
4 <sub>4</sub> VS NiCl <sub>2</sub>	0.5	7.5	1.37 10 <sup>4</sup>	1.77 10 <sup>3</sup>	0.13	2228	100.9	26.4	0.73	5
4 <sub>4</sub> VS MnCl <sub>2</sub>	1.0	15.0	4.21 10 <sup>4</sup>	1.47 10 <sup>3</sup>	0.03	5068	23.98	38.1	0.76	32
4 <sub>4</sub> VS CoCl <sub>2</sub>	1.0	15.0	1.31 10 <sup>4</sup>	1.02 10 <sup>3</sup>	0.08	3390	67.60	30.2	0.69	9
4 <sub>4</sub> VS LaCl <sub>3</sub>	1.0	15.0	1.36 10 <sup>5</sup>	2.91 10 <sup>4</sup>	0.21	8165	147.9	50.9	0.76	115
4 <sub>4</sub> VS SmCl <sub>3</sub>	1.0	15.0	6.98 10 <sup>5</sup>	2.89 10 <sup>5</sup>	0.19	9140	174.6	57.4	0.66	274
4 <sub>4</sub> VS NdCl <sub>3</sub>	1.0	15.0	4.71 10 <sup>5</sup>	1.19 10 <sup>5</sup>	0.25	8546	121.7	54.6	0.71	334

d) Interaction with other amines (HistNH<sub>2</sub> 10 et 4- aminobutanol 12)

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	ΔK	ΔK/K	ΔH	Δ(ΔH)	ΔS	n	c
4 <sub>4</sub> VS10	1.0	7.0	6.83 10 <sup>3</sup>	1.78 10 <sup>3</sup>	0.26	-442.8	43.11	16.1	0.54	4
4 <sub>4</sub> .Ca VS 12	1.0	15.0	5.47 10 <sup>3</sup>	6.15 10 <sup>2</sup>	0.11	-4219	277.1	2.96	0.46	3
4 <sub>4</sub> VS 12	0.10	1.50	2.23 10 <sup>5</sup>	1.67 10 <sup>4</sup>	0.07	-1.08 10 <sup>4</sup>	127.4	-11.7	0.94	21

C) Substitution from dynarène-ethylènediamine complex 4<sub>4</sub>-6<sub>2</sub>

Host Vs Guest	[Host]	[Guest]	K	ΔK	ΔK/K	ΔH	Δ(ΔH)	ΔS	n	c
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 7 #1	0.20	3.0	1.87 10 <sup>6</sup>	1.97 10 <sup>5</sup>	0.10	-3427	22.17	17.2	0.69	260
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 7 #2	0.050	0.750	6.83 10 <sup>6</sup>	5.92 10 <sup>5</sup>	0.09	-4656	25.43	15.7	0.68	231
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 7 #3	0.050	0.750	1.34 10 <sup>7</sup>	1.85 10 <sup>6</sup>	0.13	-4842	31.78	16.4	0.72	483
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 8 #1	0.20	3.0	7.15 10 <sup>5</sup>	1.14 10 <sup>5</sup>	0.16	-4178	59.08	12.8	0.66	98
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 8 #2	0.20	3.0	2.56 10 <sup>6</sup>	4.85 10 <sup>5</sup>	0.19	-4475	59.98	14.3	0.69	174
4 <sub>4</sub> -6 <sub>2</sub> VS 8 #3	0.20	3.0	3.24 10 <sup>6</sup>	5.78 10 <sup>5</sup>	0.17	-4730	51.92	13.9	0.78	252

## IV) Combinatorial libraries – HPLC analysis

### 1) Methods

Analysis was carried out with an HPLC Agilent 1260 Infinity system equipped with a quaternary pump, an auto-sampler and a diode array detector. Runs were performed at 30°C. The wavelengths for the detection were 210 and 250 nm.

**Method A:** Agilent Eclipse Plus C<sub>8</sub>, 3.5 μm, 4.6 x 150 mm, V<sub>inj</sub> = 3 μL, flow 1 mL/min. Gradient water + 0.05 % TFA / MeCN + 0.05 % TFA in 25 min method (t<sub>0</sub> 80/20, t<sub>5</sub> 60/40, t<sub>8</sub> 0/100).

**Method B:** Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 100 A 2.6 μm 100 x 2.1 mm V<sub>inj</sub> = 10 μL, flow 0.5 mL/min. Gradient water + 0.1 % formic acid / MeCN + 0.1 % formic acid in 19 min method (t<sub>0</sub> 100/0, t<sub>1</sub> 100/0, t<sub>15</sub> 40/60, t<sub>17</sub> 0/100, t<sub>19</sub> 0/100)

**Method C:** Restek Raptor Biphenyl, 2.7 μm, 3.00 x 50 mm, V<sub>inj</sub> = 5 μL, flow 0.8 mL/min. Gradient water + 0.1 % formic acid / MeOH + 0.1 % formic acid in 17 min method (t<sub>0</sub> 70/30, t<sub>15</sub> 0/100, t<sub>17</sub> 0/100)

## 2) Procedures

### A) Dynamic combinatorial libraries with building block 4, 5 or 4 and 5 with or without template

Dynamic combinatorial screening was conducted as follows: a solution of building block (4 mM) and a chosen template  $T_x$  (1 mM) was dissolved in water. The pH was adjusted to 7.4 with aliquots of NaOH and building blocks could form cycles through the formation of disulfide bridges in presence of air and are analysed until equilibrium. Studies on dynarenes  $4_n$  were performed with *method A*, studies on  $5_n$  and  $4_n5_n$  were carried out with *method B*. All template tested for the chemical library with **5** alone and **4** and **5** together are summed up in the appendix A.

### B) Sulfur extrusion analysis

**Direct substitution reactions:** Dynamic chemical libraries was conducted as follows: a solution of building blocks (each 1 mM, except if there is modification) were dissolved with water. pH was adjusted to 7.4 with aliquots of NaOH. *Method A* was used for the analysis until equilibrium.

**Extrusion with phosphorous reagent :** Dynamic chemical libraries were conducted as follows: a solution of building block 1mM and the corresponding equivalent of phosphine was dissolved with water. The pH was adjusted to 7.4 with aliquots of NaOH. *Method A* was used for the analysis until equilibrium.

**Spontaneous extrusion :** Chemical libraries were made with building block 4 (1 mM) and 47 or 48 (1 mM) in water. pH was adjusted at 7.4. *Method A* was used for the analysis with LC/MS.

**Optimisation of spontaneous extrusion:** Dynamic chemical libraries were conducted as follows: a solution of building blocks (each 1mM). *Method C* was applied for those applications.

## V) Cristallographic structure

X-ray quality crystals were obtained using hanging drop vapor-diffusion method in 24-well Linbro-style plates. The drops were equilibrated against 500  $\mu$ l of crystallisation reagent in the reservoir. X-ray diffraction data were collected using Rigaku FRX micro-focus rotating anode (2.9kW) and PILATUS 200K hybrid pixel detector, at the IECB X-ray facility (UMS 3033). Diffraction data were processed using the CrysAlisPro package. The structure was solved with *Shelxt1* and refined by full-matrix least-squares method on F2 with *Shelxl-20142* within the *Olex2* suite. Non-hydrogen atoms for the host and guest molecule were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were added for the host and guest in idealised positions using HFIX and refined with riding models. For few of the solvent molecules, positions of hydrogen were determined. DFIX, DELU, SIMU and ISOR instructions were used in order to model displacement parameters and geometry of molecules. FVAR function was used during the refinement of occupancy factors of disordered parts. The final cif files were examined using IUCR's checkcif algorithm. The B-level alerts (PLAT306\_ALERT\_2\_B) Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing?) corresponded to hydration water molecules. The thermal nature of water molecules and the level of apparent electron density assured their modelling. Structures have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).

Experimental reagent for crystallisation and crystallographic datas :

	Crystallization reagent	Crystallogenesi	
		Duration	Crystal size
<b>4<sub>4</sub></b>	2M Ammonium sulfate	1 day	(0.15 x 0.05 x 0.05) mm
<b>4<sub>4</sub></b>	2.5M <b>1,6-Hexanediol (14)*</b> , 0.1M tri-sodium citrate (pH 5.6)	3 days	(0.40 x 0.10 x 0.05) mm
<b>4<sub>4</sub> – LysNH<sub>2</sub></b> <b>(Racemic mixture)</b>	1.2M Ammonium sulfate, 0.1M HEPES (pH 7.5), 2% w/v Polyethylene glycol 400	1 day	(0.07 x 0.03 x 0.03) mm

Structures	<b>4<sub>4</sub></b>	<b>4<sub>4</sub> - 14</b>	<b>4<sub>4</sub> – LysNH<sub>2</sub></b>
Chemical Formula	C32 H18 O30 S8	C19 H27 Na3 O19 S4	C38 H23 N3 O26 S8
Formula weight	1138.94	757.89	1194.07
Temperature	100 K	100 K	100 K
Wavelength	1.5418 Å	1.5418 Å	1.5418 Å
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 <sub>1</sub>	P2/n	Pn
Unit cell dimensions	a = 10.248 (3) Å	a = 12.130 (2) Å	a = 11.058 (10) Å
	b = 23.721 (5) Å	b = 10.737 (2) Å	b = 10.713 (10) Å
	c = 11.087 (3) Å	c = 23.764 (4) Å	c = 21.643 (3) Å
	β = 115.082 (3)°	β = 97.864 (3)°	β = 91.862 (10)°
Volume	2441.25 (12) Å <sup>3</sup>	3066.22 (9) Å <sup>3</sup>	2562.87 (5) Å <sup>3</sup>
Z	2	4	2
Density g cm <sup>-3</sup>	1.549	1.642	1.547
μ/mm <sup>-1</sup>	4.241	4.021	4.028
Total reflections	17120	22003	36980
Unique data [Fo > 2σFo]	8784	6046	8551
R <sub>int</sub>	0.0329	0.0177	0.0343
Parameters/restraints	669/43	489/18	661/31
R1, wR2	0.0594, 0.1776	0.0396, 0.1665	0.0633, 0.1818
Goodness-of-fit	1.064	1.615	0.987
CCDC number	1554744	1554745	1554746

## VI) NMR Titration

A solution of the host (1 mM in 600  $\mu\text{L}$  of  $\text{D}_2\text{O}$ , adjusted pD at 7.4 with NaOD) was prepared. A solution of TMSP used as a calibrant was prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  at 0.6 M and 1  $\mu\text{L}$  was added to the tube (1 eq.). The NMR spectrum was recorded (64 scans). A solution of guest (15 times more concentrated, adjusted pD at 7.4 with NaOD) was also prepared. Subsequently small portions of the guest were added to the solution in order to reach different equivalents between host and guest. After each addition of the guest, NMR spectra were recorded. The shift of the signal of host's proton was followed. The additions of guests were done in order to reach a large excess of guests. Binding constants were obtained by curve-fitting of ( $\Delta\delta=f([\text{Guest}])$ ) where  $\Delta\delta$  is the variation of the chemical shift, using Origin software of Bindfitt. The methodology followed for the curve-fitting was developed by Dr. Septavaux using empirical equation described by Fielding. Fitting are reported in the appendix D.

## VII) RTCA experiments

### 1) General procedure for Cell Cycle Analysis with a single molecule: $\text{IC}_{50}$ measurement

HeLa cells were grown in 16-well plates,  $1 \times 10^6$  cells per well. Cells were kept in an incubator containing 5%  $\text{CO}_2$ , at 37 °C during the experiment and the Cell Indexes of the wells were recorded from the beginning (0 hours) continuously with Real Time Cell Analyzer Method (RTCA). Molecules used as a drug was dissolved in the cell culture medium before the experiment (range from 1  $\mu\text{M}$  to 2 mM). After 19-20 hours the cells were treated with the sample solutions and incubated for further 72 hours. The Cell Index of all samples were normalised to the time of treatment (black line), thus at this time point the normalised cell index of each sample is 1. The normalised cell index is expressed in the function of time. The inhibitory concentration corresponding to the 50% proliferation inhibitions ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated approx. 12 hours after treatment (red line).  $\text{IC}_{50}$  value is calculated by the RTCA's Software.

For macrocycle  $4_4$  :

Time of injection	Time of analysis	$\text{IC}_{50}$ value
20 hours	32 hours	72.6 $\mu\text{M}$ ( $r^2 = 0,981$ )
27 hours	39 hours	84.7 $\mu\text{M}$ ( $r^2 = 0,961$ )
21 hours	33 hours	78.9 $\mu\text{M}$ ( $r^2 = 0.946$ )
27 hours	39 hours	77.3 $\mu\text{M}$ ( $r^2 = 0.995$ )

For macrocycle  $4_3$  :

Time of injection	Time of analysis	$\text{IC}_{50}$ value
24 hours	36 hours	2.68 mM ( $r^2 = 0,921$ )
24 hours	36 hours	1.64 mM ( $r^2 = 0,964$ )
21 hours	33 hours	2.46 mM ( $r^2 = 0.946$ )

For macrocycle **CB[7]** :

Time of injection	Time of analysis	IC <sub>50</sub> value
24 hours	36 hours	24.5 mM ( $r^2 = 0,859$ )
21 hours	33 hours	3.36 M ( $r^2= 0.931$ )
20 hours	32 hours	Undefined

For building block **4** :

Time of injection	Time of analysis	IC <sub>50</sub> value
24 hours	36 hours	0.570 mM ( $r^2 = 0.940$ )
22 hours	34 hours	0.452 mM ( $r^2= 0.980$ )
22 hours	34 hours	0.601 mM ( $r^2= 0.964$ )

For terephthalic acid **14**:

Time of injection	Time of analysis	IC <sub>50</sub> value
24 hours	39 hours	Undefined

For the complex dynarene **4** – spermine **8**:

Time of injection	Time of analysis	IC <sub>50</sub> value
19 hours	31 hours	304 $\mu$ M ( $r^2 = 0.938$ )
22 hours	34 hours	128 $\mu$ M ( $r^2= 0.931$ )
24 hours	36 hours	178 $\mu$ M ( $r^2= 0.996$ )

## 2) General procedure for Cell Cycle Analysis with precomplexed **4<sub>4</sub>**

HeLa cells were grown in 16-well plates,  $1 \times 10^6$  cells per well. Cells were kept in an incubator containing 5% CO<sub>2</sub>, at 37 °C during the experiment and the Cell Indexes of the wells were recorded from the beginning (0 hours) continuously with Real Time Cell Analyzer Method (RTCA). **4<sub>4</sub>** and the ligand (Spermine, spermidine, putrescine) were dissolved in the cell culture medium before the experiment. 19-20 hours the cells were treated with the sample solutions and incubated for further 72 hours. Two wells contained no drug, two well contained **4<sub>4</sub>** 1 mM without any ligands and nine wells containing complexes with **4<sub>4</sub>** 1 mM and ligands (3 wells for each ration 1/0.5; 1/1 and 1/2). Comparative analysis has been performed 12 hours after the injection and normalisation. Data were obtained as duplicate or triplicate.

## VIII) Microscopy

HeLa cells were seeded on a coated cover glass in a 12-well plate at a density of  $5.10^4$  cells per well in medium containing DMEM medium and incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 24 h. The culture medium was replaced with 600  $\mu$ L of the sample solution (FITC-spm **15** or A4-FITC-spm **4<sub>4</sub>-15** at 10  $\mu$ M in buffer hanks balanced). The cells were incubated for 1 h at 37 °C. The incubated cells were washed three times with washing buffer (Buffer Hanks Balanced salts). A solution with Hoescht 33342 (0.1  $\mu$ g/mL) was added to detect the nucleus. The incubated cells were washed three times with washing buffer (Buffer Hanks Balanced salts). Then, they were fixed with 1% (w/v) para-formaldehyde solution and examined with a microscope Zeiss Axio Scope A1 (HBO 100 lamp). Different filters were used (for FITC spm or the complex): Excitation BP 470  $\pm$  40 nm, emission 525  $\pm$  50 nm, for Hoescht 33342: excitation 365 nm, emission 445  $\pm$  50 nm). Data were obtained at least as triplicate.

## IX) Human Spermine Synthase KIT ELISA

HeLA cells treated with macrocycle **4<sub>4</sub>** for 48 h. Analysis at 0 hours, 24 hours and 48 hours were performed. The concentration of intracellular spermine synthase was detected according to the manufacturer's instructions. Data were obtained as triplicate. Calibration curve is available on the annexe part.

## X) Protein Assay Kit

HeLA cells treated with macrocycle **4<sub>4</sub>** for 48 h. Analysis at 0 hours, 24 hours and 48 hours were performed. Pierce™ BCA Protein assay kit was used. The number of proteins was detected according to the manufacturer's instructions. Data were obtained as triplicate. Calibration curve is available in the annexe part.

## ANNEXES

## Annexe A : HPLC

Proportions des espèces générées dans la chimiothèque de 5 seul selon le template T<sub>x</sub> :

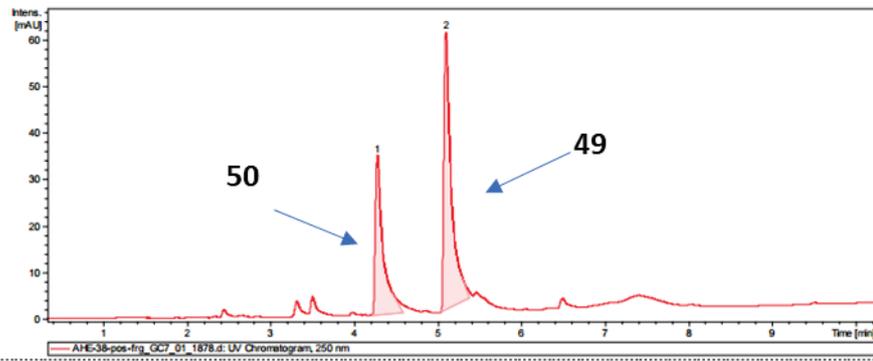
Template	Pic injection	5 <sub>3</sub>	5 <sub>4</sub>	5 <sub>3</sub> /5 <sub>4</sub>
No template	6	10	84	0.12
T <sub>1</sub>	14	8	78	0.10
T <sub>2</sub>	17	8	75	0.11
T <sub>3</sub>	4	10	86	0.12
T <sub>4</sub>	3	11	86	0.13
T <sub>5</sub>	23	8	69	0.11
T <sub>6</sub>	9	9	82	0.11
T <sub>7</sub>	9	9	81	0.11
T <sub>8</sub>	10	9	81	0.11
T <sub>9</sub>	14	10	76	0.13
T <sub>10</sub>	12	5	82	0.06
T <sub>11</sub>	15	4	80	0.05
T <sub>12</sub>	4	11	85	0.13
T <sub>13</sub>	13	9	78	0.11
T <sub>14</sub>	10	10	80	0.12
T <sub>15</sub>	6	6	86	0.07
T <sub>16</sub>	2	8	90	0.08
T <sub>17</sub>	20	9	69	0.13
T <sub>18</sub>	8	10	81	0.12
T <sub>19</sub>	9	10	81	0.12
T <sub>20</sub>	2	12	86	0.14
T <sub>21</sub>	10	9	81	0.11
T <sub>22</sub>	3	10	86	0.12
T <sub>23</sub>	6	11	83	0.13
T <sub>24</sub>	11	9	79	0.11

Proportions des espèces générées dans la chimiothèque de 5 avec 4 selon le template T<sub>x</sub>:

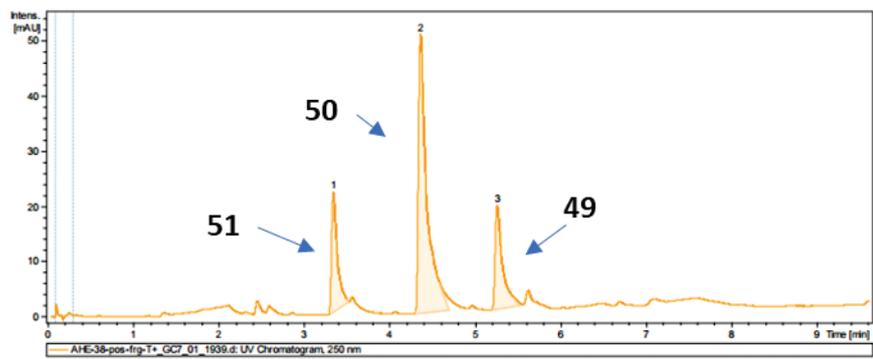
Template	4 <sub>2</sub> 5	4 <sub>3</sub> 5	4 <sub>2</sub> 5 <sub>2</sub> + 45 <sub>2</sub>	45 <sub>3</sub>	5 <sub>n</sub>	4 <sub>n</sub> + solvant
No template	8	15	14	28	1	34
T <sub>1</sub>	17	19	26	16	1	20
T <sub>2</sub>	0	33	42	7	0	18
T <sub>3</sub>	4	20	37	25	2	12
T <sub>5</sub>	5	0	34	22	5	36
T <sub>6</sub>	4	0	11	12	1	72
T <sub>7</sub>	9	4	28	27	11	21
T <sub>8</sub>	2	12	59	27	0	14
T <sub>9</sub>	3	8	18	5	22	45
T <sub>10</sub>	0	34	44	7	0	15
T <sub>11</sub>	3	19	41	24	1	11
T <sub>13</sub>	0	2	57	16	0	27
T <sub>14</sub>	1	9	56	15	0	18
T <sub>15</sub>	0	17	59	7	0	16
T <sub>17</sub>	4	4	55	24	0	13
T <sub>18</sub>	6	4	34	25	0	20
T <sub>19</sub>	8	0	48	22	0	22
T <sub>20</sub>	3	17	46	6	13	14
T <sub>21</sub>	3	18	40	23	2	13
T <sub>22</sub>	0	40	40	10	0	10
T <sub>23</sub>	11	2	38	25	0	23
T <sub>24</sub>	3	11	57	10	0	19

## Annexe B : LCMS

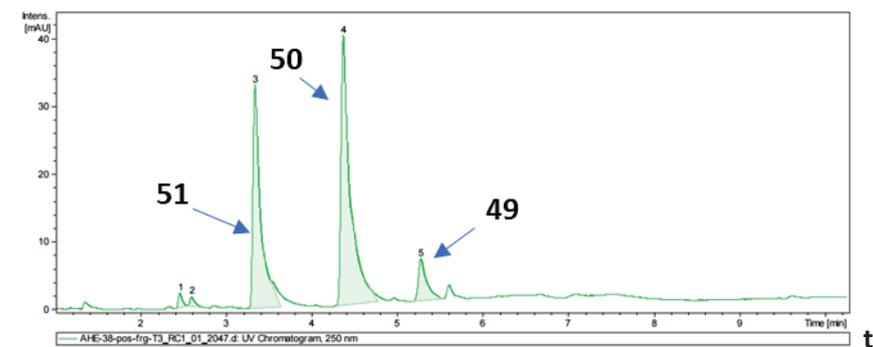
Bibliothèque 4 et 47 :



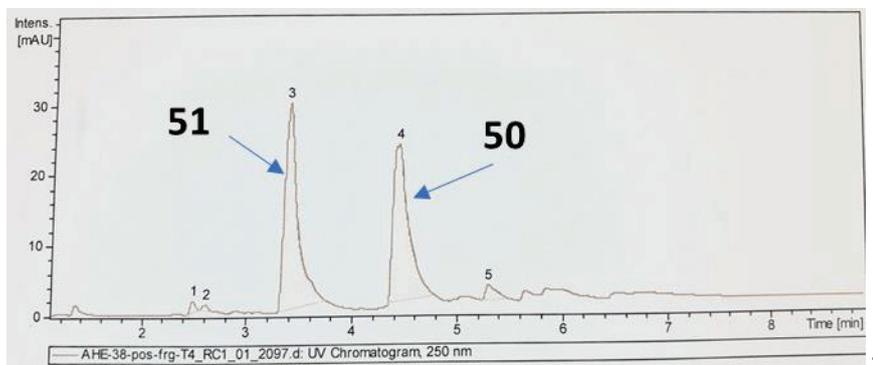
t = 7 jours



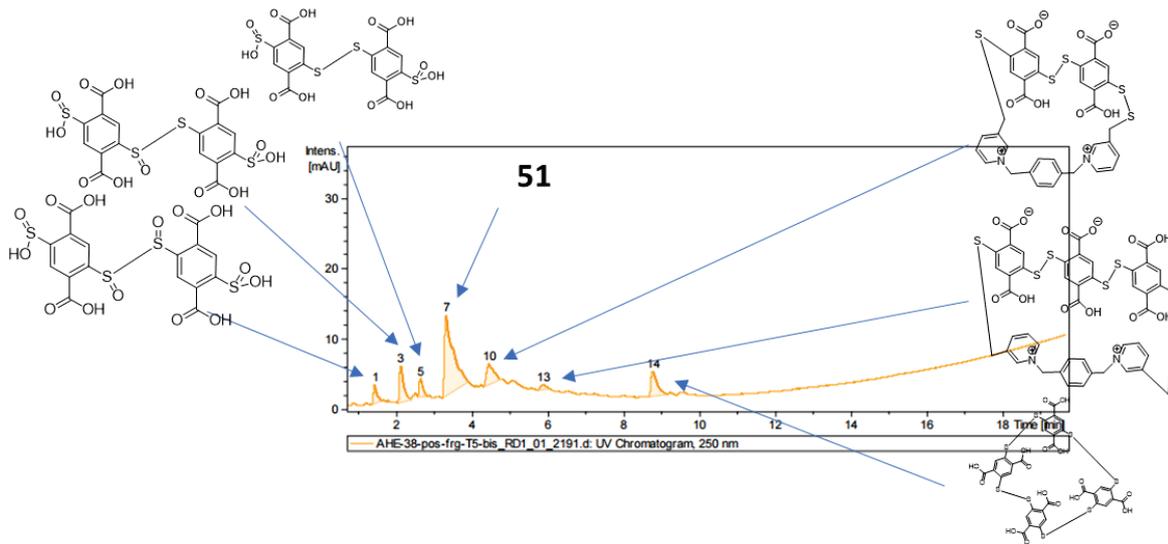
t = 24 jours



t = 33 jours

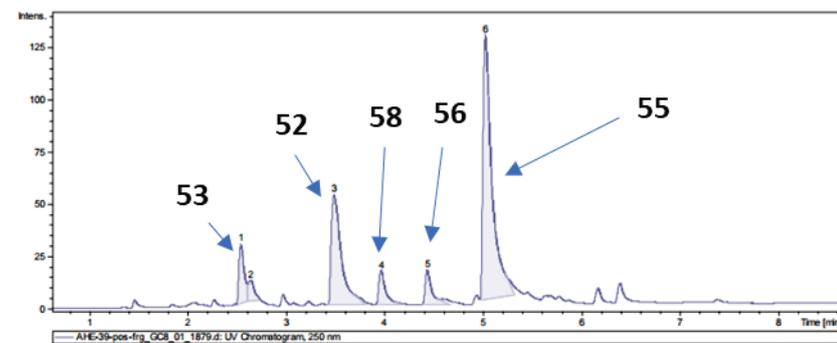


t = 42 jours

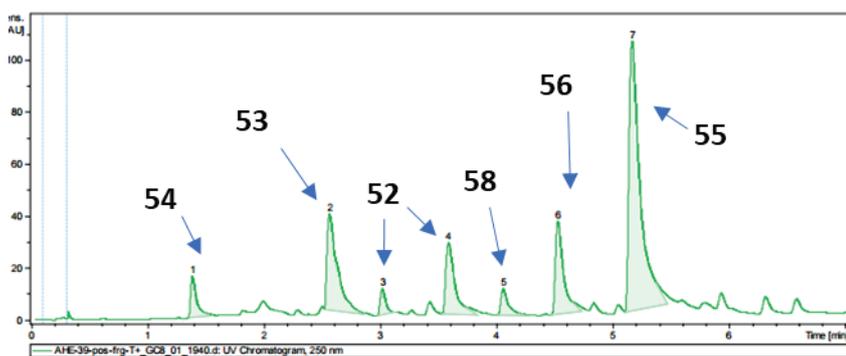


t = 59 jours

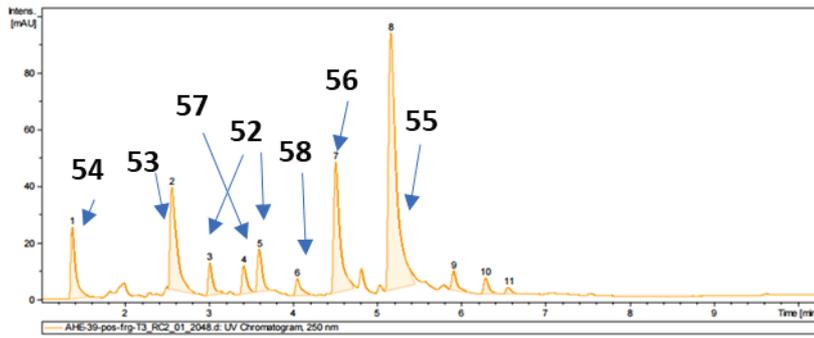
Bibliothèque 4 et 48 :



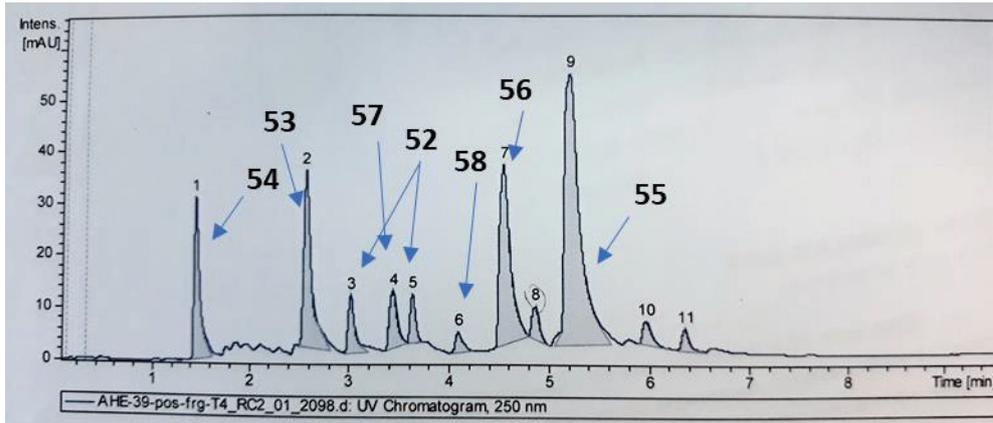
t = 7 jours



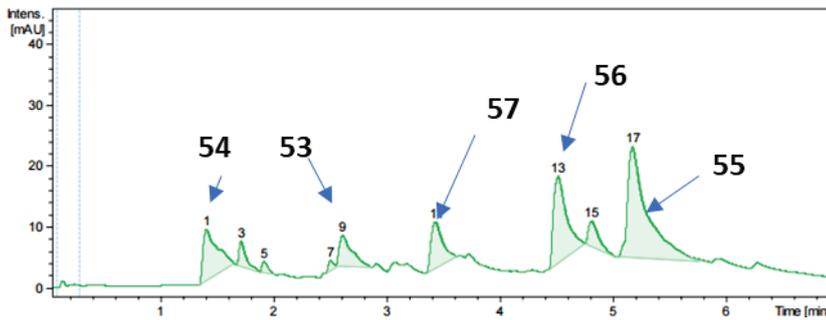
t = 24 jours



t = 33 jours



t = 42 jours

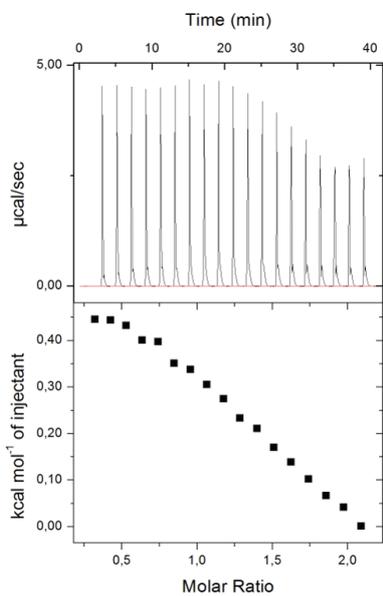


t = 69 jours

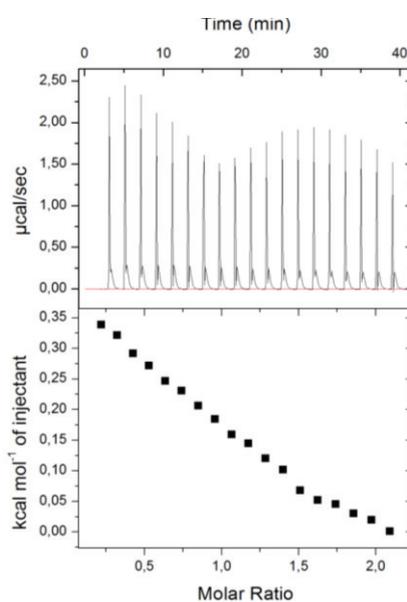
## Annexe C : thermogramme ITC

- Avec le dyn[3]arène  $4_3$ :

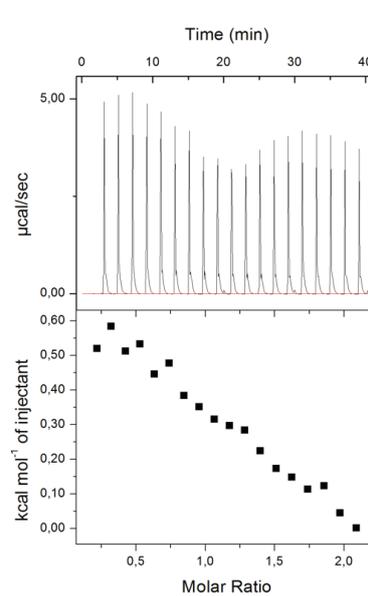
$4_3$  VS  $6_2$  (éthylènediamine)



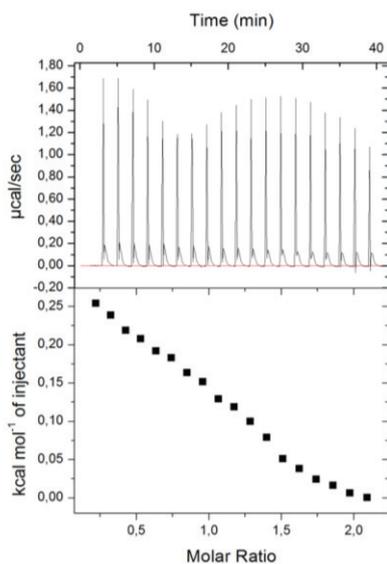
$4_3$  VS  $6_3$  (Propanediamine)



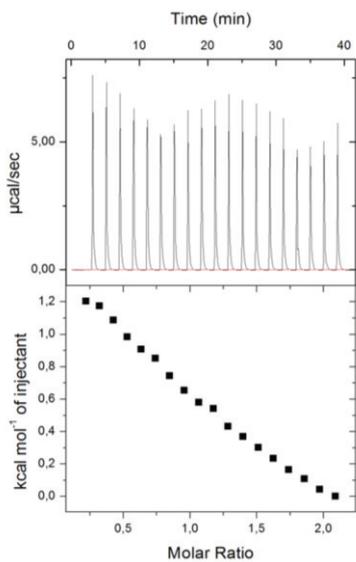
$4_3$  VS  $6_4$  (Butanediamine)



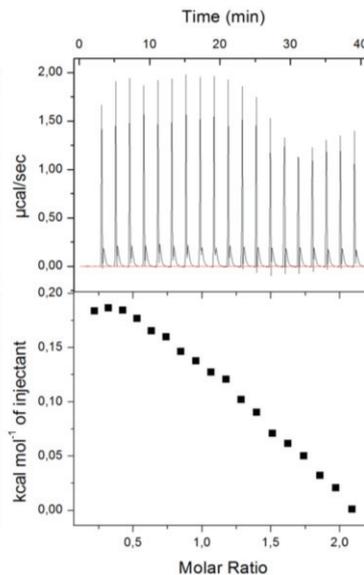
$4_3$  VS  $6_5$  (Pentanediamine)



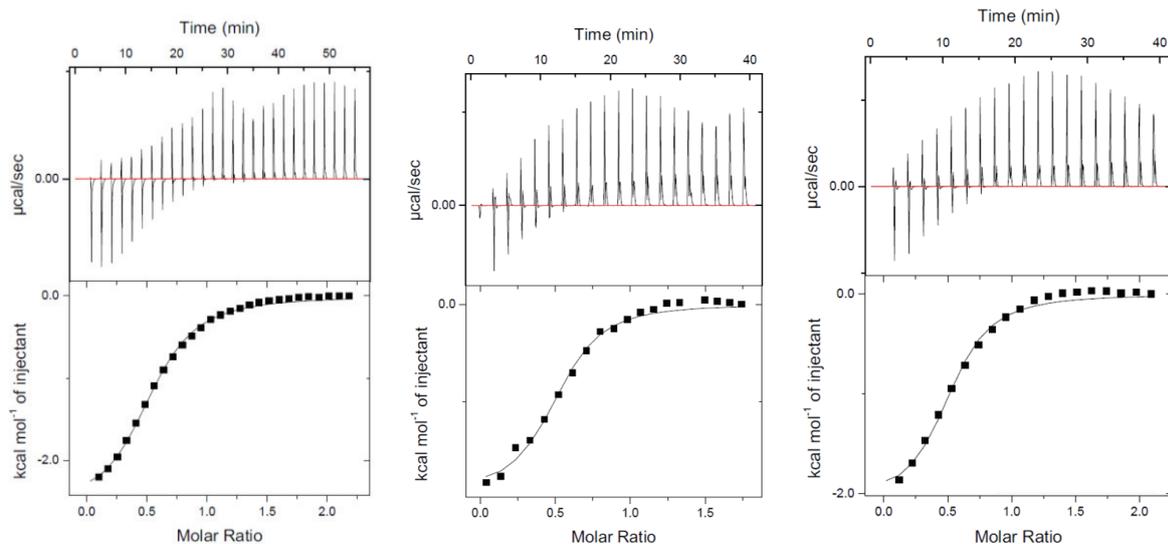
$4_3$  VS  $6_6$  (Hexanediamine)



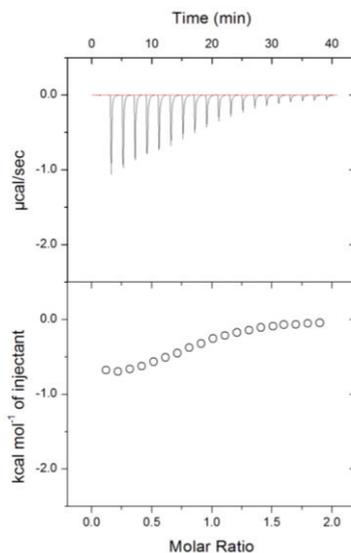
$4_3$  VS  $6_8$  (Octanediamine)



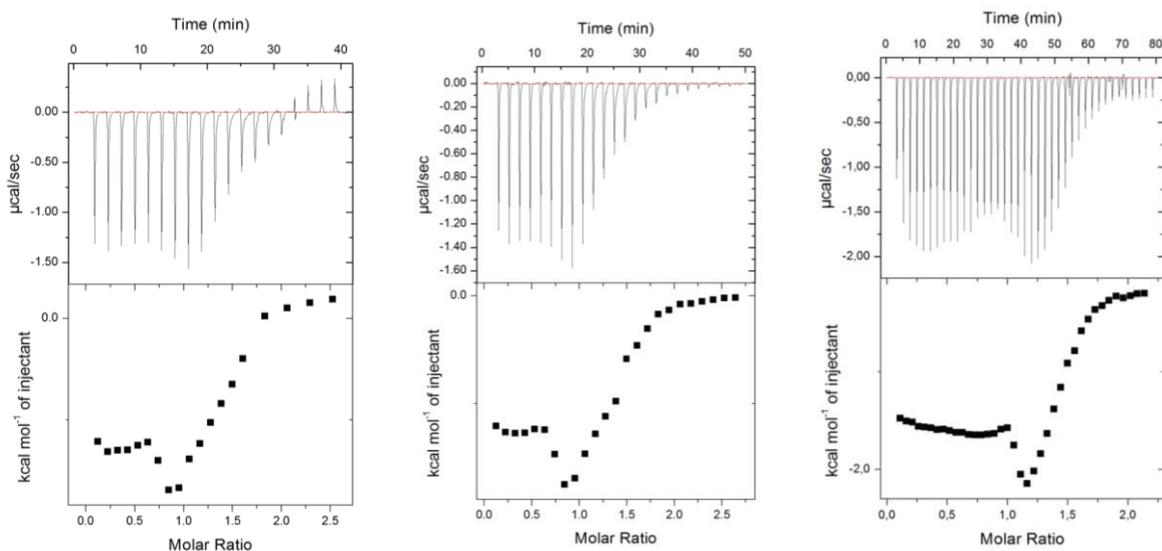
### 4<sub>3</sub> VS Heptanediamine 6<sub>7</sub>:



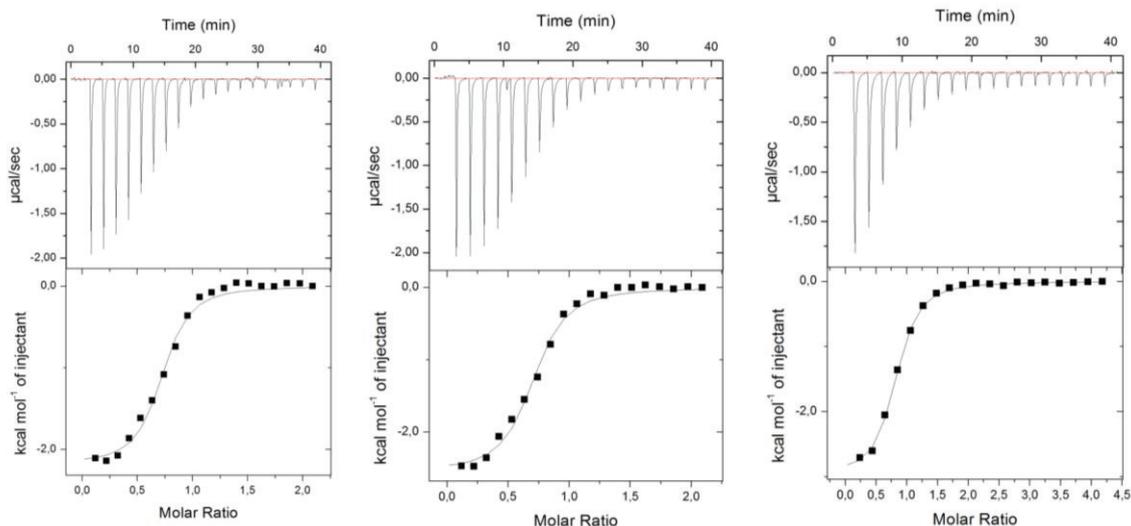
### 4<sub>3</sub> VS spermidine 7:



### 4<sub>3</sub> VS spermine 8:

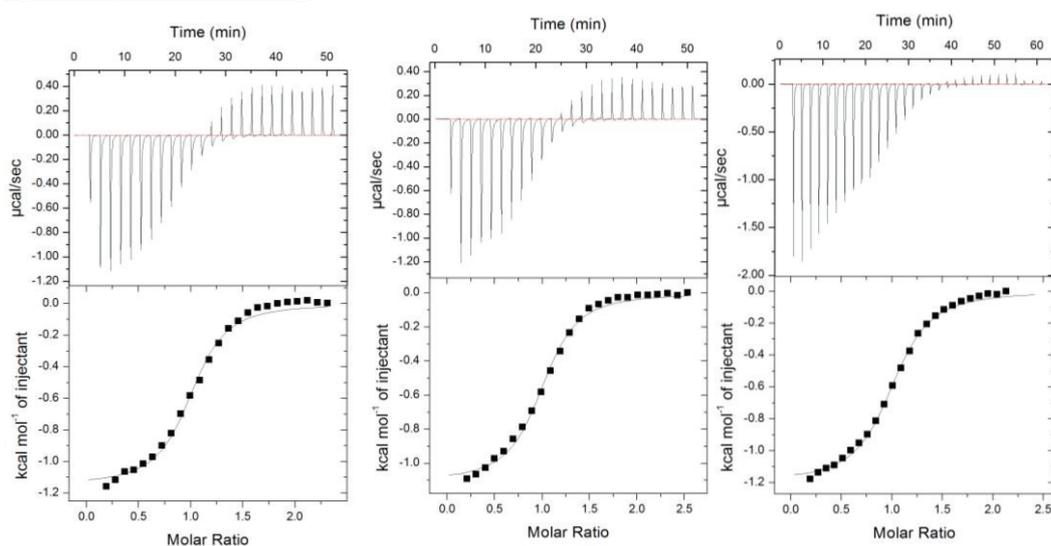


### 8 VS spermine 4<sub>3</sub>:

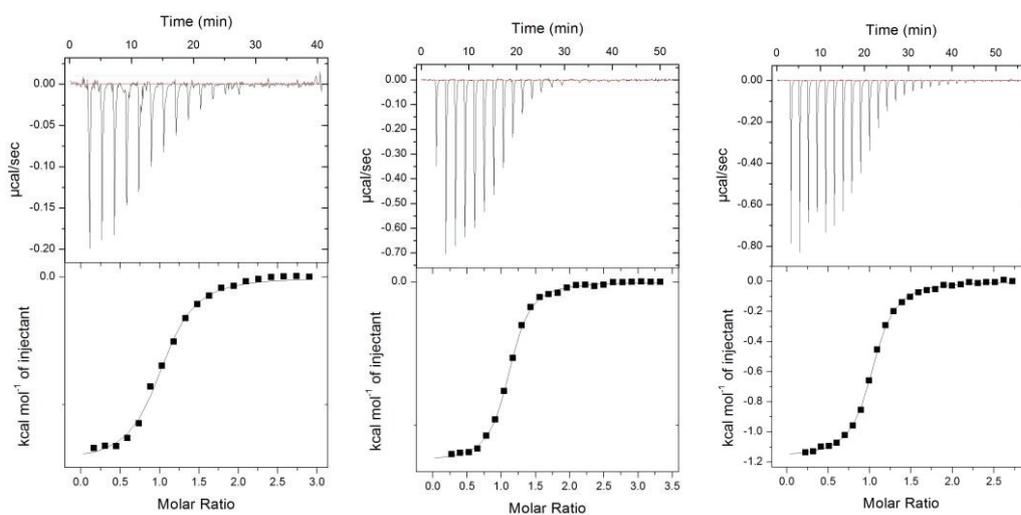


- Avec le dyn[4]arène 4<sub>4</sub>:

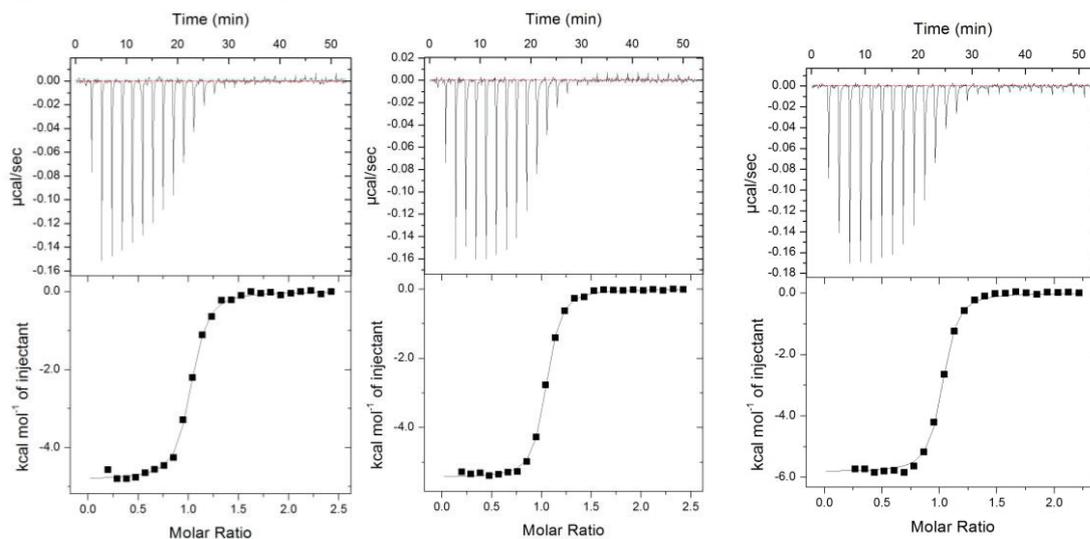
### 4<sub>4</sub> VS Ethylenediamine 6<sub>2</sub>:



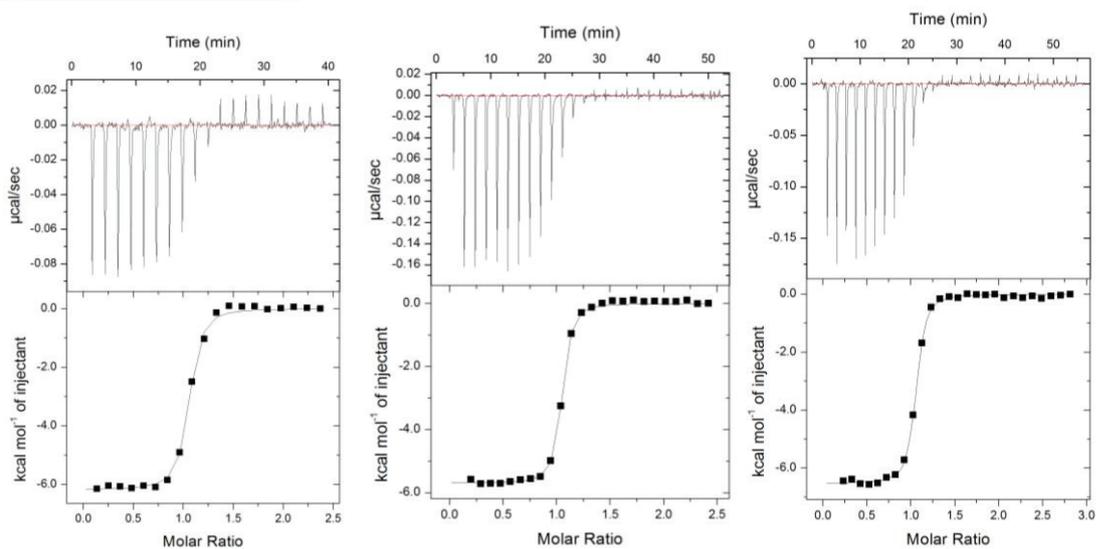
### 4<sub>4</sub> VS Propanediamine 6<sub>3</sub>:



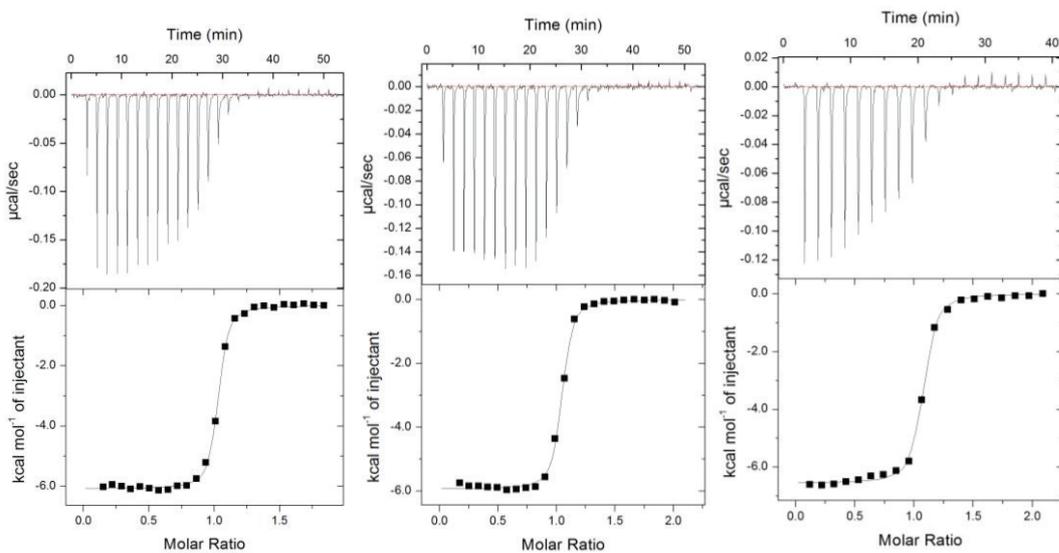
#### 4<sub>4</sub> VS Butanediamine 6<sub>4</sub>:



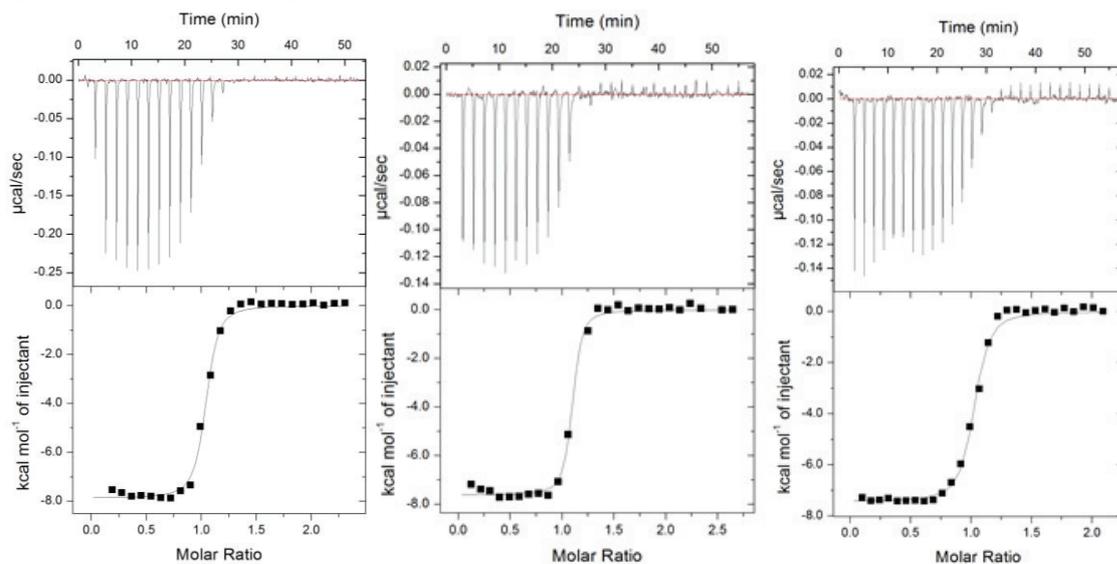
#### 4<sub>4</sub> VS Pentanediamine 6<sub>5</sub>:



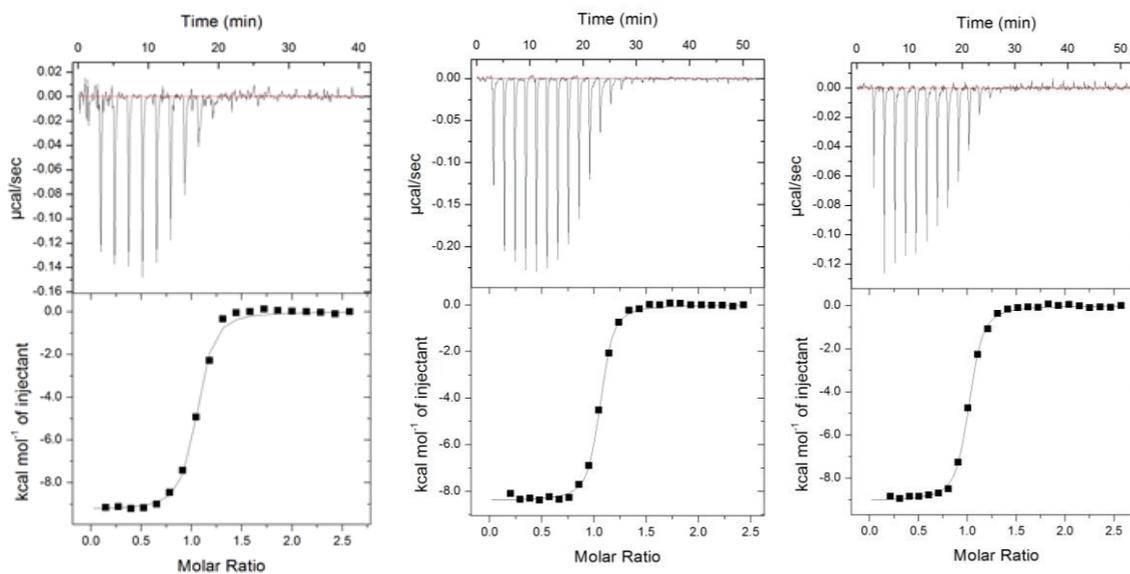
#### 4<sub>4</sub> VS Hexanediamine 6<sub>6</sub>:



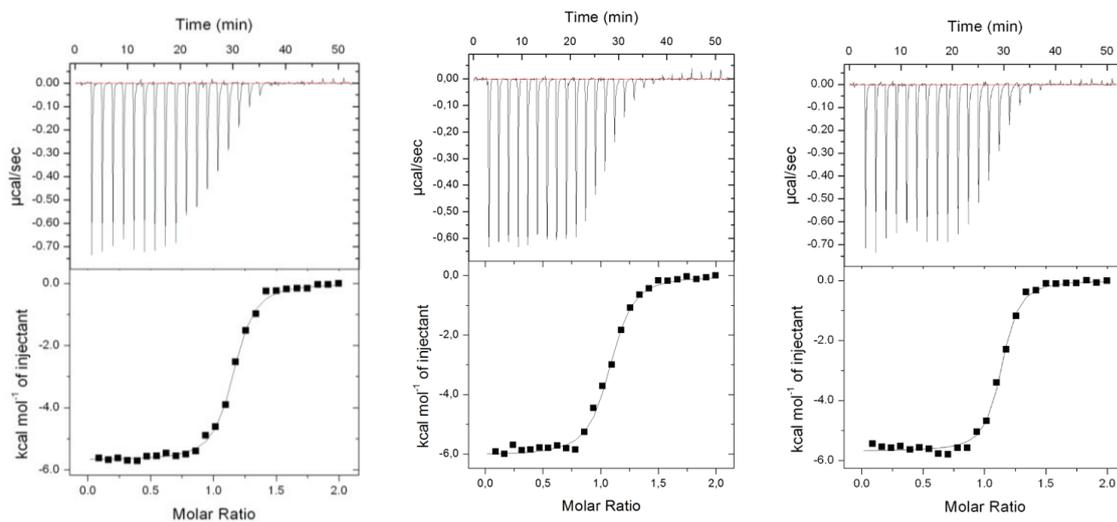
#### 4<sub>4</sub> VS Heptanediamine 6<sub>7</sub>:



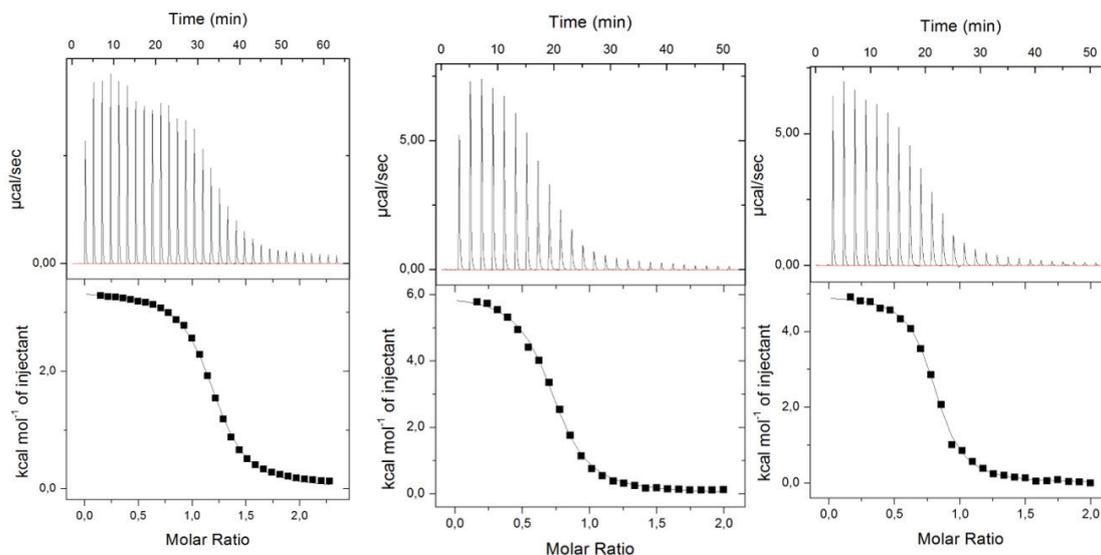
#### 4<sub>4</sub> VS Octanediamine 6<sub>8</sub>:



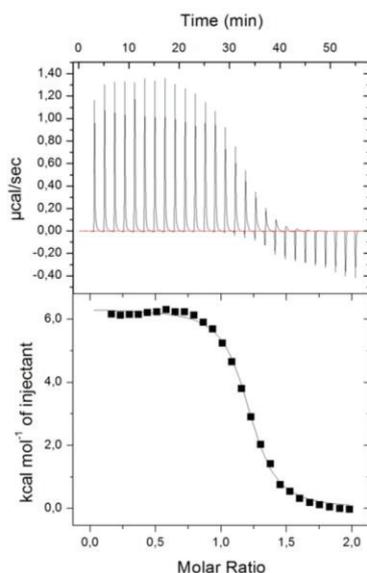
#### 4<sub>4</sub> VS FITC-spm 15:



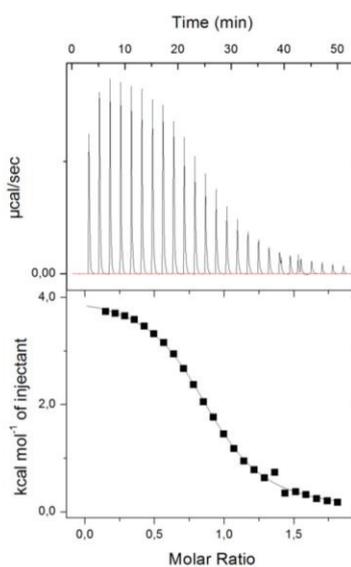
### 4<sub>4</sub> VS CaCl<sub>2</sub>:



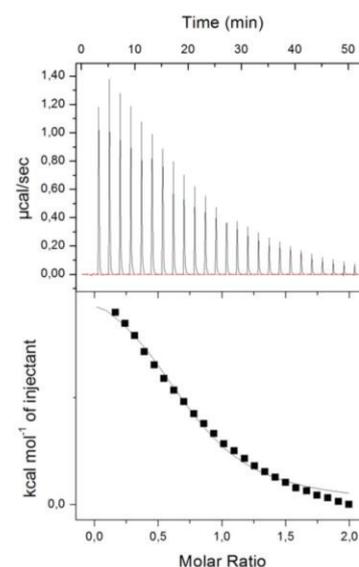
### 4<sub>4</sub> VS EuCl<sub>3</sub>:



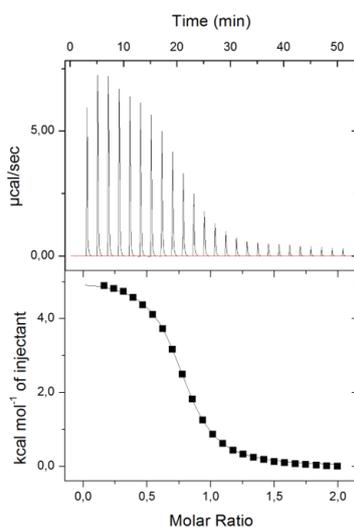
### 4<sub>4</sub> VS ZnCl<sub>2</sub>:



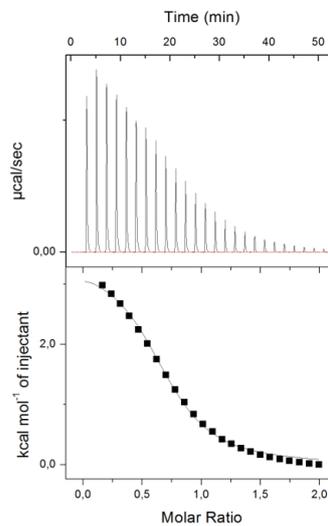
### 4<sub>4</sub> VS NiCl<sub>2</sub>:

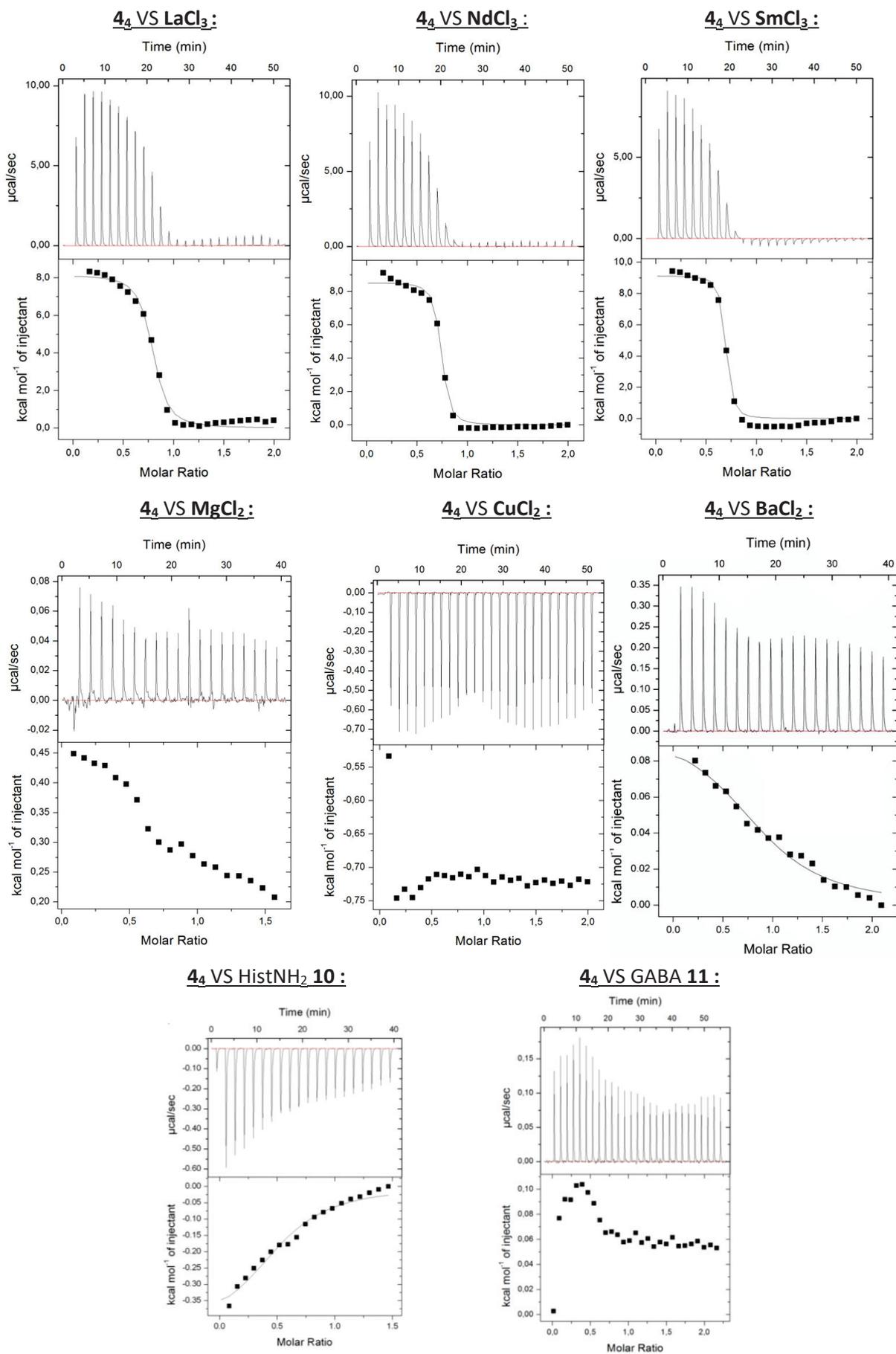


### 4<sub>4</sub> VS MnCl<sub>2</sub>:

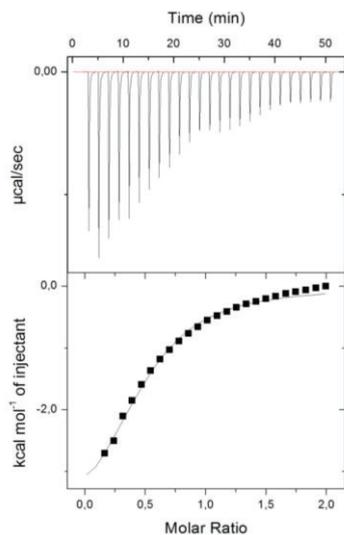


### 4<sub>4</sub> VS CoCl<sub>2</sub>:

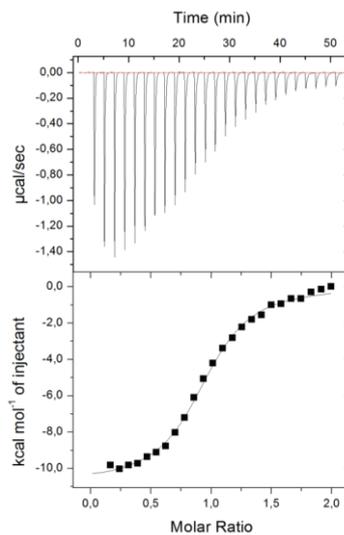




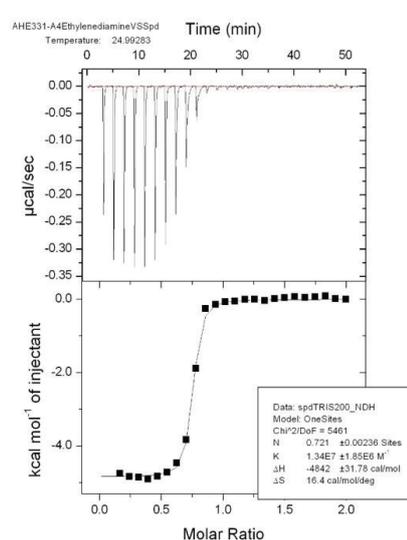
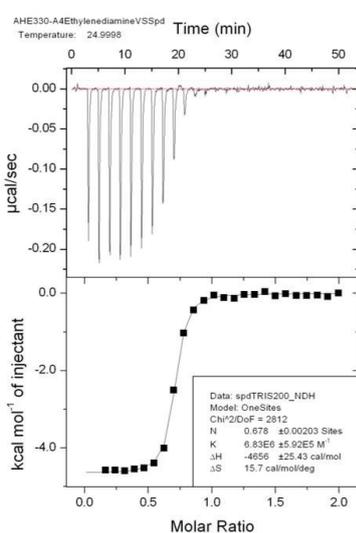
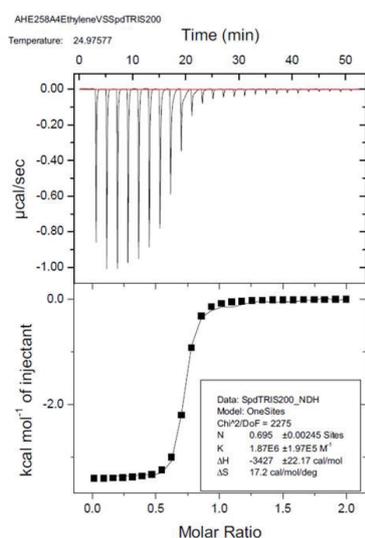
#### 4<sub>4</sub>-Ca VS 4-aminobutanol 12 :



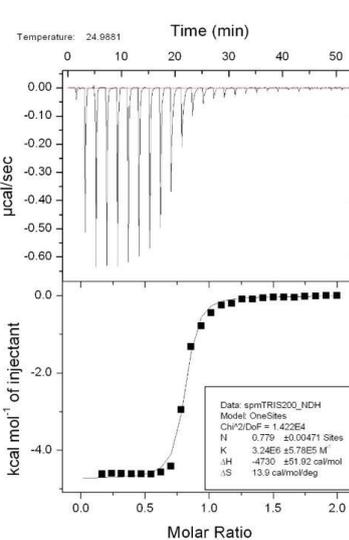
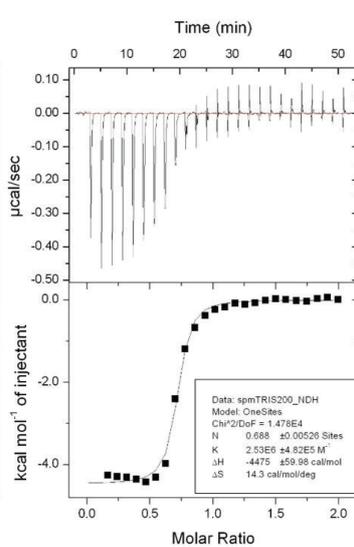
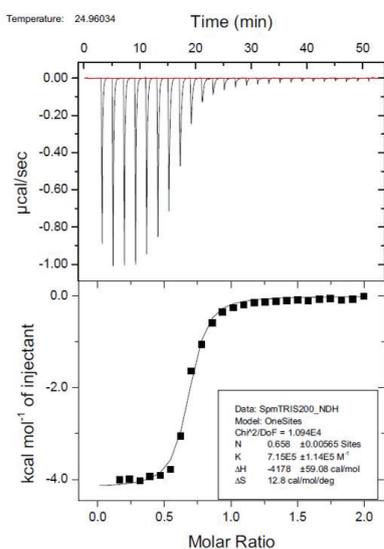
#### 4<sub>4</sub> VS 4-aminobutanol 12 :



#### 4<sub>4</sub>-6<sub>2</sub> VS spermidine 7:



#### 4<sub>4</sub>-6<sub>2</sub> VS spermine 8:



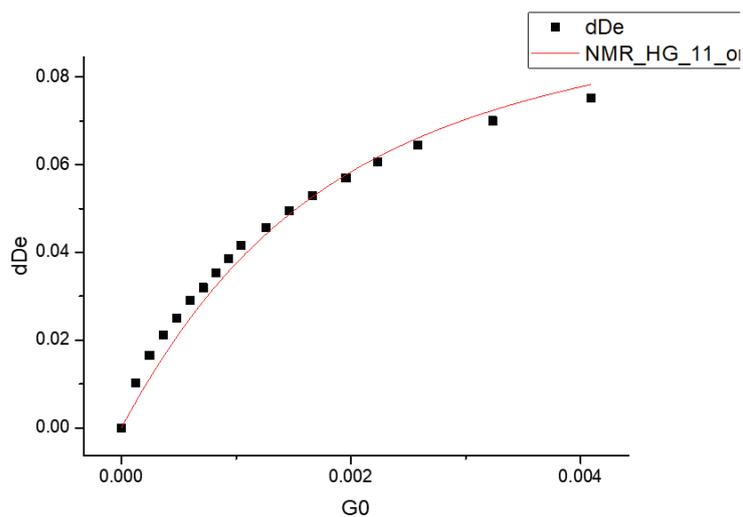
## Annexe D : Titration en RMN :

- Titration de 4<sub>4</sub> VS Histidine 9:

Hôte : [4<sub>4</sub>] = 1 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4 + 1 eq. de TMSP et invité [9] = 15 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4.

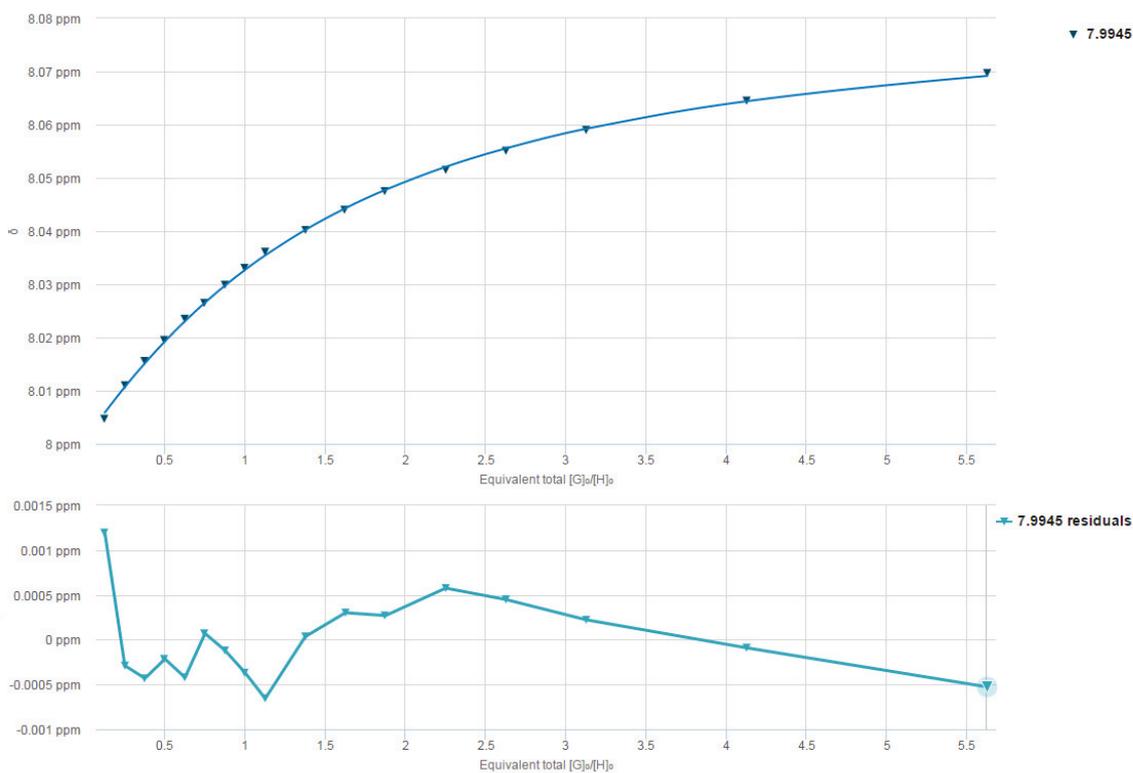
Modélisation 1:1 sur Origin :

**K<sub>a</sub> = 851.6 ± 21.7 M<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.978**



Modélisation 1:1 sur Bindfitt :

**K<sub>a</sub> = 929,7 ± 16.7 M<sup>-1</sup>**

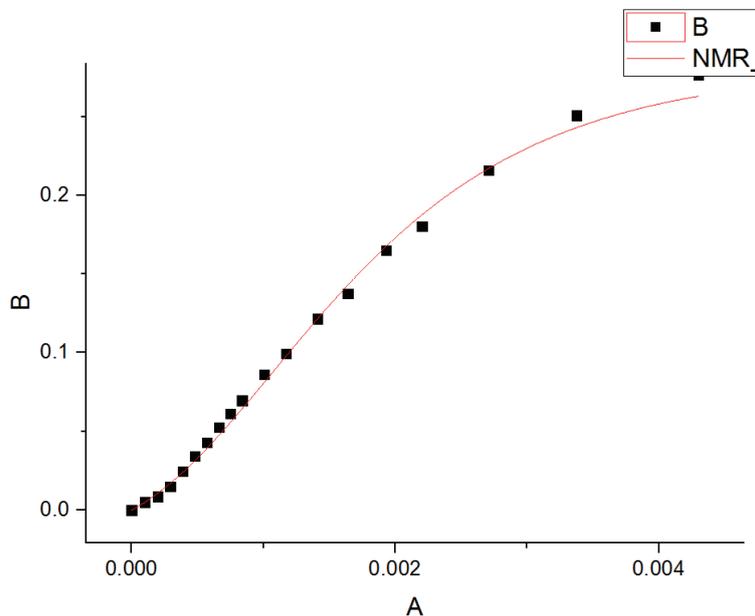


- **Titration of Histidine 9 VS (4<sub>4</sub> + CaCl<sub>2</sub>):**

Hôte : [9] = 1 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4 + 1 eq. de TMSP et invité : [4<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub>] = 15 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4.

Modélisation 1:2 (1 Histidine 9 pour 2 complexes 4<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub>) sur Origin :

$K_{a1} = 9.8 \cdot 10^1 \pm 8.4 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}$  et  $K_{a2} = 2.0 \cdot 10^3 \pm 1.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$

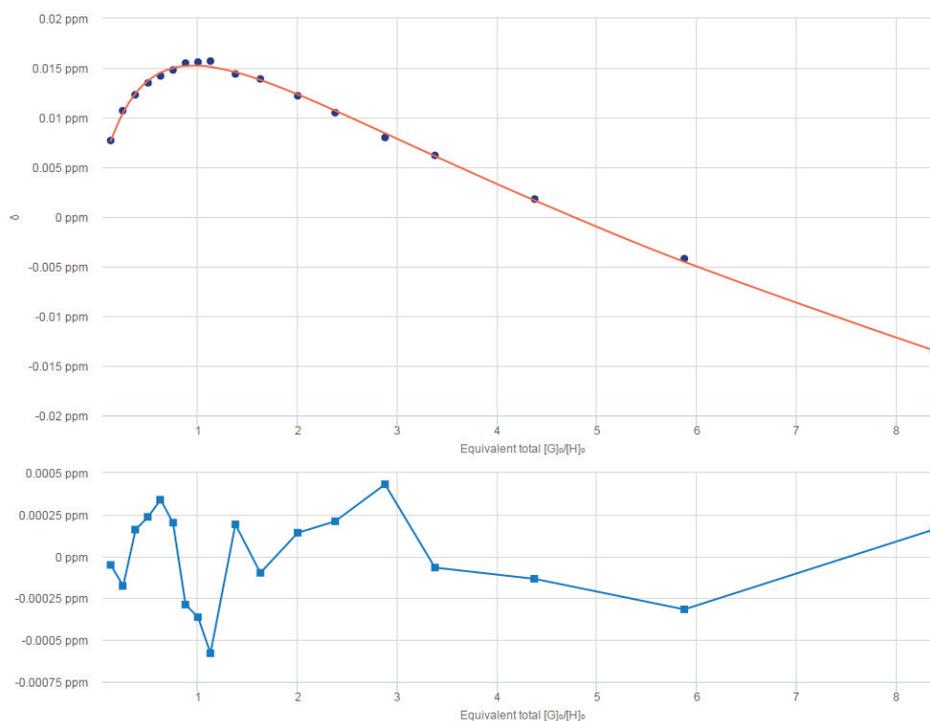


- **Titration Histidine 9 VS CaCl<sub>2</sub>:**

Hôte : [9] = 1 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4 + 1 eq. de TMSP et invité: [CaCl<sub>2</sub>] = 15 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4.

Modélisation 2:1 (2 Histidine 9 pour 1 CaCl<sub>2</sub>) avec Bindfitt :

$K_{a1} = 1.57 \cdot 10^2 \pm 0.04 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  et  $K_{a2} = 4.72 \cdot 10^3 \pm 0.12 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$



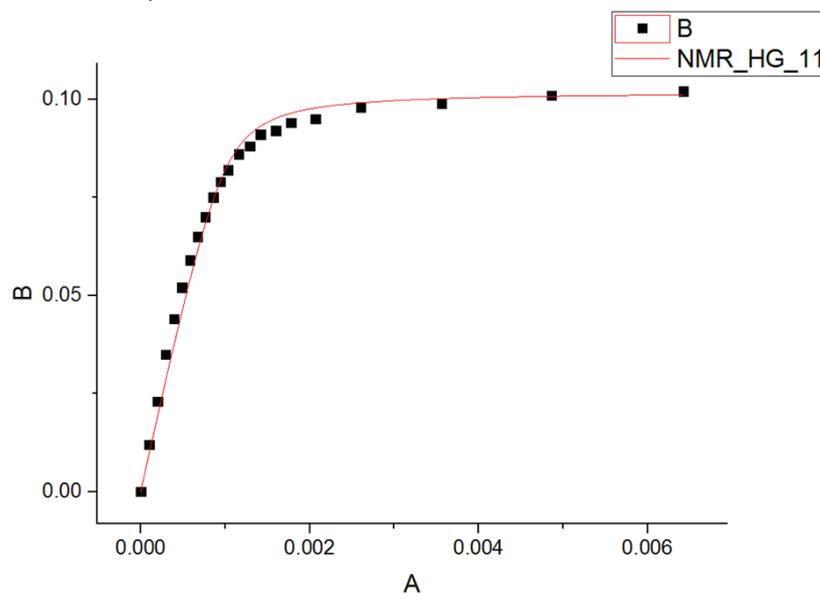
- **Titration 4<sub>4</sub> + CaCl<sub>2</sub> VS 4-aminobutanol 12 :**

Hôte : [4<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub>] = 1 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4 + 1 eq. de TMSP.

Guest solution: [12] = 15 mM, D<sub>2</sub>O pD = 7.4.

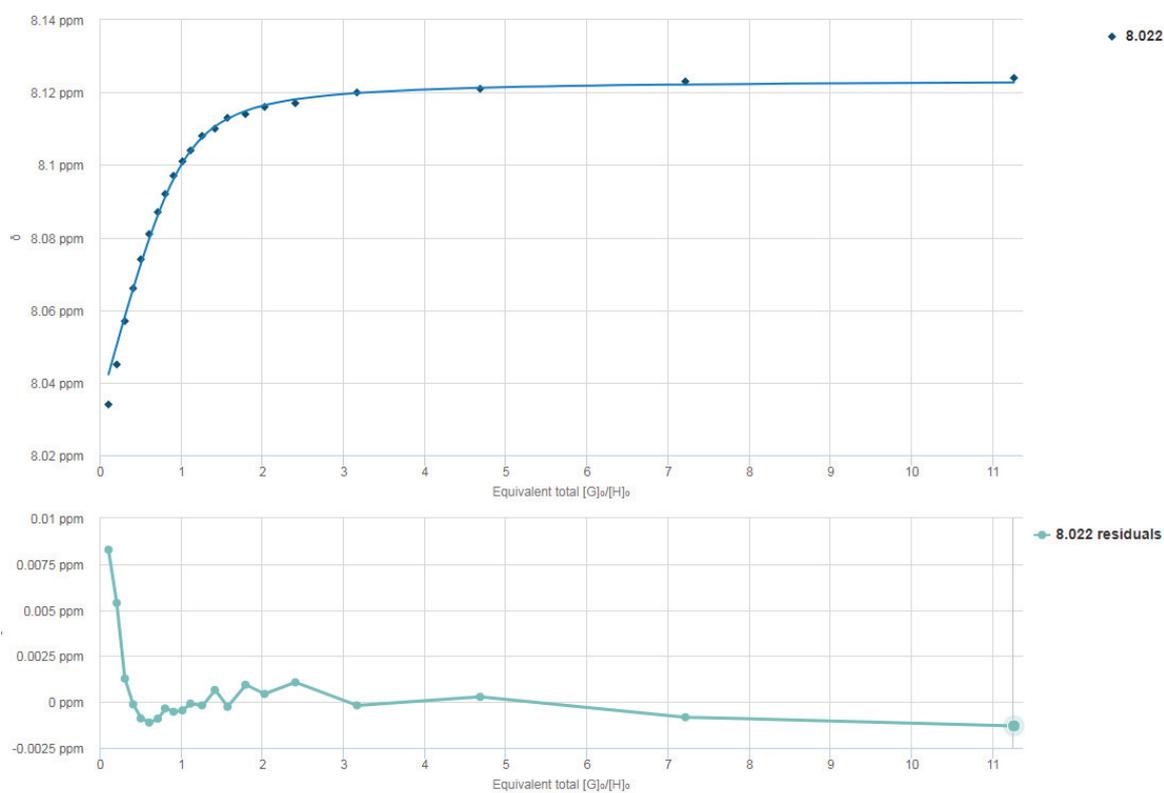
Modélisation 1:1 (1 complexe 4<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub> pour un 4-aminobutanol 12) avec Origin :

**K<sub>a</sub> = 2.10 10<sup>4</sup> ± 0.21 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.988**

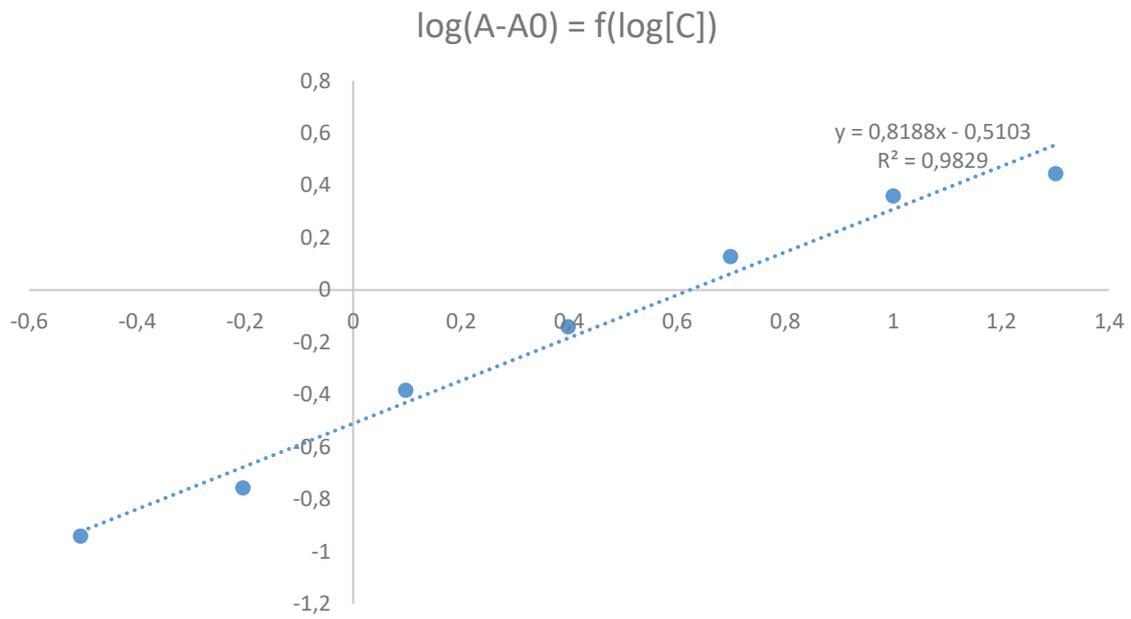


Modélisation 1:1 (1 complexe 4<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub> pour un 4-aminobutanol 12) avec Bindfitt:

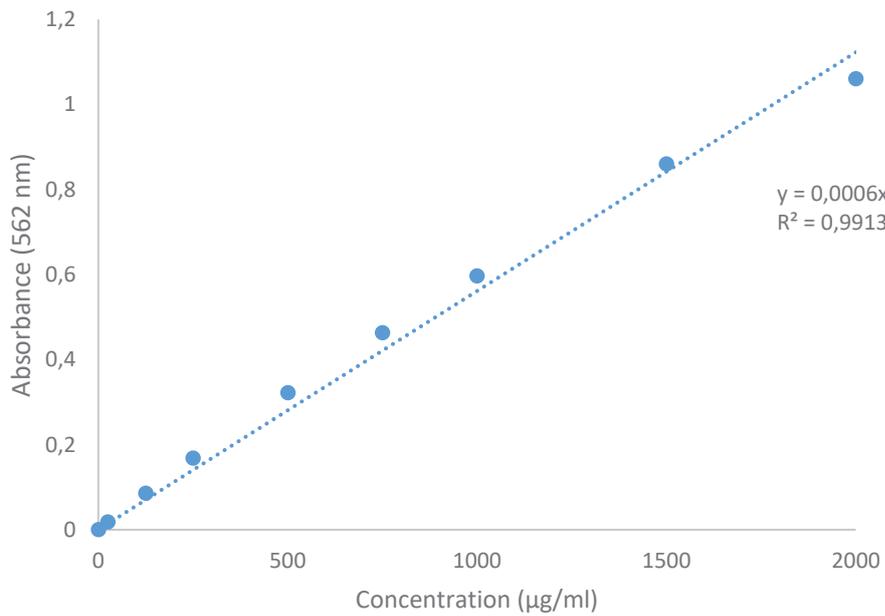
**K<sub>a</sub> = 1.10 10<sup>4</sup> ± 0.17 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>**



### Annexe E : Droite de calibration pour le test ELISA :



### Annexe F : Droite de calibration pour la détermination du nombre de protéines



## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce manuscrit était d'étudier en profondeur les propriétés de reconnaissance de composés d'intérêt biologiques par des récepteurs macrocycliques auto-assemblés en milieu aqueux.

Une nouvelle famille de macrocycle, présentant des ponts disulfures, appelée dyn[n]arène a été obtenue au sein de chimiothèque combinatoire dynamique. Des dy[n]arènes polycarboxylates hydrosolubles ( $n = 3, 4$ ) ont ainsi été isolées dans le but d'effectuer de la reconnaissance moléculaire d'invités cationiques. Le dyn[3]arène polycarboxylate a été décrit comme un récepteur capable d'effectuer des complexes hors cavité, avec différents modes d'association selon la polyamine biogénique invitée. Le dyn[4]arène polycarboxylate a été étudié premièrement avec une série d' $\alpha, \omega$ -alkyle-diamines de longueur variable, formant des complexes d'inclusion. Les sélectivités observées pour les plus longues ont été interprétées en prenant en compte le rôle crucial de l'eau lors des processus de solvation/désolvation. Des modes d'association originaux ont été mis en évidence avec des acides aminés et des métaux. Le dyn[4]arène polycarboxylate est enfin capable de reconnaître sélectivement les polyamines (spermine et la spermidine) modulant la prolifération cellulaire. Les constantes d'association correspondantes ont été mesurées en modifiant les méthodologies précédemment publiées et ont révélé que ces constantes avaient été sous-estimées, puisque supérieures à  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Des applications en biologie cellulaire ont par la suite été développées, mettant en évidence un effet anti-prolifératif cytotatique transitoire du dyn[4]arène polycarboxylate sur les cellules cancéreuses. Une preuve de l'internalisation a été effectuée, montrant une action au sein du cytoplasme des cellules. L'hypothèse la plus probable du caractère transitoire serait la fragilité des ponts disulfures des dynarènes face aux oxydants et nucléophiles du milieu cellulaire.

Dans le but d'allier chimie combinatoire dynamique et post-modification en édifice robuste, l'étude du processus d'extrusion de soufre à partir de disulfure a été initiée au cours du second chapitre. Ces réactions, étudiées depuis les 70, ont été peu décrites dans l'eau et en présence d'acide carboxylique. Dans le but de rendre les dyn[n]arènes polycarboxylate plus robustes, nous avons tenté d'étudier les divers processus d'extrusion de soufre sur des disulfures linaires modèles, mais aucun produit présentant des liens thioéthers n'a été isolé. Nous avons mis en évidence un intermédiaire particulièrement stabilisé dans l'eau généré à partir d'aminosphosphine et de disulfure dibenzyle. Nous avons néanmoins mis en évidence, lors d'assemblage entre des briques dithiophenols dicarboxylates et benzenedithiol dipyridinium par pont disulfures, qu'un phénomène de monoextrusion de soufre spontanée avait lieu quantitativement. De nouveaux macrocycles zwitterioniques à lien thioéther, potentiels récepteurs à acides aminés, ont été identifiés au sein de ces chimiothèques devenues statiques. Les perspectives sont donc axées autour de la compréhension de ce phénomène d'auto-extrusion dans l'espoir de l'appliquer aux dynarènes.

Enfin, dans le but de synthétiser des nouveaux cavitands ayant une géométrie et des modes d'interactions différents des dynarènes avec des partenaires moléculaires potentiels, la conception poly-iminodithiocine a été envisagée. Les travaux antérieurs effectués dans le laboratoire avaient déjà montré la possibilité de synthétiser des iminodithiocines fonctionnalisées par des ainsi que des oligodithiocines linéaires. Nous nous sommes focalisées sur la conception d'iminodithiocine hydrosolubles dans un premier temps, et nous avons montré qu'il était possible d'obtenir ces objets par une réaction d'échange de l'amine pontante à partir d'une dithiocine substrat. Nous avons aussi développé la synthèse de nouveaux précurseurs de poly-iminodithiocines, qui n'ont jamais été décrits dans la littérature. Les premiers essais de synthèse de polydithiocines ont permis de mettre en évidence la présence formation de macrocycles bis-dithiocines. De nombreuses perspectives sont donc à développer pour allier hydrosolubilité et synthèse de nouveaux récepteurs poly-iminodithiocines.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) (a) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VHC, 1995(b) Vögtle, F. *Supramolecular Chemistry*; Wiley & Sons, **1991**.
- (2) Steed, W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; Wiley & Sons, **2000**.
- (3) Gerschel, A. *Liaisons Intermoléculaires*; EDP Sciences, **1995**.
- (4) Cram, D. J. C., J. M. *Container molecules and their guests*; Royal Society of Chemistry, 1994.
- (5) Pedersen, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 7017.
- (6) Rose, M. C.; Henkens, R. W. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1974**, *372*, 426.
- (7) Messner, M.; Kurkov, S. V.; Flavià-Piera, R.; Brewster, M. E.; Loftsson, T. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *408*, 235.
- (8) Shinkai, S. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8933.
- (9) Thallapally, P. K.; McGrail, B. P.; Atwood, J. L. *Chemical communications* **2007**, 1521.
- (10) Cram, D. J.; Kaneda, T.; Helgeson, R. C.; Lein, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*, 6752.
- (11) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3652.
- (12) Komaromy, D.; Nowak, P.; Otto, S.; Ltd, W. S., Ed.; *Dynamic Combinatorial Libraries: Principles, Reactions, and Applications*, 2017.
- (13) Gilbert, H. F. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1995; Vol. 251.
- (14) Takagi, K. *A Facile Synthesis of Sulfides Using S-Aryl-isothiuronium Intermediates*, 1987.
- (15) Jiang, Y.; Qin, Y.; Xie, S.; Zhang, X.; Dong, J.; Ma, D. *Organic Letters* **2009**, *11*, 5250.
- (16) Lai, C.; J. Backes, B. *Efficient Preparation of S-Aryl Thioacetates from Aryl Halides and Potassium Thioacetate*, 2007.
- (17) Newman, M. S.; Karnes, H. A. *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 3980.
- (18) Kwart, H.; Evans, E. R. *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 410.
- (19) Cottrell, T. L.; Butterworths: London, 1958.
- (20) Moseley, J. D.; Sankey, R. F.; Tang, O. N.; Gilday, J. P. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4685.
- (21) Harvey, J. N.; Jover, J.; Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Murray, P.; Renny, J. S. *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 7748.
- (22) Perkowski, A. J.; Cruz, C. L.; Nicewicz, D. A. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 15684.
- (23) Pedersen, S. K.; Ulfkjær, A.; Newman, M. N.; Yogarasa, S.; Petersen, A. U.; Sølling, T. I.; Pittelkow, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, *83*, 12000.
- (24) Eriksen, K.; Ulfkjær, A.; Sølling, T. I.; Pittelkow, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, *83*, 10786.
- (25) Broese, T.; Roesel, A. F.; Prudlik, A.; Francke, R. *Organic Letters* **2018**, *20*, 7483.
- (26) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. *Science* **2002**, *297*, 590.
- (27) Ingerman, L. A.; Cuellar, M. E.; Waters, M. L. *Chemical communications* **2010**, *46*, 1839.
- (28) Bartolec, B.; Altay, M.; Otto, S. *Chemical communications* **2018**, *54*, 13096.
- (29) Freyer, M. W.; Lewis, E. A. In *Methods in Cell Biology*; Academic Press, 2008; Vol. 84.
- (30) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 14859.
- (31) Rühmann, E.; Betz, M.; Fricke, M.; Heine, A.; Schäfer, M.; Klebe, G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2015**, *1850*, 647.
- (32) Crini, G. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 10940.
- (33) Del Valle, E. M. M. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1033.
- (34) Palepu, R.; Reinsborough, V. *Australian Journal of Chemistry* **1990**, *43*, 2119.
- (35) Ludwig, R.; Dzung, N. T. K. *Sensors* **2002**, *2*, 397.
- (36) Perret, F.; Coleman, A. W. *Chemical communications* **2011**, *47*, 7303.
- (37) Schönbeck, C.; Li, H.; Han, B.-H.; Laursen, B. W. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 6711.
- (38) Shu, X.; Xu, K.; Hou, D.; Li, C. *Israel Journal of Chemistry* **2018**, *58*, 1230.

- (39) Harries, D.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2184.
- (40) Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A. *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 12320.
- (41) Cao, L.; Šekutor, M.; Zavalij, P. Y.; Mlinarić-Majerski, K.; Glaser, R.; Isaacs, L. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 988.
- (42) Persch, E.; Dumele, O.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 3290.
- (43) Fischer, E. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985.
- (44) Koshland, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 98.
- (45) Boots, H. M. J.; De Bokx, P. K. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 8240.
- (46) Rekharsky, M. V.; Mori, T.; Yang, C.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E.; Liu, S.; Isaacs, L.; Chen, W.; Moghaddam, S.; Gilson, M. K.; Kim, K.; Inoue, Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 20737.
- (47) Schneider, H.-J. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 3924.
- (48) Ngola, S. M.; Kearney, P. C.; Mecozzi, S.; Russell, K.; Dougherty, D. A. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1192.
- (49) Biedermann, F.; Schneider, H.-J. *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 5216.
- (50) Biedermann, F.; Nau, W. M.; Schneider, H.-J. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 11158.
- (51) Gao, S.; House, W.; Chapman, W. G. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 19090.
- (52) Biedermann, F.; Uzunova, V. D.; Scherman, O. A.; Nau, W. M.; De Simone, A. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 15318.
- (53) Hontama, N.; Inokuchi, Y.; Ebata, T.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvet, C.; Xantheas, S. S. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 2967.
- (54) Yin, H.; Hummer, G.; Rasaiah, J. C. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7369.
- (55) Lee, S. J. C.; Lee, J. W.; Lee, H. H.; Seo, J.; Noh, D. H.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Kim, H. I. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 8855.
- (56) Moinard, C.; Cynober, L.; de Bandt, J.-P. *Clinical Nutrition* **2005**, *24*, 184.
- (57) Kingsnorth, A. N.; Wallace, H. M.; Bundred, N. J.; Dixon, J. M. J. *BJS* **1984**, *71*, 352.
- (58) Kingsnorth, A. N.; Lumsden, A. B.; Wallace, H. M. *BJS* **1984**, *71*, 791.
- (59) Pegg, A. E.; McCann, P. P. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1982**, *243*, C212.
- (60) Igarashi, K.; Kashiwagi, K. *Biochemical and biophysical research communications* **2000**, *271*, 559.
- (61) Pegg, A. E. *Chemical Research in Toxicology* **2013**, *26*, 1782.
- (62) Casero Jr, R. A.; Marton, L. J. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 373.
- (63) Heby, O.; Marton, L. J.; Wilson, C. B.; Martinez, H. M. *FEBS Letters* **1975**, *50*, 1.
- (64) Gerner, E. W.; Meyskens Jr, F. L. *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 781.
- (65) Russell, D. H.; Levy, C. C.; Schimpff, S. C.; Hawk, I. A. *Cancer Research* **1971**, *31*, 1555.
- (66) C W Tabor, a.; Tabor, H. *Annual Review of Biochemistry* **1976**, *45*, 285.
- (67) Male, K. B.; Luong, J. H. T. *Journal of Chromatography A* **2001**, *926*, 309.
- (68) Uzunova, V. D.; Cullinane, C.; Brix, K.; Nau, W. M.; Day, A. I. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2037.
- (69) Yousaf, A.; Hamid, S. A.; Bunnori, N. M.; Ishola, A. A. *Drug design, development and therapy* **2015**, *9*, 2831.
- (70) Rajewski, R. A.; Stella, V. J. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, *85*, 1142.
- (71) Zhou, J.; Yu, G.; Huang, F. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46*, 7021.
- (72) Chen, Y.; Huang, Z.; Zhao, H.; Xu, J.-F.; Sun, Z.; Zhang, X. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 8602.
- (73) D'Urso, A.; Brancatelli, G.; Hickey, N.; Farnetti, E.; De Zorzi, R.; Bonaccorso, C.; Purrello, R.; Geremia, S. *Supramolecular Chemistry* **2016**, *28*, 499.

- (74) Hao, Q.; Chen, Y.; Huang, Z.; Xu, J.-F.; Sun, Z.; Zhang, X. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10*, 5365.
- (75) Kim, Y.; Kim, H.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Rekharsky, M. V.; Inoue, Y.; Kim, K. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 6143.
- (76) Chen, Y.; Huang, Z.; Xu, J.-F.; Sun, Z.; Zhang, X. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 22780.
- (77) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 7941.
- (78) Montes-Navajas, P.; González-Béjar, M.; Scaiano, J. C.; García, H. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 1743.
- (79) Kim, J.; Ahn, Y.; Park, K. M.; Kim, Y.; Ko, Y. H.; Oh, D. H.; Kim, K. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 7393.
- (80) Guo, D.-S.; Liu, Y. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 1925.
- (81) Guo, D.-S.; Uzunova, V. D.; Su, X.; Liu, Y.; Nau, W. M. *Chemical Science* **2011**, *2*, 1722.
- (82) Skowron, P.-T.; Dumartin, M.; Jeamet, E.; Perret, F.; Gourlaouen, C.; Baudouin, A.; Fenet, B.; Naubron, J.-V.; Fotiadu, F.; Vial, L.; Leclaire, J. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 654.
- (83) Field, L.; Engelhardt, P. R. *The Journal of Organic Chemistry* **1970**, *35*, 3647.
- (84) Vial, L.; Ludlow, R. F.; Leclaire, J.; Pérez-Fernández, R.; Otto, S. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10253.
- (85) Donnier-Maréchal, M.; Septavaux, J.; Jeamet, E.; Héloin, A.; Perret, F.; Dumont, E.; Rossi, J.-C.; Ziarelli, F.; Leclaire, J.; Vial, L. *Organic Letters* **2018**, *20*, 2420.
- (86) Steudel, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1975**, *14*, 655.
- (87) Jeamet, E.; Septavaux, J.; Héloin, A.; Donnier-Maréchal, M.; Dumartin, M.; Ourri, B.; Mandal, P.; Huc, I.; Bignon, E.; Dumont, E.; Morell, C.; Francoia, J.-P.; Perret, F.; Vial, L.; Leclaire, J. *Chemical Science* **2019**, *10*, 277.
- (88) Ignatiev, V. D. *Journal of Structural Chemistry* **2005**, *46*, 744.
- (89) Collins, M. S.; Carnes, M. E.; Nell, B. P.; Zakharov, L. N.; Johnson, D. W. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11052.
- (90) Han, C.; Ma, F.; Zhang, Z.; Xia, B.; Yu, Y.; Huang, F. *Organic Letters* **2010**, *12*, 4360.
- (91) Lawson, L.; Huser, T. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 3574.
- (92) Collins, M. S.; Phan, N.-M.; Zakharov, L. N.; Johnson, D. W. *Inorganic Chemistry* **2018**, *57*, 3486.
- (93) (a) Meeuwissen, J.; Reek, J. N. H. *Nature Chemistry* **2010**, *2*, 615(b) Zhang, D.; Dutasta, J.-P.; Dufaud, V.; Guy, L.; Martinez, A. *ACS Catalysis* **2017**, *7*, 7340.
- (94) Jones, S. T.; Zayed, J. M.; Scherman, O. A. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5299.
- (95) Pikramenou, Z.; Nocera, D. G. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31*, 532.
- (96) Lumb, I.; Hundal, M. S.; Hundal, G. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*, 7770.
- (97) Persson, I. In *Pure and Applied Chemistry*, 2010; Vol. 82.
- (98) Vial, L.; Dumartin, M.; Donnier-Maréchal, M.; Perret, F.; Francoia, J.-P.; Leclaire, J. *Chemical communications* **2016**, *52*, 14219.
- (99) Snyder, R. D. *The Biochemical journal* **1989**, *260*, 697.
- (100) Da Silva, J. P.; Choudhury, R.; Porel, M.; Pischel, U.; Jockusch, S.; Hubbard, P. C.; Ramamurthy, V.; Canário, A. V. M. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 1432.
- (101) Guminski, Y.; Grousseau, M.; Cugnasse, S.; Brel, V.; Annereau, J.-P.; Vispé, S.; Guilbaud, N.; Barret, J.-M.; Bailly, C.; Imbert, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 2474.
- (102) Harpp, D. N.; Smith, R. A. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 6045.
- (103) Tan, Q.; Zhou, D.; Zhang, T.; Liu, B.; Xu, B. *Chemical communications* **2017**, *53*, 10279.
- (104) Fujihara, H.; Chiu, J.-J.; Furukawa, N. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 7441.
- (105) Viswanatharaju Rudraraju, K.; Parsons, Z. D.; Lewis, C. D.; Gates, K. S. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 776.
- (106) Caraballo, R.; Rahm, M.; Vongvilai, P.; Brinck, T.; Ramström, O. *Chemical communications* **2008**, 6603.
- (107) Crich, D.; Brebion, F.; Krishnamurthy, V. *Organic Letters* **2006**, *8*, 3593.
- (108) Harpp, D. N.; Smith, R. A.; Steliou, K. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 2072.

- (109) Harpp, D. N.; Gleason, J. G. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 2437.
- (110) (a) Furusho, Y.; Oku, T.; Hasegawa, T.; Tsuboi, A.; Kihara, N.; Takata, T. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9*, 2895(b) Oku, T.; Furusho, Y.; Takata, T. *Organic Letters* **2003**, *5*, 4923.
- (111) Harpp, D. N.; Gleason, J. G. *The Journal of Organic Chemistry* **1970**, *35*, 3259.
- (112) Harpp, D. N.; Gleason, J. G.; Snyder, J. P. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 4181.
- (113) Bernardes, G. J. L.; Grayson, E. J.; Thompson, S.; Chalker, J. M.; Errey, J. C.; El Oualid, F.; Claridge, T. D. W.; Davis, B. G. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2244.
- (114) Sone, T.; Ohba, Y.; Moriya, K.; Kumada, H.; Ito, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10689.
- (115) Yoshihiro, O.; Kazuhiko, M.; Tyo, S. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1991**, *64*, 576.
- (116) De Leger, W.; Adriaensen, K.; Robeyns, K.; Van Meervelt, L.; Thomas, J.; Meijers, B.; Smet, M.; Dehaen, W. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2018**, *14*, 2190.
- (117) Van Rossom, W.; Maes, W.; Kishore, L.; Ovaere, M.; Van Meervelt, L.; Dehaen, W. *Organic Letters* **2008**, *10*, 585.
- (118) Sonawane, M. P.; Van Hecke, K.; Jacobs, J.; Thomas, J.; Van Meervelt, L.; Dehaen, W.; Van Rossom, W. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 8444.
- (119) Johnson, D. W., Collins, Mary University of Oregon (Eugene, OR, US): United States, 2017.
- (120) Wang, L.; Ren, Z.-L.; Ding, M.-W. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80*, 641.
- (121) Végh, D.; Morel, J.; Decroix, B.; Zálupský, P. *Synthetic Communications* **1992**, *22*, 2057.
- (122) Jin, N.; Sun, G.; Xie, P.; Zhao, D.; Zhang, J. *Reaction mechanism of synthesizing hydroxyterephthalic acid monoester with high selectivity and its application*, 2012.
- (123) Harpp, D. N.; Gleason, J. G.; Ash, D. K. *The Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36*, 322.
- (124) Tröger, J. *Journal für Praktische Chemie* **1887**, *36*, 225.
- (125) Rúnarsson, Ö. V.; Artacho, J.; Wärnmark, K. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012*, 7015.
- (126) Prelog, V.; Wieland, P. *Helvetica Chimica Acta* **1944**, *27*, 1127.
- (127) Larson, S. B.; Wilcox, C. S. *Acta Crystallographica Section C* **1986**, *42*, 224.
- (128) Spielman, M. A. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57*, 583.
- (129) Johnson, R. A.; Gorman, R. R.; Wnuk, R. J.; Crittenden, N. J.; Aiken, J. W. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 3202.
- (130) Greenberg, A.; Molinaro, N.; Lang, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1984**, *49*, 1127.
- (131) Periasamy, M.; Suresh, S.; Satishkumar, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 108.
- (132) Reddy, M. B.; Manjula, A.; Rao, B. V.; Sridhar, B. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012*, 312.
- (133) Hamada, Y.; Mukai, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2671.
- (134) Jensen, J.; Wärnmark, K. *Synthesis of Halogen Substituted Analogues of Tröger's Base*, 2001.
- (135) Artacho, J.; Wärnmark, K. *Synthesis* **2009**, *2009*, 3120.
- (136) Didier, D.; Sergeyev, S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3864.
- (137) Bew, S. P.; Legentil, L.; Scholier, V.; Sharma, S. V. *Chemical communications* **2007**, 389.
- (138) Becker, D. P.; Finnegan, P. M.; Collins, P. W. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 1889.
- (139) Minder, B.; Schürch, M.; Mallat, T.; Baiker, A. *Catalysis Letters* **1995**, *31*, 143.
- (140) Goldberg, Y.; Alper, H. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 369.
- (141) Paul, A.; Maji, B.; Misra, S. K.; Jain, A. K.; Muniyappa, K.; Bhattacharya, S. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7460.
- (142) Dolenský, B.; Parchaňský, V.; Matějka, P.; Havlík, M.; Bouř, P.; Král, V. *Journal of Molecular Structure* **2011**, *996*, 69.
- (143) Dolenský, B.; Havlík, M.; Král, V. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 3839.
- (144) Ibrahim, A. A.; Matsumoto, M.; Miyahara, Y.; Izumi, K.; Suenaga, M.; Shimizu, N.; Inazu, T. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1998**, *35*, 209.
- (145) Fukae, M.; Inazu, T. *Journal of inclusion phenomena* **1984**, *2*, 223.
- (146) Arribas, C. S.; Wendt, O. F.; Sundin, A. P.; Carling, C.-J.; Wang, R.; Lemieux, R. P.; Wärnmark, K. *Chemical communications* **2010**, *46*, 4381.

- (147) Cowart, M. D.; Sucholeiki, I.; Bukownik, R. R.; Wilcox, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 6204.
- (148) Webb, T. H.; Suh, H.; Wilcox, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 8554.
- (149) Miyake, M.; S. Wilcox, C. *Design and Synthesis of a Novel Cyclophane as Host for Aryl Phosphate*, 2002.
- (150) Wyatt, P.; Hudson, A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 1528.
- (151) Kikilo, P. A.; Khairutdinov, B. I.; Shtyrlin, Y. G.; Klochkov, V. V.; Klimovitskii, E. N. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2005**, *41*, 1089.
- (152) Saito, M.; Osaka, I.; Miyazaki, E.; Takimiya, K.; Kuwabara, H.; Ikeda, M. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 285.
- (153) Pulst, M.; Wecks, M.; Eilitz, U.; Greif, D. *Synthesis of non-annellated 2,6-imino-2H,6H-1,5-dithiocine*, 1999.
- (154) Dean Toste, F.; Lough, A.; W.J. Still, I. *Preparation of 6,12-Imino-6H,12H-dibenzo[b,f]-1,5-dithiocins*, 1995.
- (155) Stalling, T.; Pauly, J.; Kröger, D.; Martens, J. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8290.
- (156) Gol'dfarb, Y. L.; Skorova, A. É.; Kirmalova, M. L. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science* **1966**, *15*, 1365.
- (157) van den Bergen, A.; Corrigan, M. F.; Murray, K. S.; Slade, R. M.; West, B. O. *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters* **1974**, *10*, 859.
- (158) Brieady, L. E.; Donaldson, K. H. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1995**, *32*, 1683.
- (159) Still, I. W.; Natividad-Preyra, R.; Toste, F. D. *Canadian Journal of Chemistry* **1999**, *77*, 113.
- (160) Natividad, R. *Dissertation thesis : A novel synthesis of 1,5-dithiocins*: University of Toronto (Toronto), 1997.
- (161) Jose, J.; Loudet, A.; Ueno, Y.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2052.
- (162) Leclaire, J. C., G.; Fotiadu, F.; Poisson, G.; Vol. US20160097755A1.
- (163) Worden, L. R.; Kaufman, K. D.; Smith, P. J.; Widiger, G. N. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1970**, 227.
- (164) Wang, Z.; Nour, H. F.; Roch, L. M.; Guo, M.; Li, W.; Baldrige, K. K.; Sue, A. C. H.; Olson, M. A. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 2472.
- (165) Kadokawa, J.-i.; Tanaka, Y.; Yamashita, Y.; Yamamoto, K. *European Polymer Journal* **2012**, *48*, 549.
- (166) Mikko, P.; Mikko, J. M.; Juha, V.; Ari, M. P. K. *Letters in Organic Chemistry* **2011**, *8*, 48.





## Récepteurs auto-assemblés pour des molécules d'intérêt biologique

Depuis la fin du XX<sup>e</sup> siècle, la chimie combinatoire dynamique permet de synthétiser sous contrôle thermodynamique des récepteurs macrocycliques pour des molécules invités cibles. Ainsi, de nombreux hôtes supramoléculaires capables d'effectuer de la reconnaissance de molécules d'intérêt biologique dans l'eau ont été reportés dans la littérature. Nous avons décrit une nouvelle famille de récepteurs macrocycliques hydrosolubles appelés dyn[n]arènes polycarboxylates. Leur propriété de reconnaissance moléculaire vis-à-vis des polyamines, des métaux et des acides aminés ont permis d'envisager des applications biologiques. D'un point de vue fondamental, le rôle des divers paramètres, dont le solvant, a été étudié pour identifier les forces motrices responsables des associations. Des expériences *in cellulo* ont permis de démontrer un effet cytostatique anti-prolifératif transitoire du dyn[4]arène sur les cellules cancéreuses HeLa. Dans le but de moduler leurs propriétés de reconnaissance moléculaire, des réactions d'extrusion de soufre ont été envisagées pour synthétiser des dérivés plus robustes des dyn[n]arènes. Enfin, une famille d'objets macrocycliques apparentée a été envisagée basée sur le motif imino-1,5-dithiocines. Des études synthétiques et physico-chimiques pour l'élaboration de ces nouveaux cavitands laissent entrevoir de possibles applications biologiques similaires à celle de leurs analogues, les bases de Tröger.

**Mots-clés :** chimie combinatoire dynamique, dyn[n]arène, extrusion de soufre, imino-1,5-dithiocines, reconnaissance moléculaire.

## Self-assembled receptors for biologically relevant molecules

Since the end of the 20<sup>th</sup> century, dynamic combinatorial chemistry under thermodynamic control has enabled the synthesis of macrocyclic receptors towards targeted guest. So, many supramolecular hosts have been reported to be efficient in the molecular recognition of biologically relevant molecules in water. We describe a new family of hydrosoluble macrocycles called polycarboxylated dyn[n]arenes. Their molecular recognition properties with polyamines, amino acids and metals allow biological studies. From the fundamental view, the role of each parameters, including the solvent, has been deeply studied to identify the strength of the association. *In cellulo* experiments have shown an antiproliferative and cytostatic effect of the dyn[4]arene on HeLa cancer cells for several hours. In order to modulate their molecular recognition properties, sulfur extrusion process has been carried out to synthesize more robust derivatives of dynarenes. Finally, a new family of similar macrocycles has been studied, based on imino-1,5-dithiocines. Syntheses and physico-chemical studies for the design of future cavitands pave the way for similar biological applications as described for Tröger's bases.

**Mots-clés :** Dynamic combinatorial chemistry, dyn[n]arene, sulfur extrusion, imino-1,5-dithiocine, molecular recognition.

---