



UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

INSTITUT DE SCIENCE ET D'INGENIERIE SUPRAMOLECULAIRES

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
de STRASBOURG

par

Yves RUFF

BIOPOLYMERES DYNAMIQUES: OLIGO- ET POLYSACCHARIDES

Cette thèse a été soutenue publiquement le 12 janvier 2008 devant la commission
d'examen constituée de

Professeur Jean-Marie LEHN
Professeur Jean-Marie BEAU
Professeur Patrick PALE

Professeur Stéphane VINCENT
Docteur Andreas HERRMANN

Directeur de thèse
Rapporteur externe
Président du Jury
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe

CHAPITRE I: INTRODUCTION

Bref descriptif du projet de thèse	12
La chimie constitutionnelle dynamique	12
Principes d'auto-assemblage et sélection par contrôle thermodynamique	13
Perturbation de l'équilibre thermodynamique par l'ajout d'une cible	14
Extension des principes de dynamique constitutionnelle au niveau moléculaire	16
Exemples d'évolution par auto-sélection interne: La synthèse covalente sous contrôle thermodynamique et mouvements moléculaires	19
La chimie combinatoire dynamique	23
La Chimie Combinatoire Dynamique Appliquée aux Saccharides	25
Limitations théoriques du concept de chimie combinatoire dynamique	28
Nouvelles approches et perspectives en chimie combinatoire dynamique	34
Les polymères dynamiques: Dynamères	36
Les différents types de polymères dynamiques	37
Les biopolymères dynamiques	41
Polysaccharides Naturels et glycobiologie	43
Les polysaccharides de structure	43
Les polysaccharides fixant l'eau	45
Les polysaccharides de réserve	47
Les oligo- et polysaccharides comme molécules de reconnaissance: "The sugar code"	48
Les polysaccharides cycliques	51
Polymères analogues de polysaccharides	53
Les Polysaccharides dynamiques	59
Précédents décrits dans la littérature	59
Description du projet de recherche	65

CHAPITRE II: POLYSACCHARIDES DYNAMIQUES LINEAIRES A JONCTION ACYLHYDRAZONE.

Le choix de la jonction réversible	68
Premiers essais: dérivés homo-fonctionnalisés du glucose	69
Synthèse des composés 17a et 20	71
Polymérisation des composés 17a et 20 par polycondensation	73
Bilan des premiers essais	75
Monomères dérivés du 2, 5-anhydro-D-mannitol	76
Synthèse des monomères dérivés du 2,5-anhydro-D-mannitol	76
Polymerisations	
Tests de solubilité des différentes combinaisons de monomères	78

Application à la préparation d'une bibliothèque constitutionnelle dynamique d'analogues d'oligosaccharides:	
Découverte d'analogues dynamiques de cyclodextrines	83
Criblage et indentification d'une cible	84
Identification du composé amplifié	87
Purification du composé majoritaire sous forme réduite:	
Séparation du mélange par HPLC préparative	88
Expériences de RMN 2D sur la bibliothèque en présence de la cible	91
Mise en évidence de l'adaptation constitutionnelle dans la bibliothèque après ajout de la cible PyTS	95
Conclusions et perspectives	100

CHAPITRE III: GLYCOPOLYMÈRES DYNAMIQUES

Les glycopolymères conventionnels	104
Description du projet et intérêt	105
Conception et synthèse	106
Conception des monomères	106
Synthèse des monomères	110
Polymérisation	114
Etude de fluorescence	123
Fluorescence des glycopolymères 4a5a , 4a5b , 4b5a , 4b5b	123
Fluorescence des monomères 4a , 4b , 5a , 5b	124
Caractérisation du polymère 4a5b par cryo-TEM	127
Une structure secondaire originale	128
Fonctionnalisation supramoléculaire de surfaces carbonées	129
Phénomènes d'agrégations sur 4a5b	131
Caractérisation par chromatographie d'exclusion sur gel (GPC)	135
Caractérisation des polymères par diffusion des neutrons aux petits angles	136
Introduction à la diffusion des neutrons aux petits angles(DNPA)	136
Analyse du glycopolymère 4a5b par DNPA	138
Démonstration du caractère dynamique	142
Etude des échanges par spectrométrie de fluorescence	145
Glycopolymères dynamiques de deuxième génération	146
Préparation des glycopolymères dynamiques de deuxième génération	151
Etude de Fluorescence des glycopolymères dynamiques de deuxième génération	159

Caractérisation du polymère 4a25h par cryo-TEM	160
Caractérisation des glycopolymères dynamiques de deuxième génération par diffusion des neutrons aux petits angles	161
Polymérisation coopérative	165
Démonstration du caractère dynamique	166
Etude des échanges par spectrométrie de fluorescence	168
Bilan des études de fluorescence sur les glycopolymères de deuxième génération	170
Conclusion	171

CHAPITRE IV: Analogues de polysaccharides naturels: La jonction oxime

Précédents décrits dans la littérature	174
Application de la jonction oxime à la chimie combinatoire dynamique	174
La combinaison aldéhyde/alkoxylamine	175
Intérêt de ce type de jonction réversible	175
Composés modèles et études cinétiques d'échanges	176
Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides:	
Arabino-furanoses Dynamique	179
Conception et Synthèse des monomères	179
Synthèse de composés "Homo"-bifonctionnalisés	179
Synthèse de composés "Hétéro"-bifonctionnalisés	180
Polymérisation et études RMN des arabino-furanoses dynamiques	181
Caractérisation des arabino-furanoses dynamiques par RMN DOSY	183
Démonstration du caractère dynamique	186
Conclusion et perspectives	190
La combinaison méthylcétone/alkoxylamine	191
Composés modèles et études cinétiques d'échanges	191
Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides:	
Dextranes Dynamiques	194
Conception et synthèse du monomère	195
Polymerisation	196
Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides:	
Cellulose Dynamique	198
La cellulose naturelle	198
Analogues synthétiques par voie chimique et enzymatiques	198
Conception et synthèse du monomère	198

Table des Matières

Structure cristalline d'un intermédiaire et rationalisation de la conception du monomère	200
Polymérisation	203
Conclusion et perspectives	205

CHAPITRE V: Analogues de polysaccharides naturels: La jonction hydrazone

La combinaison aldéhyde/Hydrazine: Cinétiques et modèles	208
Application à la préparation d'analogues d'arabino-furanoses	215
Synthèse des monomères	215
Dérivés "hétéro"-bifonctionnalisés	215
Dérivés "homo"-bifonctionnalisés	216
Polymérisation	217
Comparaison polyhydrazones-polyacylhydrazones: la question de la solubilité des polyacylhydrazones	222
Caractérisation du polymère 14P par RMN DOSY	222
Bibliothèque constitutionnelle dynamique en présence de pyrene-1,3,6,8-tetrasulfonate de sodium	225
Limitations: Stabilité du polymère 14MP	227
Conclusion et perspectives	229

RESUMÉ	231
---------------	-----

REMERCIEMENTS	233
----------------------	-----

PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes générales	237
Synthèses et polymérisations	239
Chapitre II: Section expérimentale	239
Synthèse des monomères et des précurseurs de monomères	239
Synthèse des macrocycles 40 et 41	
exemple de procédure pour la synthèse du polymère 33	254
Chapitre III: Section expérimentale	257
Synthèse des monomères et des précurseurs de monomères	257
Synthèse des glycopolymères dynamiques de première génération	271
Synthèse des glycopolymères dynamiques de deuxième génération	271

Table des Matières

Chapitre IV: Section expérimentale	272
Synthèse des monomères et des précurseurs de monomères	272
Synthèse du polymère dynamique 18P	290
Synthèse du polymère dynamique 19P	290
Synthèse du polymère dynamique 27	291
Synthèse du polymère dynamique 31P	291
Chapitre V: Section expérimentale	292
Synthèse des monomères et des précurseurs de monomères	292
Synthèse du polymère dynamique 14P	296
Synthèse du polymère dynamique 14MP	297

ANNEXES

Annexe 1: Spectre MALDI de la bibliothèque constitutionnelle dynamique 25+26h à 6.25 mM	300
Annexe 2: Expérience de RMN COSY sur le polymère 4a5b dilué dans le DMSO- d_6 /D ₂ O 5/1	301
Annexe 3: Profils d'élution des glycopolymères 4a5a , 4a5b , 4b5a , et 4b5b	302
Annexe 4: Attribution des signaux aromatiques de la chaîne principale lors du suivi des réactions d'échanges sur le polymère 4a5b dans le DMSO- d_6 /D ₂ O 5/1	304
Annexe 5: Attribution des signaux aromatiques de la chaîne principale lors du suivi des réactions d'échanges sur le polymère 4a25h dans le DMSO- d_6 /D ₂ O 5/1	305
Annexe 6: Spectres RMN DOSY des polymères 18P et 19P	306
Annexe 7: Spectres RMN DOSY du polymère 14P à différents pD	308

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide desoxyribonucléique
AcOH	Acide acétique
Aldoxime	Oxime formée par condensation d'un aldéhyde et d'une hydroxylamine
ARN	Acide ribonucléique
BCD	Bibliothèque Combinatoire Dynamique
Bn	Benzyl
BnBr	Bromure de Benzyle
Bz	Benzoyl
BzCl	Chlorure de Benzoyle
¹³ C-RMN	RMN du ¹³ C
CAD	Spectrométrie de masse "Charge Aerosol Detector"
Cétoxime	Oxime formée par condensation d'une cétone et d'une hydroxylamine
Cps	Coups par seconde
COSY	Spectroscopie de corrélation "Correlation SpectroscopY"
CGTases	Cyclodextrines glucotransférases
18-crown-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxa-cyclooctadecane
<i>D</i>	Coefficient de diffusion
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIAD	Diisopropyle azodicarboxylate
DMF	<i>N,N'</i> -diméthylformamide
DOSY	"Diffusion Ordered NMR SpectroscopY"
<dp> _n	Degré de polymérisation moyen en nombre
ESI MS	Spectrométrie de masse Electrospray
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GtfD	Vancomycine glycosyltransférase
GPC	"Gel Permeation Chromatography"
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
h	Heure
HSQC	"Heteronuclear single quantum coherence"
¹ H-RMN	RMN du ¹ H
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HR-ESI MS	Spectrométrie de masse Electrospray haute résolution
HR-MALDI MS	Spectrométrie de masse MALDI haute résolution
HSQC	"Heteronuclear Single Quantum Coherence Chemical shift correlation"
LC-MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie de masse
MALDI	Spectromètre de masse utilisant la technique de "Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation"
MeOH	Méthanol
Mw	"Molecular weight" ou poids moléculaire
NOESY	"Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY"
Pd/C	Palladium sur charbon
PeTC	Perylene tetracarboxylate de potassium
pD	p ² H, l'équivalent du pH dans le D ₂ O
PPh ₃	Triphénylphosphine

Abréviations et Acronymes

PyTS	Pyrene-1,3,6,8-tetrasulfonate de sodium
R _f	Front de rétention
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
r _{sph}	Rayon sphérique hydrodynamique
T _{1/2}	Temps de demi-échange
TDP	Thymidine diphosphate
TMSOTf	Triflate de trimethylsilyle
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
Temps de demi-échange	Temps de demi-vie d'une réaction d'échange
TFA	Acide trifluoro acétique
THAP	2,4,6-trihydroxyacetophenone
THF	Tetrahydrofurane
CCM	Chromatographie sur couche mince
Transoximisation	Réaction de transimination dans le cas des oximes
TrCl	Chlorure de trityle
λ _{max}	Longueur d'onde maximum d'absorption/d'émission

CHAPITRE I: Introduction

CHAPITRE I INTRODUCTION

Bref descriptif du projet de thèse

Les travaux présentés ici s'inscrivent dans le cadre de la chimie constitutionnelle dynamique dont les principaux concepts et applications seront développés au cours de cette introduction.

L'application des fondements de la chimie constitutionnelle dynamique à la chimie des polymères a conduit à l'émergence des polymères dynamiques, ou « dynamères », qui résultent de l'association de monomères par le biais d'interactions réversibles covalentes (polymères dynamiques covalents) ou non-covalentes (polymères dynamiques supramoléculaires).¹ Du fait de leur caractère réversible, la structure, le poids moléculaire, ainsi que la composition de tels polymères peuvent évoluer en réponse à des stimuli externes (température, pH, présence d'une cible moléculaire), ce qui en fait des matériaux dits adaptatifs.

Nous avons appliqué ces principes à la préparation d'analogues de polysaccharides naturels. Le but de ce travail est de contrôler ces phénomènes de réorganisation constitutionnels par l'introduction de cibles moléculaires, idéalement des récepteurs d'intérêt biologique tels que ceux qui sont chargés de reconnaître les poly- et oligosaccharides à la surface des cellules vivantes.

La chimie constitutionnelle dynamique

La chimie supramoléculaire se base sur l'utilisation de liaisons chimiques non-covalentes et réversibles entre les molécules comme les liaisons hydrogènes, ou les liaisons de coordination. Du fait de la labilité de ce type d'interactions, les entités supramoléculaires peuvent se dissocier et s'associer de manière continue, et elles sont par conséquent dynamiques.

Cette dynamique se traduit par la capacité des édifices supramoléculaires d'incorporer ou d'exclure des composants moléculaires. La composition, ou constitution, d'assemblages supramoléculaires n'est donc pas figée; elle est donc elle aussi dynamique.

¹ Dynamers: Dynamic Molecular and Supramolecular Polymers. J.-M. Lehn. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 814-831.

Principes d'auto-assemblage et sélection par contrôle thermodynamique

La réversibilité des interactions supramoléculaires génère une grande diversité du point de vue constitutionnel. Autrement dit, la dynamique supramoléculaire rend accessibles toutes les constitutions possibles.

De toutes ces combinaisons, le système va sélectionner et exprimer préférentiellement celle(s) ayant le plus bas niveau d'énergie. Le système va évoluer de manière autonome pour atteindre son équilibre thermodynamique et donner, s'il a été correctement conçu, l'assemblage supramoléculaire souhaité.²(Figure I1)

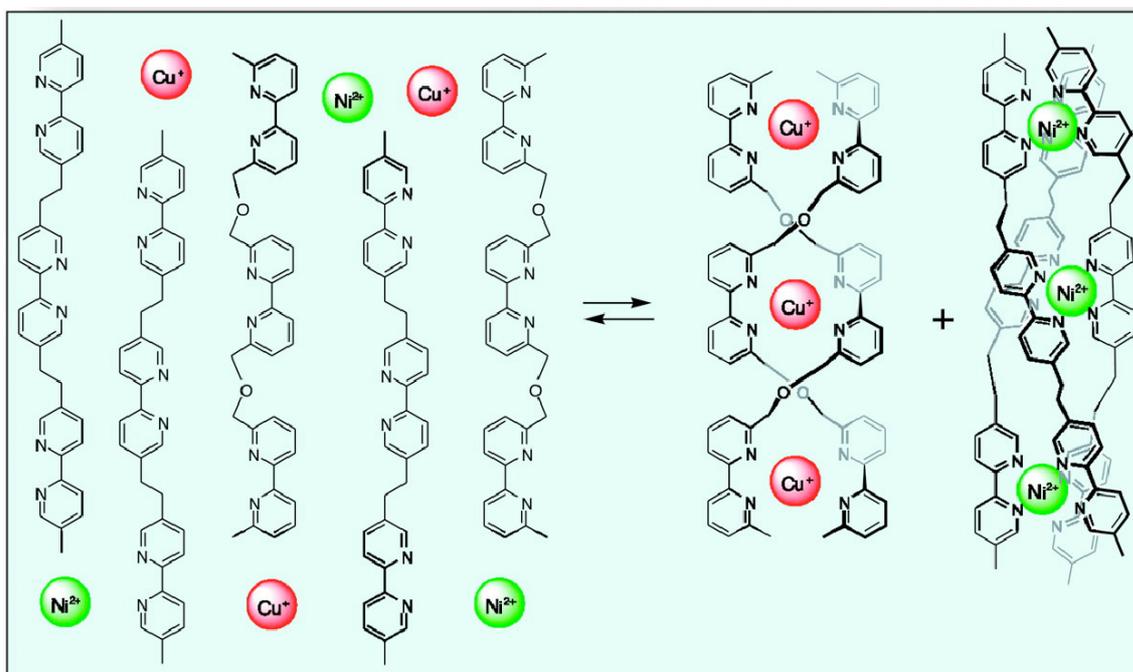


Figure I1 : Formation en parallèle d'hélicates à double et triple hélices par auto-sélection à partir d'un mélange de deux types de ligands possédant chacun une structure pouvant accueillir préférentiellement l'un ou l'autre des deux métaux en présence. Les ions Cu^{I} (rouges) et Ni^{II} (verts) sont coordonnés de manière tétraédrique et octaédrique respectivement.³

Ce processus d'auto-organisation est l'expression de l'information contenue dans la structure moléculaire des différentes briques. Cette information peut être introduite sous la forme de motifs de reconnaissance intermoléculaire, comme des sites de coordination métalliques ou accepteur/donneur de liaisons hydrogènes. En comprenant les algorithmes

² Toward Self-Organization and Complex Matter. J.-M. Lehn. *Science* **2002**, 295, 2400-2403.

³ Self-Recognition in Helicate Self-Assembly: Spontaneous Formation of Helical Metal Complexes from Mixtures of Ligands and Metal Ions. R. Krämer, J.-M. Lehn, A. Marquis-Rigault. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 5394-5398.

qui gèrent ces phénomènes de reconnaissance, le chimiste peut programmer les molécules qu'il synthétise, dans le but de préparer des architectures qui seraient quasiment inaccessibles par le biais de la synthèse organique classique.

Perturbation de l'équilibre thermodynamique par l'ajout d'une cible

Dans un ensemble d'assemblages moléculaires, en équilibre les uns avec les autres, des facteurs internes de stabilité sélectionnent les combinaisons les plus favorables du point de vue thermodynamique. La réaction d'auto-assemblage d'un édifice supramoléculaire étant réversible, elle est susceptible d'être influencée par des facteurs extérieurs au système, comme les paramètres physiques (température, pression, irradiation, ...) ou chimiques (ligand, récepteur, solvant,...). L'introduction d'une cible moléculaire peut, en modifiant les énergies relatives des différentes espèces, entraîner un déplacement des équilibres qui peuvent aller vers une autre direction que celle prise par le système seul. (Schéma I1)

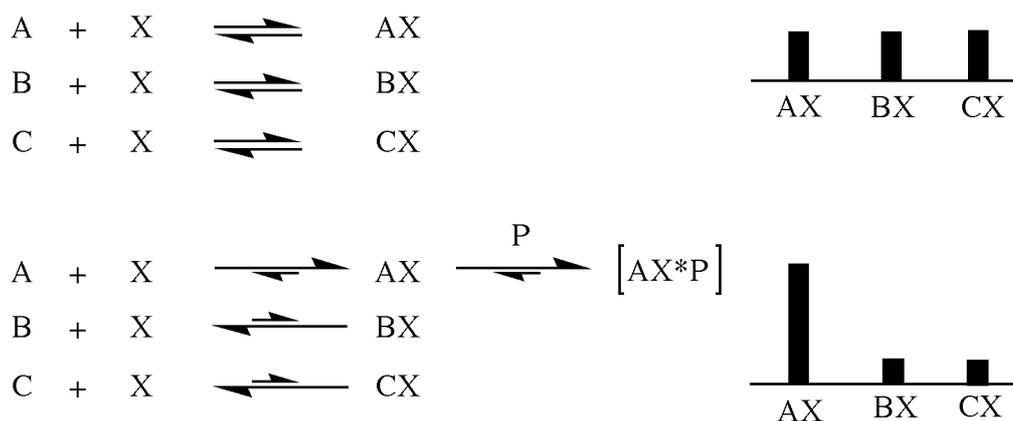


Schéma I1: Principe de la perturbation des équilibres. Une série de réactions en équilibre impliquant toutes une même molécule de base X génère un mélange de produits AX, BX, CX (une bibliothèque combinatoire dynamique). La complexation de AX avec le piège moléculaire P induit une perturbation de l'équilibre qui lie A et X. Le déplacement de l'équilibre vers AX*P et AX se fait au détriment des autres membres de la bibliothèque.

L'exemple suivant illustre ce phénomène.⁴(Figure I2)

⁴ Self-assembly of a Circular Double Helicate. B. Hasenknopf, J. -M. Lehn, B. O. Kneisel, G. Baum, D. Fenske. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1838-1840.

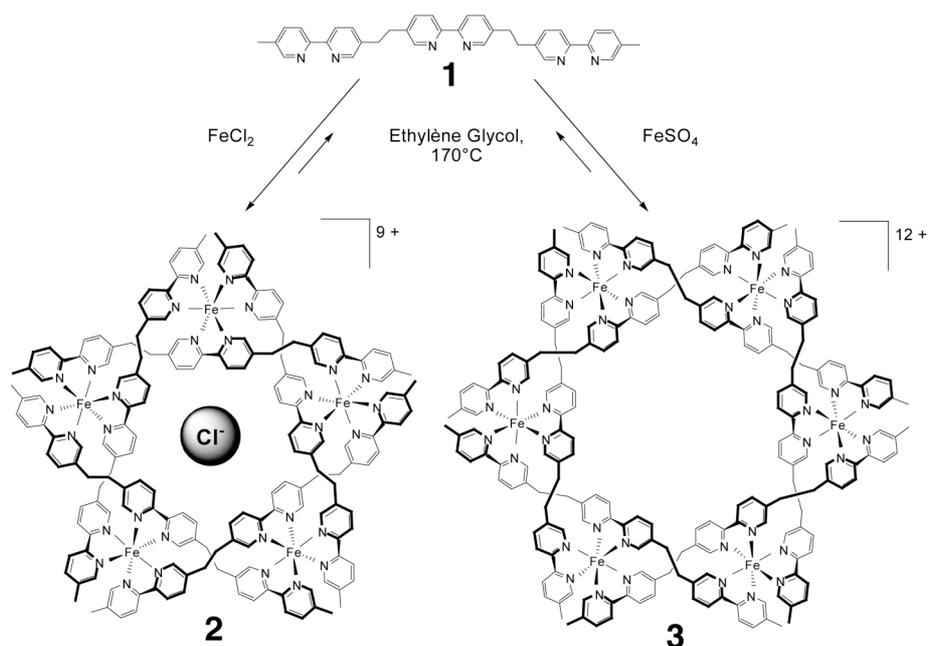


Figure I2: Autoassemblage des hélicates circulaires **2** et **3** à partir d'un ligand du type tris-bipyridyl **1** et d'ions Fe^{II} en présence de différents contre-ions.

Cet exemple peut s'interpréter de la façon suivante: L'addition d'ion Fe^{II} à une solution de ligand tris-bipyridyl **1** génère une bibliothèque combinatoire dynamique (cf. Chapitre I page 23), les membres de cette bibliothèque, les hélicates circulaires **2** et **3**, et une espèce de type grille **4**, étant en équilibre. (Figure I3) On peut également qualifier cette bibliothèque de virtuelle car en l'absence de contre ion, donc de cible, ses constituants ne sont pas exprimés.

Quand les ions chlorures sont introduits dans le système les espèces complexées sont retirées de la population de départ, ce qui suivant le principe de Le Chatelier⁵ (Figure I4) force le système à retourner à la distribution initiale et par conséquent à s'opposer à la consommation des espèces complexées. Si la quantité d'ions chlorures est suffisante, cette redistribution entraîne l'expression majoritaire de l'espèce **2** liée aux ions Cl^- . (Figure I3)

⁵ Recherches Expérimentales et Théoriques sur les Equilibres Chimiques. H. L. Le Chatelier. *Annales des Mines* **1888**, 13, 157-382.

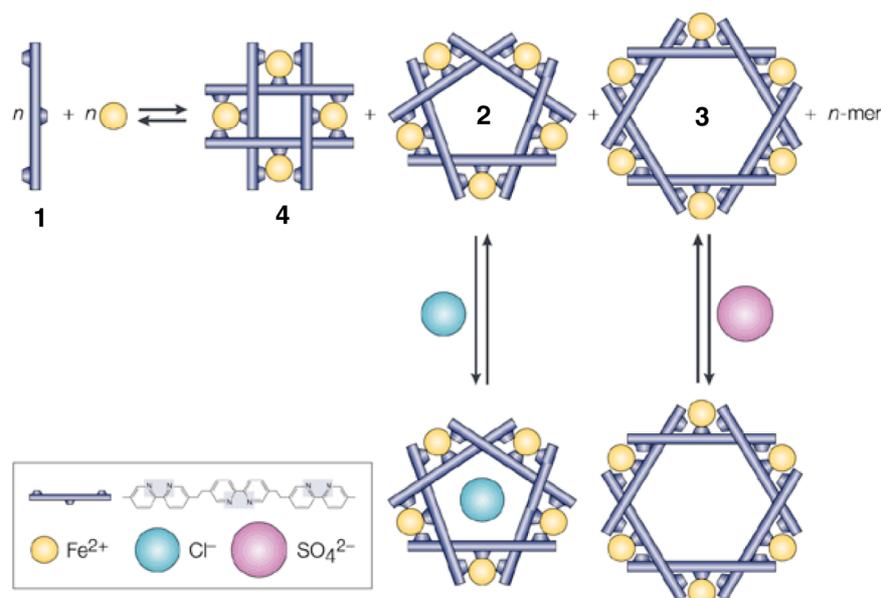


Figure I3: Bibliothèque combinatoire dynamique et virtuelle d'hélicates circulaires. L'addition d'ion Fe^{II} à une solution d'un ligand de type tris-bipyridyl **1** pourrait donner lieu à la formation de toute une famille d'architectures auto-assemblées allant d'une structure de type grille **4** à des hélicates circulaires de toute taille. Seulement on constate que l'introduction d'ion chlorures va entraîner par effet de gabarit (ou effet "template") l'expression d'une seule espèce d'hélicate circulaire pentagonale **2**. Dans le cas de l'addition de sulfate de Fe^{II} on obtient uniquement l'espèce d'hélicate hexagonale **3**.



Figure I4: Henry Le Chatelier, 1850-1936, chimiste français, a énoncé en 1884 (quelques mois après Van't Hoff) le principe selon lequel: «En modifiant la température ou la pression d'un système en équilibre stable, ce dernier tendra à se modifier jusqu'à annulation des effets dus aux changements apportés à ce système; l'équilibre se déplacera de façon à s'opposer aux modifications apportées aux conditions extérieures auxquelles le système est soumis.»

Extension des principes de dynamique constitutionnelle au niveau moléculaire

La labilité des interactions supramoléculaires (Figure I5) peut être étendue à la chimie covalente par le biais de réactions covalentes réversibles.(Figure I6)

Interactions réversibles

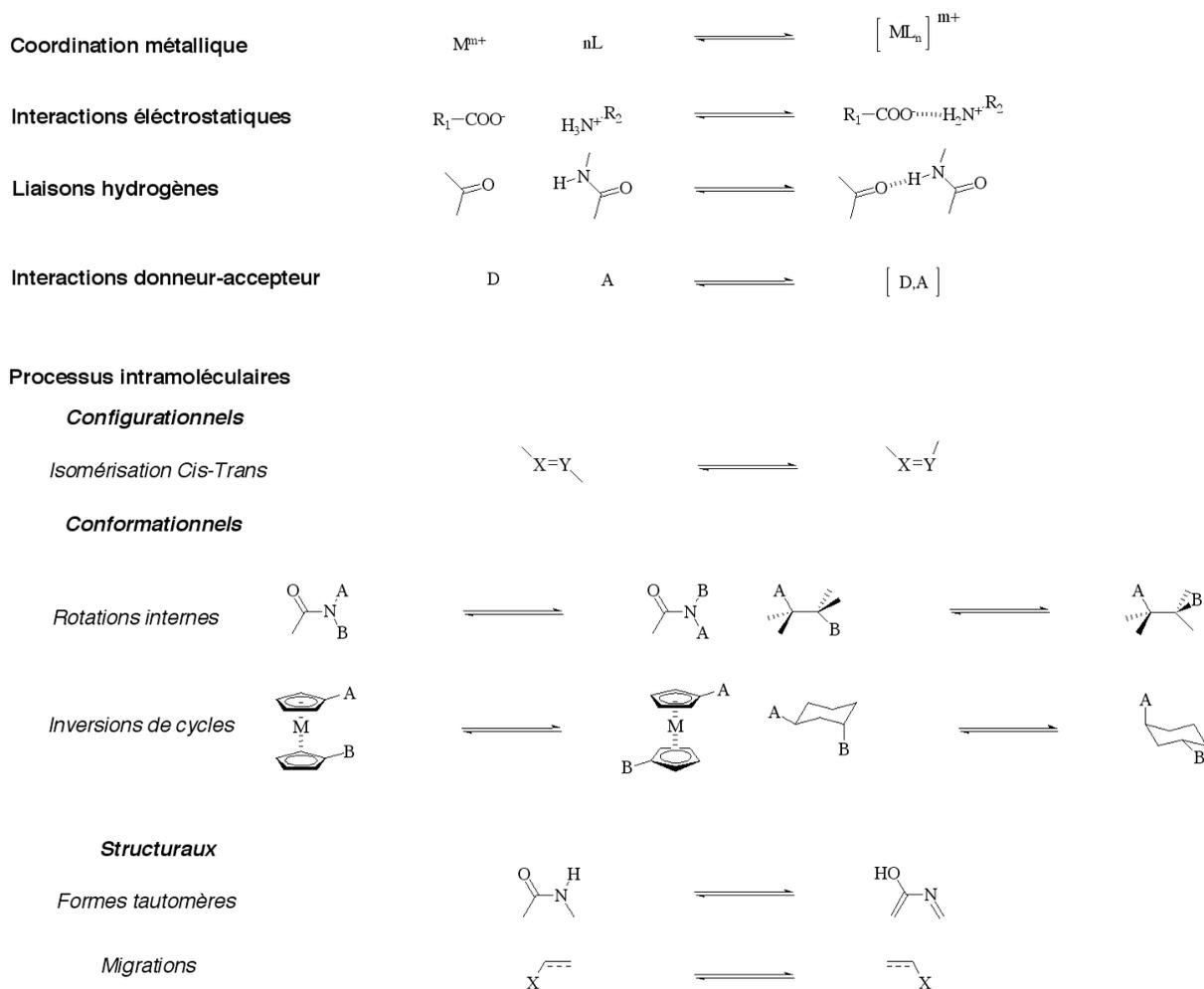


Figure 15: Processus moléculaires dynamiques et supramoléculaires applicables à la chimie constitutionnelle dynamique.

Formation de liaisons covalentes réversibles

Réactions impliquant la fonction carbonyle

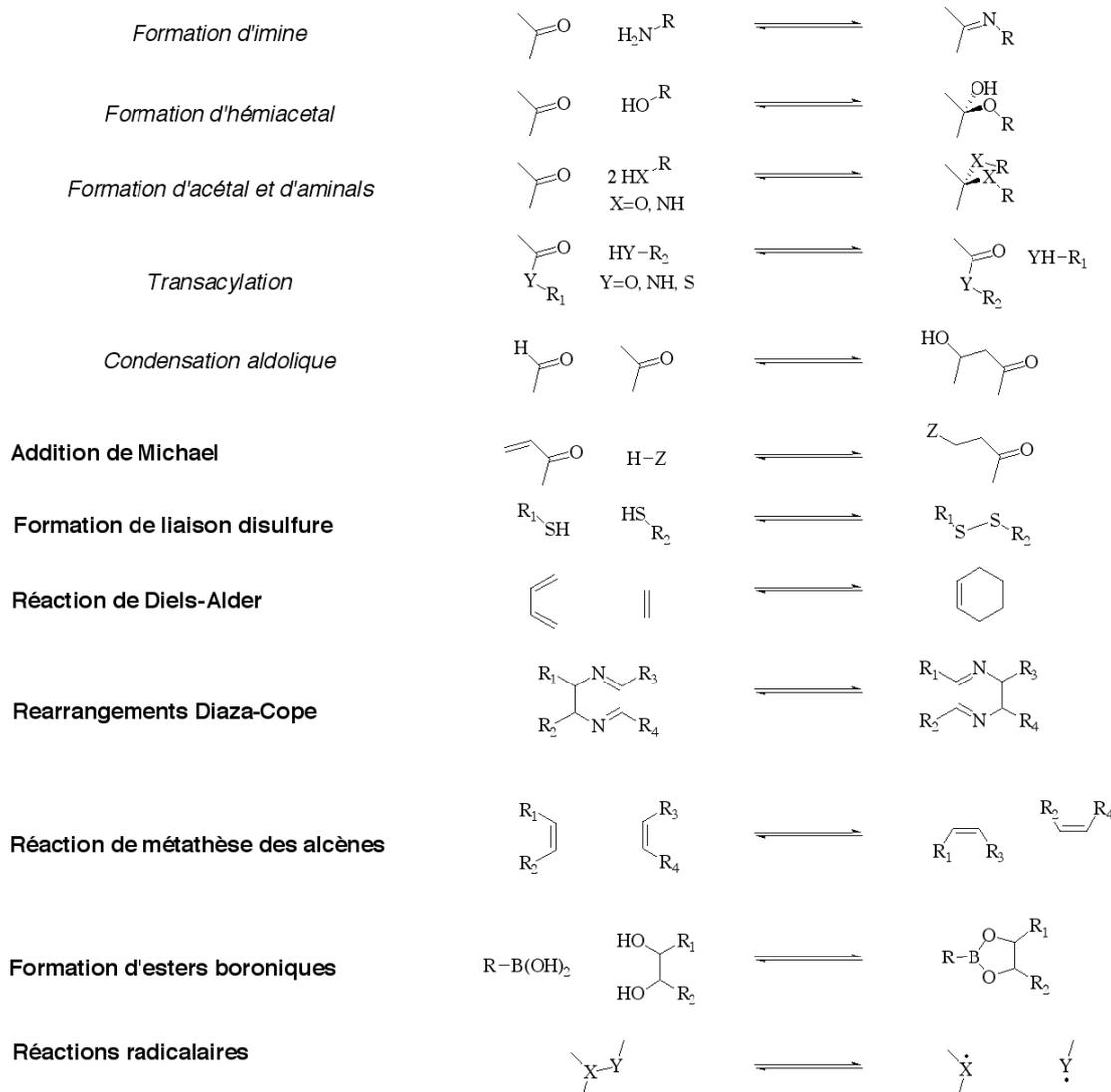


Figure I6: Processus moléculaires dynamiques et supramoléculaires applicables à la chimie constitutionnelle dynamique.

Les principes de la chimie constitutionnelle dynamique rencontrés dans le cas de la chimie supramoléculaire peuvent également s'appliquer au niveau moléculaire à conditions que les composés étudiés soient structurés autour d'une ou plusieurs fonctions réversibles.

Il s'agit d'une approche radicalement différente par rapport à la chimie covalente classique, où le chimiste synthétise de manière discrète des molécules aussi stables (du point de vue cinétique) et bien définies que possible, qu'il pourra ensuite caractériser et tester dans un but bien précis.

Comme nous l'avons vu précédemment la chimie constitutionnelle dynamique^{1,6} tire profit de l'instabilité de certains types de molécules pour générer un vaste ensemble de combinaisons moléculaires, en équilibre les unes avec les autres, et ce dans des conditions expérimentales bien précises.

L'ensemble moléculaire qui résulte de l'établissement de ces équilibres est susceptible d'évoluer soit par auto-sélection interne soit par l'application d'une pression de sélection par l'application de contraintes environnementales physiques ou l'introduction d'une cible moléculaire.

Exemples d'évolution par auto-sélection interne: La synthèse covalente sous contrôle thermodynamique et mouvements moléculaires

La synthèse organique covalente sous contrôle thermodynamique implique l'établissement d'un équilibre chimique entre réactifs et produits.

Dans ces conditions ce ne sont pas les facteurs cinétiques qui imposent la composition du mélange final, mais la stabilité relative des différents produits ainsi que les facteurs environnementaux (température, pression, solvant si celui-ci influe sur l'équilibre,...).

Ces facteurs de stabilité intrinsèques peuvent, s'ils sont significatifs, permettre l'isolation préparative du produit voulu.

Les exemples de ce type de processus sont nombreux⁷ et nous allons ici en détailler un petit nombre. La fonction chimique la mieux connue pour être impliquée dans des réactions réversibles, est certainement la fonction carbonyle. La réaction de formation d'acétal a été justement utilisée pour la protection de dérivés polyols de manière sélective. La mise en présence de l'isobutyraldéhyde et du glycérol résulterait en la formation de deux produits différents.⁸(Figure 17)

⁶ Toward Complex Matter: Supramolecular Chemistry and Self-Organisation. J.-M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 8, 4763-4768.

⁷ Dynamic Covalent Chemistry. S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 898-952.

⁸ Conformational Analysis. XXV. Conformational Equilibria in 5-Heterosubstituted 1,3-Dioxanes. Comparison of Calculated and Experimental Solvent Effects. R. J. Abraham, H. D. Banks, E. L. Eliel, O. Hofer, M. Kaloustian. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1913-1918.

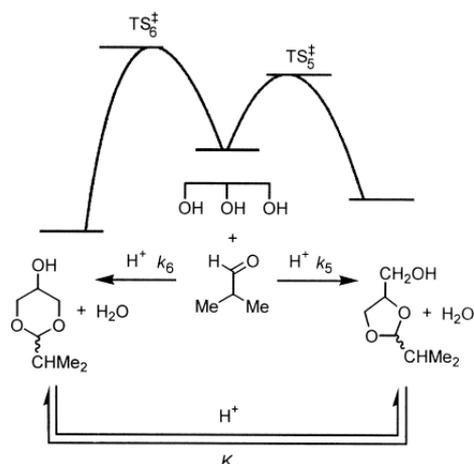


Figure I7: Diagramme d'énergie libre en fonction des coordonnées de la réaction d'acétalisation du glycerol par l'isobutyraldéhyde par catalyse acide. La formation des dioxanes est favorisée par le contrôle thermodynamique alors que les dioxolanes sont obtenus sous contrôle cinétique ($k_5 > k_6$).

L'acétalisation étant réversible, en présence d'un catalyseur acide, ces deux produits sont en équilibre, et leurs proportions vont refléter leur stabilité relative. Les acétals à 6 chaînons, les dioxanes, vont alors devenir les produits majoritaires si on prolonge le temps de réaction pour favoriser le contrôle thermodynamique par rapport au contrôle cinétique.

Il est important de noter que le rapport dioxane/dioxolane peut varier en faisant varier les paramètres environnementaux de la réaction et notamment la température. L'équilibre précédent peut être déplacé vers la formation de cycles de type dioxane en abaissant la température. Cela s'explique par le fait que l'entropie favorise les cycles dioxolanes plus flexibles.

Plus récemment la synthèse sous contrôle thermodynamique s'est révélée être un outil de choix pour la synthèse de molécules d'architectures complexes comme les rotaxanes et les caténanes. (Figure I8)

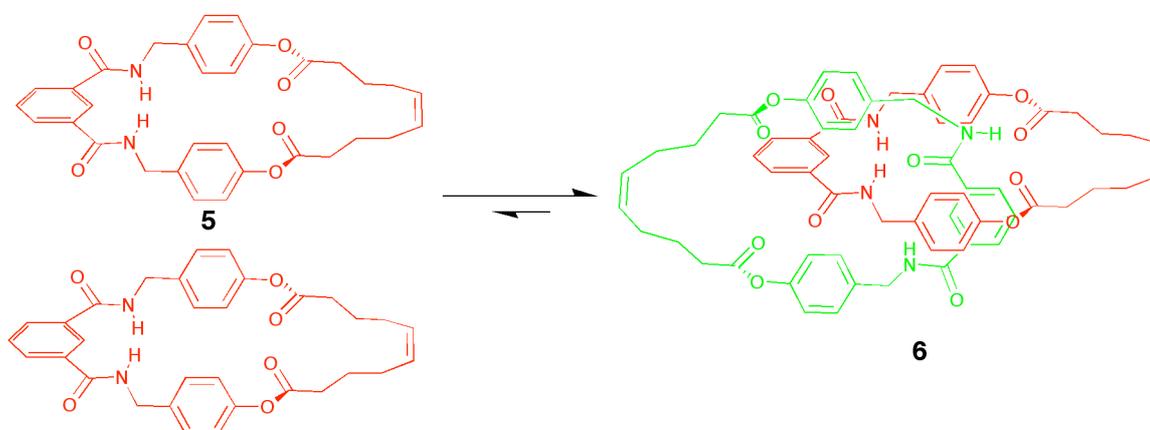


Figure I8: Formation d'un [2] caténane **6** par métathèse d'oléfine sous contrôle thermodynamique favorisé par des interactions entre noyaux aromatiques π -électron riche/ π -électron pauvre.

La métathèse d'oléfines, connue pour être réversible en présence de certains catalyseurs, a été utilisée pour la synthèse sous contrôle thermodynamique du caténane **6** avec un rendement quantitatif.⁹ Il est intéressant de noter que pour cet exemple la concentration initiale des réactifs joue un rôle crucial dans la proportion des différentes espèces à l'équilibre. A des concentration basses (0,2 mM), seul le macrocycle non interloqué de départ est présent alors qu'à des concentrations supérieures à 0,2 M d'autres oligomères cycliques font leur apparition.

D'autres exemples de ce type ont été décrits.¹⁰ La formation réversible d'imine a également été utilisée pour la préparation de rotaxanes.¹¹ (Figure I9)

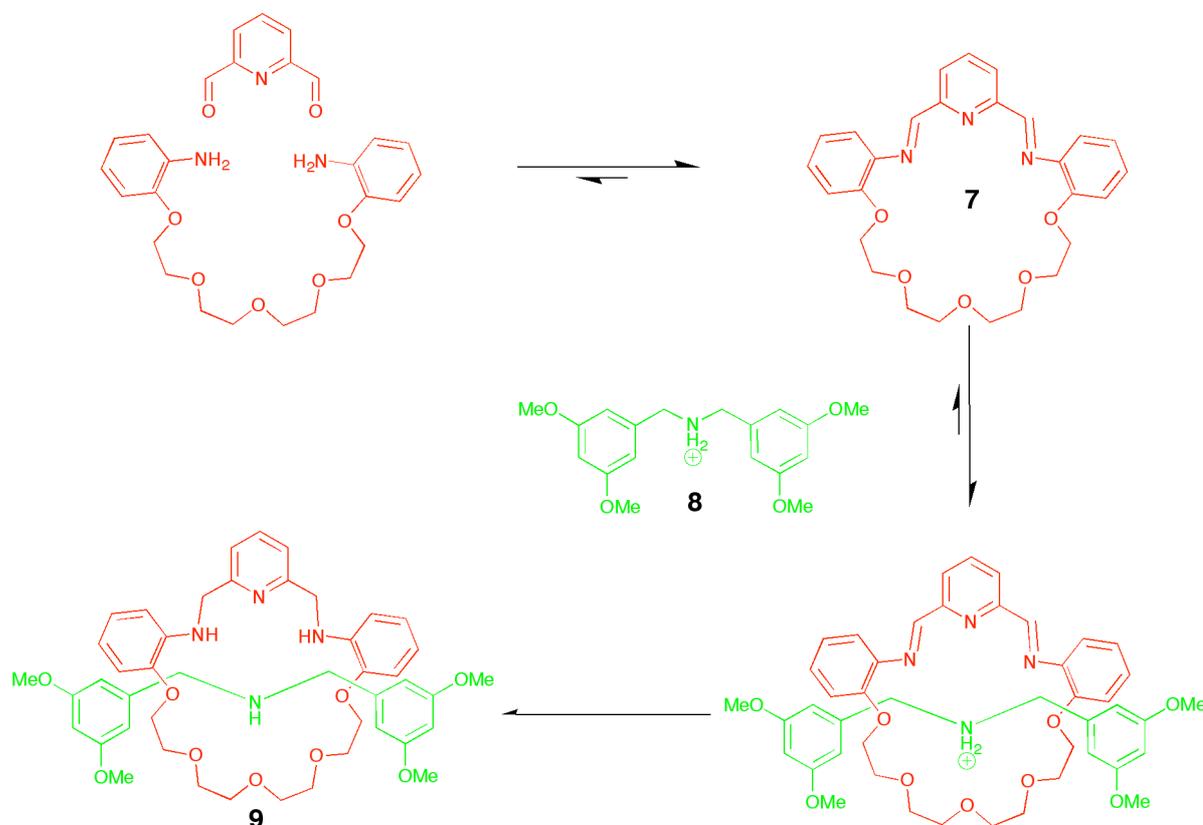


Figure I9: Formation d'un [2] caténane **9** par formation réversible d'imines sous contrôle thermodynamique en utilisant l'interaction entre les ions ammoniums **8** et un éther couronne **7**.

Les réactions covalentes réversibles et les interactions supramoléculaires peuvent également être utilisées pour générer un mouvement moléculaire de type repliement–

⁹ Organic "Magic Rings": The Hydrogen Bond-Directed Assembly of Catenanes under Thermodynamic Control. T. J. Kidd, D. A. Leigh, A. J. Wilson. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121,1599-1600.

¹⁰ Supramolecular Templating in Thermodynamically Controlled Synthesis. R. L. E. Furlan, S. Otto, J. K. M. Sanders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 8, 4801-4804.

¹¹ Template-Directed Synthesis of a [2] Rotaxane by the Clipping under Thermodynamic Control of a Crown Ether Like Macrocycle Around a Dialkylammonium Ion. P. T. Glink, A. I. Oliva, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 1870-1874.

dépliage¹² (Schéma I2) ou alors de type translation comme dans le cas du rotaxane **10**.¹³(Figure I10)

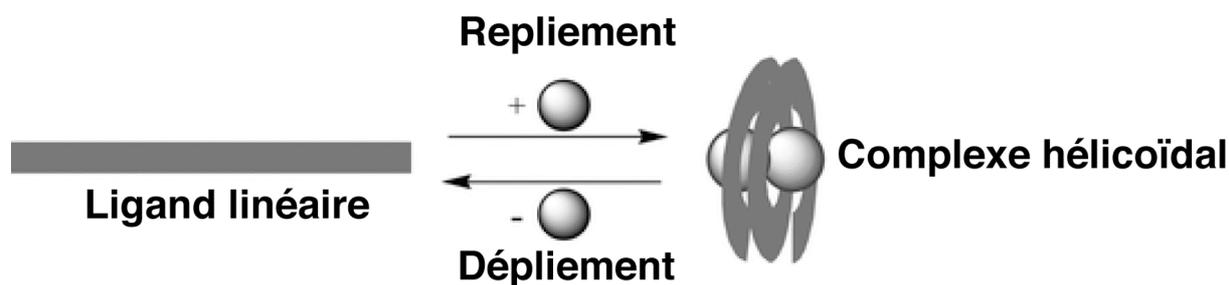


Schéma I2: Représentation schématique d'un mouvement de dépliement-repliement moléculaire basé sur une réaction de coordination réversible.

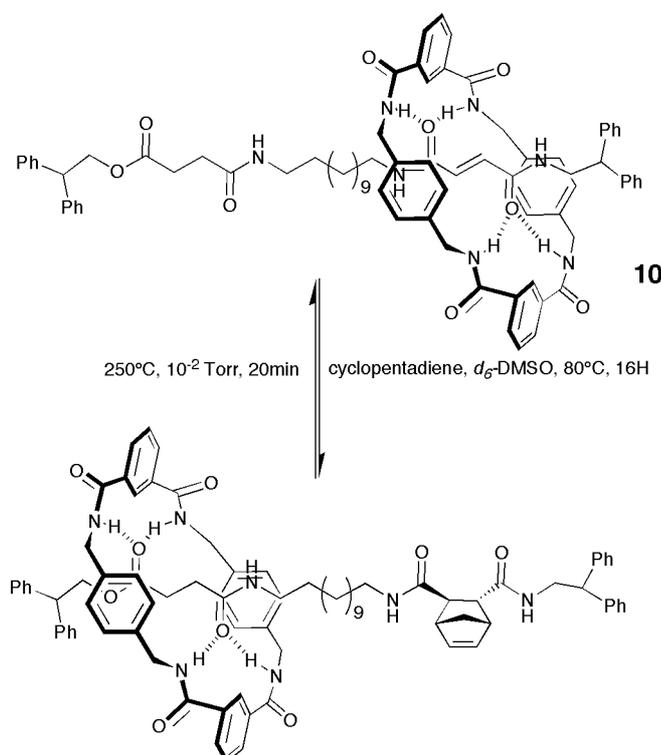


Figure I10: Mouvement de translation moléculaire basé sur une réaction de Diels-Alder réversible.

Nous venons de voir que la chimie constitutionnelle dynamique englobe la synthèse sous contrôle thermodynamique dans le sens où un ensemble de produits ou combinaisons des réactifs sont en équilibre. Dans ce cas ce sont les différences d'énergie libre des produits qui déterminent les concentrations relatives à l'équilibre. D'après les principes de la thermodynamique, ces proportions sont soumises à l'influence des paramètres environnementaux comme la concentration et la température.

¹² Reversible Folding/Unfolding of Linear Molecular Strands into Helical Channel-like Complexes upon Proton-modulated Binding and Release of Metal Ions. A.-M. Stadler, N. Kyritsakas, J.-M. Lehn. *Chem. Commun.* **2004**, 2024-2025.

¹³ Shuttling Through Reversible Covalent Chemistry. D. A. Leigh, E. M. Pérez. *Chem. Commun.* **2004**, 2262-2263.

Comme dans l'approche supramoléculaire de la chimie constitutionnelle dynamique, la proportion des espèces à l'équilibre peut également être influencée par l'introduction de facteurs externes comme une cible moléculaire. C'est ce qui nous emmène vers le concept de chimie combinatoire dynamique.^{14a-b}

La chimie combinatoire dynamique

Il s'agit d'une application particulière du principe de chimie constitutionnelle dynamique qui met l'accent sur la diversité. Cela peut se faire en augmentant la diversité structurelle des constituants de base, qui une fois mélangés pourront alors donner lieu à la formation d'un plus grand nombre de combinaisons en équilibre les unes avec les autres par le biais d'échanges de constituants. Cette méthodologie a notamment été mise à profit pour la découverte de récepteurs ou de ligands à partir de mélanges constitutionnels dynamiques.

Cette nouvelle approche de la synthèse combinatoire vise non pas à synthétiser de vastes collections de molécules isolées et caractérisées séparément mais à générer, dans un même mélange, des bibliothèques de composés issus de l'assemblage réversible et donc dynamique de constituants de base.(Figure I11)

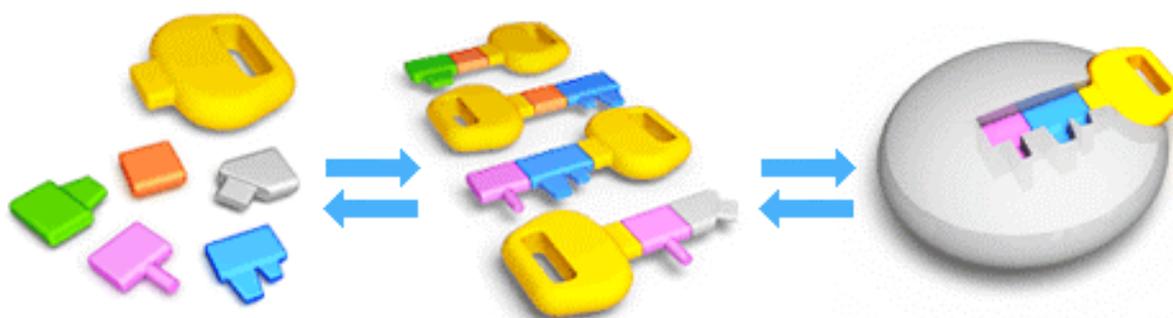


Figure I11: Représentation schématique du principe de la chimie combinatoire dynamique. La bibliothèque dynamique est composée de briques élémentaires s'associant entre elles de manière réversible par des liaisons covalentes ou non. En solution, toutes les combinaisons possibles sont générées dans des proportions définies par l'équilibre thermodynamique du système. Si on introduit dans le milieu réactionnel une cible moléculaire, alors la dynamique de l'équilibre sera modifiée et le composant de la bibliothèque ayant la plus grande affinité pour le récepteur sera amplifié et sélectionné *in situ*. On peut ainsi l'identifier soit en gelant l'équilibre réactionnel, soit en l'isolant avec la cible. Dans le cas idéal d'une bibliothèque virtuelle, les différentes associations de briques élémentaires ne sont observables qu'en présence de la matrice.

L'aspect principal de la chimie combinatoire dynamique (CCD) est basé sur le concept de l'évolution moléculaire dirigée¹⁵ qui peut avoir lieu au sein de telles bibliothèques.

¹⁴ a) Drug Discovery by Dynamic Combinatorial Libraries. O. Ramström, J.-M. Lehn. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 26-36. b) Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. J.-M. Lehn. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2455.

¹⁵ Molecular Evolution : Dynamic Combinatorial Libraries, Autocatalytic Networks and the Quest for Molecular Function. G. R. L. Cousins, S.-A. Poulsen and J. K. M. Sanders. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 270-279.

Par comparaison avec l'évolution Darwinienne, on peut imposer une pression de sélection sur un système chimique en équilibre en incorporant par exemple une cible capable de générer un effet de matrice (effet "Template" ou effet de gabarit). La présence de cette matrice peut, par l'intermédiaire de phénomènes de reconnaissance moléculaire (liaisons hydrogène, complexation hôte-invité, séquestration...), favoriser l'amplification d'un ou plusieurs composants. (Figure I12)

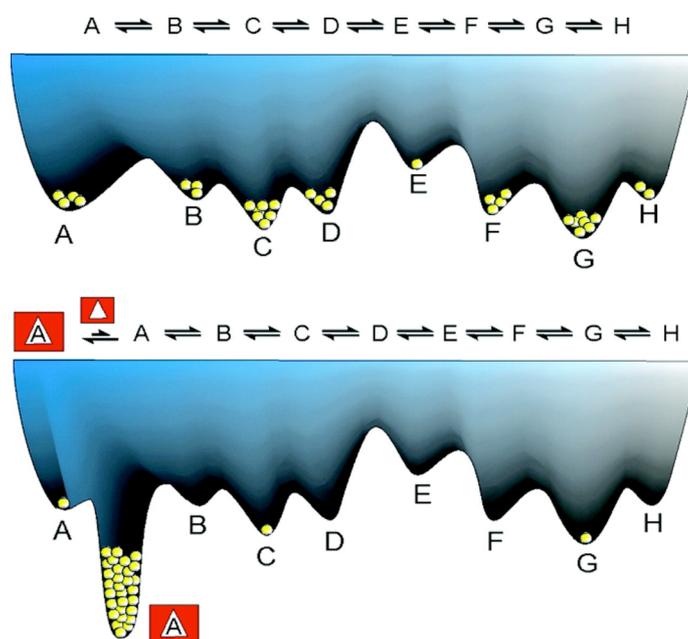


Figure I12: Diagramme d'énergie libre d'une bibliothèque combinatoire dynamique¹⁰ en l'absence (en haut) et en présence (en bas) d'une cible moléculaire qui lie fortement et sélectivement une des espèces (A) en équilibre.

Les interactions moléculaires entre la matrice et certains composants du mélange constituent un avantage du point de vue de la sélection. Si ces constituants ne sont pas majoritaires, ou même si leur présence n'est pas significative en l'absence de la cible ("notion" de virtualité¹⁶), leur formation est privilégiée, et leur concentration augmente en présence de celle-ci. (Figure I11, Schéma I1)

Dans le cadre de la recherche pharmaceutique cette approche a déjà montré son efficacité par l'identification de nouvelles substances actives, sélectionnées *in situ* par la cible biologique elle-même.^{17 a-c}

¹⁶ Virtual Combinatorial Libraries : Dynamic Generation of Molecular and Supramolecular Diversity by Self-Assembly. I. Huc, J.-M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106-2110.

¹⁷ a) Drug Discovery by Dynamic Combinatorial Libraries. O. Ramström, J.-M. Lehn. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 26-36. b) In Situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin A. O. Ramström, J.-M. Lehn. *ChemBioChem* **2000**, 1, 41-48. c) Target-Accelerated Combinatorial Synthesis and Discovery of Highly Potent Antibiotics Effective Against Vancomycin-Resistant Bacteria. K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smethurst, H. Lbischinsky, R. Endermann. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3823-3828.

Par exemple, la formation d'un complexe entre un membre d'une bibliothèque combinatoire dynamique (BCD) et une molécule d'intérêt biologique (enzyme, acide nucléique,...) peut entraîner l'amplification de cette combinaison.(Figure I13)

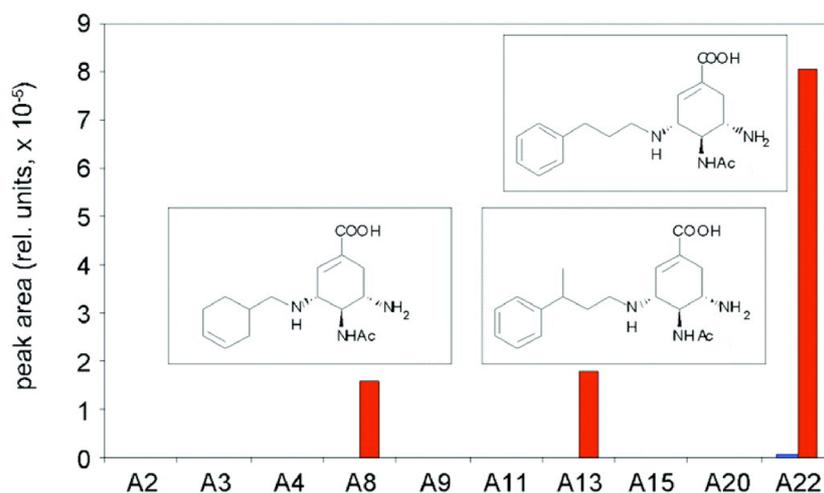


Figure I13: Expression relative des composants d'une bibliothèque combinatoire dynamique en présence (barres rouges) et en l'absence (barres bleues) d'une cible enzymatique, la neuraminidase.¹⁸

La Chimie Combinatoire Dynamique appliquée aux saccharides

Du fait de l'implication des saccharides dans de nombreux phénomènes biologiques ceux-ci ont été parmi les premières biomolécules à être incorporées dans des bibliothèques combinatoires dynamiques.

Le premier exemple de ce type de bibliothèque a été réalisé en utilisant la formation réversible de complexes métalliques du Fe²⁺ et d'unités bipyridines décorées par des résidus N-acétylgalactosamine.¹⁹ Il a été montré que la distribution du mélange de stéréo-isomères obtenus peut être perturbée par l'addition de lectines sélectives pour les résidus N-acétylgalactosamines.

Des travaux ont déjà été menés dans ce domaine au laboratoire et ont permis la création de bibliothèques de disaccharides liés par des ponts disulfures pouvant s'échanger dans certaines conditions.²⁰ La présence d'un récepteur naturel de saccharides, la lectine concavalin A, supporté sur résine a permis l'identification des meilleurs ligands et entraîné une redistribution des membres de la bibliothèque. La dynamique d'échange des ponts

¹⁸ Target-induced Formation of Neuraminidase Inhibitors from *In Vitro* Virtual Combinatorial Libraries. M. Hochgürtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 3382-3387.

¹⁹ A Self-adjusting Carbohydrate Ligand for GalNAc Specific Lectins. S. Sakai, Y. Shigemasa, T. Sasaki. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 38, 8145-8148.

²⁰ In Situ Generation and Screening of a Dynamic Combinatorial Carbohydrate Library against Concanavalin. A. O. Ramström, J.-M. Lehn. *ChemBioChem* **2000**, 1, 41-48.

disulfures a été mise à profits dans d'autres études visant à la préparation de BCD dont un des membres dérivait du saccharose.²¹

Une autre équipe a développé une bibliothèque dynamique d'analogues de l'acide sialique en se basant sur la formation et la coupure de liaisons carbone-carbone par une enzyme catalysant la réaction de condensation aldolique dans des conditions physiologiques.²²

D'autres enzymes ont permis de rendre dynamique la liaison glycosidique elle-même et de générer par ce biais des dérivés glycosylés de substances actives comme la vancomycine (Figure I14), la calicheamicine et les avermectines.²³ Cette méthodologie a été utilisée dans une approche combinatoire pour préparer des bibliothèques de substances actives glycosylées par différents groupements glycosyles. Il a été montré que deux glycosyltransférases peuvent être utilisées en tandem pour catalyser des transferts de groupements glycosyles entre des molécules de structure différentes.

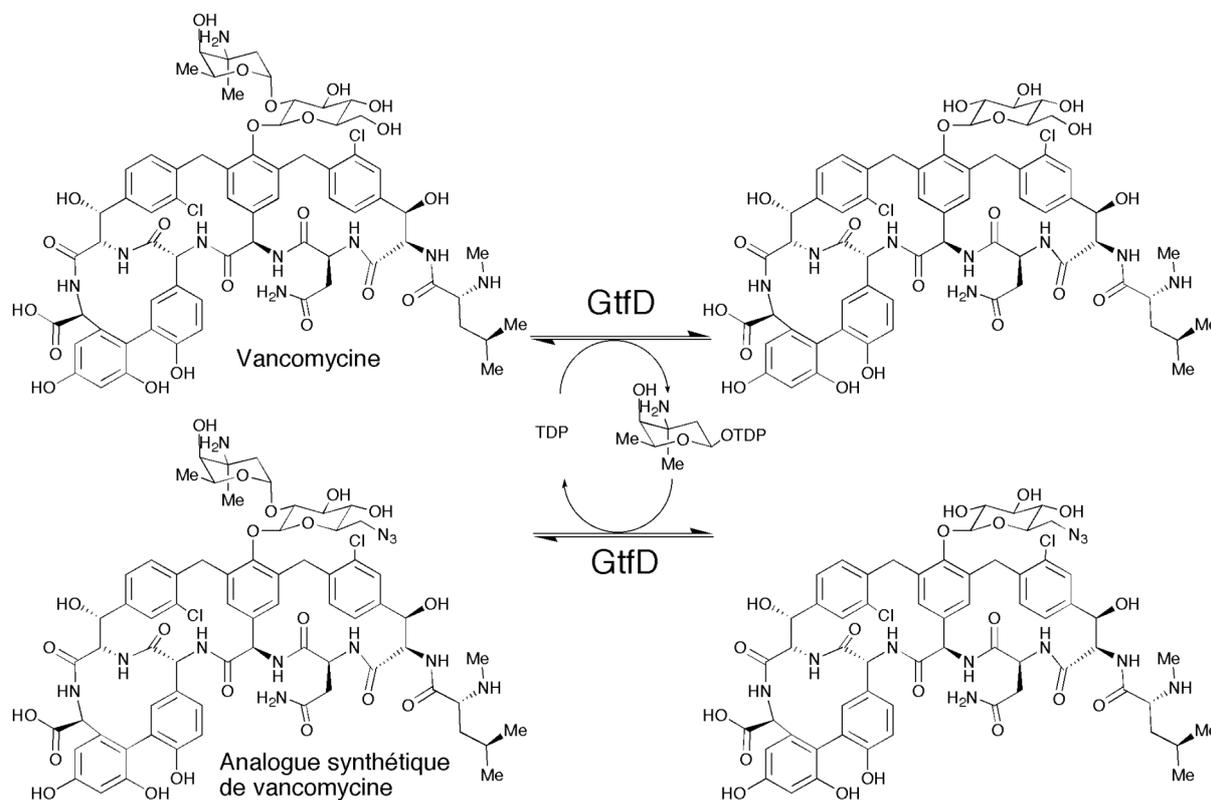


Figure I14: Réactions catalysées par la vancomycine glycosyltransférase (GtfD), TDP=Thymidine DiPhosphate. La réversibilité de la réaction de glycosylation catalysée par la GtfD a été exploitée pour la préparation d'analogues non naturels de la vancomycine.

²¹ Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides in Water. S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12063-12064.

²² Enzymatic Generation and In Situ Screening of a Dynamic Combinatorial Library of Sialic Acid Analogues. R. J. Lins, S. L. Flitsch, N. J. Turner, E. Irving, S. A. Brown. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3405-3406.

²³ a) The in Vitro Characterization of the Iterative Avermectin Glycosyltransferase AveBI Reveals Reaction Reversibility and Sugar Nucleotide Flexibility. C. Zhang, C. Albermann, X. Fu, J. S. Thorson. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 123, 16420-16421. b) Exploiting the Reversibility of Natural Product Glycosyltransferases-Catalysed Reactions. C. Zhang, B. R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I.K. Lee, J. S. Thorson. *Science* **2006**, 313, 1291-1294.

Cependant, cette approche implique la présence d'une enzyme pour établir les équilibres et par conséquent, une cible biologique potentielle est déjà présente dans la bibliothèque et peut biaiser le comportement de celle-ci. C'est pourquoi une approche purement chimique est souhaitable.

D'autres exemples d'applications de la chimie combinatoire à des dérivés de saccharides ont été décrits dans différents domaines. Des acides nucléiques ont aussi été utilisés comme cible moléculaire²⁴ et des bibliothèques d'inhibiteurs du lysozyme (Figure I15) et de la galactosyltransferase basées sur la formation réversible d'imine ont été décrites.²⁵ Les formations réversibles d'esters boroniques et d'esters organiques ont été utilisées pour la synthèse sous contrôle thermodynamique d'inositol protégé²⁶ ou l'amplification de récepteurs synthétiques de saccharides.²⁷

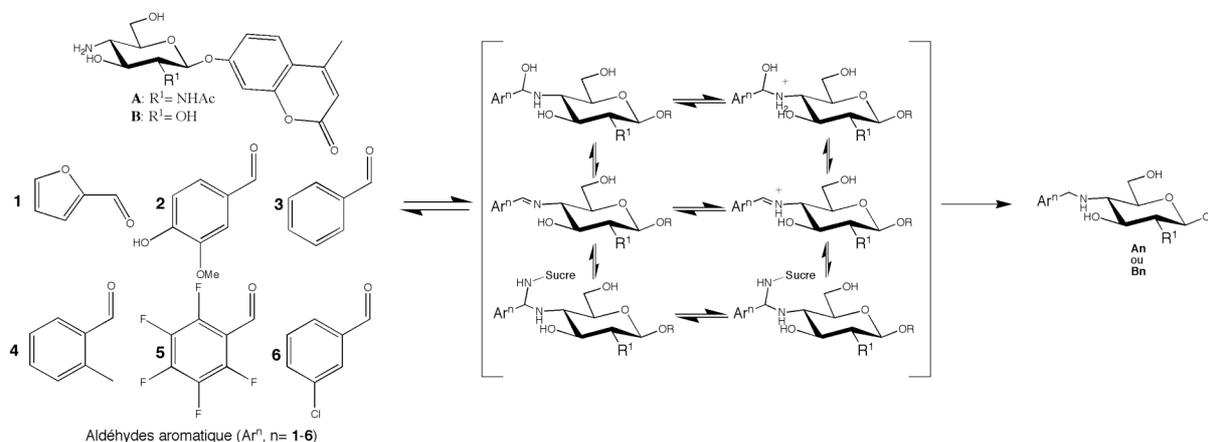


Figure I15: Exemple de bibliothèque combinatoire d'imines générée par mélange d'amines dérivées de sucres et d'aldéhydes aromatiques. Après équilibration le mélange d'imine a été réduit en amine par traitement par le $NaBH_3CN$. Il a été montré qu'en présence de lysozyme la combinaison **A2** est amplifiée majoritairement et qu'elle possède une affinité pour le lysozyme comparable au disaccharide chitobiose.

²⁴ a) Targetting Nucleic Acid Secondary Structures with Polyamides Using an Optimized Dynamic Combinatorial Approach. S. Ladame, A. M. Withney, S. Balasubramanian. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5736-5739. b) Use of Dynamic Combinatorial Chemistry for the Identification of Covalently Appended Residues that Stabilize Oligonucleotide Complexes. A. Bugaut, J. J. Toulmé, B. Rayner. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3144-3147.

²⁵ a) Dynamic Combinatorial Chemistry: Lysozyme Selects an Aromatic Motif That Mimics a Carbohydrate Residue. S. Zarneo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 965-969. b) Target-Assisted Selection of Galactosyltransferase Binders from Dynamic Combinatorial Libraries. An Unexpected Solution with Restricted Amount of the Enzyme. A. Valade, D. Urban, J.-M. Beau. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1023-1027. c) Two Galactosyltransferases Selection of Different Binders from the Same Uridine-Based Dynamic Combinatorial Library. A. Valade, D. Urban, J.-M. Beau. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 1-4.

²⁶ Molecular Evolution using Intramolecular Acyl Migration on Myo-inositol Benzotes with Thermodynamic and Kinetic Selectors. Y.-H. Ahn and Y.-T. Chang. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3543-34547.

²⁷ Molecular Design of Synthetic Receptors with Dynamic, Imprinting, and Allosteric Functions. S. Shinkai, M. Takeuchi. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 1250-1259.

Limitations théoriques du concept de chimie combinatoire dynamique

Malgré l'élégance de la démarche, on peut raisonnablement se poser la question des limites théoriques de cette approche. En effet on conçoit intuitivement que plus une bibliothèque combinatoire dynamique sera complexe, plus il sera difficile d'en analyser le comportement et l'évolution. Cela en prenant en compte uniquement la difficulté d'analyse du mélange. Même avec les progrès actuels des techniques d'analyses couplées comme la LC-MS (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse) notamment et les techniques d'analyses en solution comme la RMN il reste encore difficilement concevable d'analyser des mélanges complexes de milliers voire de centaines de milliers de molécules.

C'est pourquoi différentes alternatives à l'analyse directe ont été proposées et expérimentées. La première chose à laquelle on pense est de pousser le principe de Le Chatelier à l'extrême en retirant complètement l'espèce d'intérêt de l'équilibre. C'est ce qui se passe par exemple lorsqu'un des membres de la bibliothèque précipite ou cristallise.²⁸ (Figure I16)

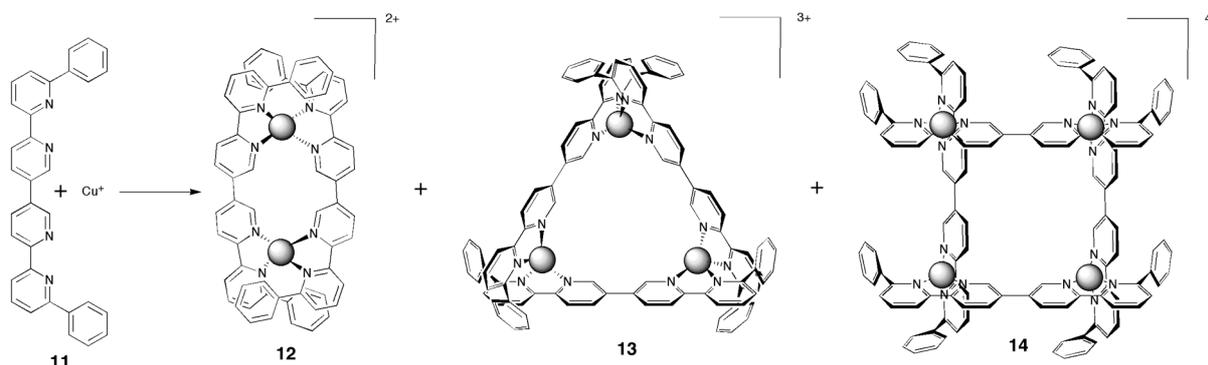


Figure I16: Le ligand 11 et les ions Cu^I génèrent par auto-assemblage en solution un mélange de complexes en double hélice 12, triangulaire 13 et de type grille 14. Ces complexes sont en équilibre en solution, il s'agit d'une bibliothèque combinatoire dynamique de complexes métalliques. De ce mélange, seul le complexe hélicoïdal 12 cristallise, ce qui déplace totalement l'équilibre vers ce produit à l'état solide. La dissolution des cristaux permet de retrouver le mélange initial.

Dans cette situation, l'équilibre est complètement déplacé vers la formation d'un produit. Pour appliquer ce principe à des cibles moléculaires on peut envisager d'utiliser des méthodes de séparations basées sur l'affinité pour la cible. Différentes approches expérimentales ont d'ailleurs été décrites ou proposées à ce sujet.^{29a-b} (Schéma I3)

²⁸ Generation of an Equilibrating Collection of Circular Inorganic Copper(I) Architectures and Solid-state Stabilisation of the Dicopper Helicate Component. P. N. W. Baxter, J.-M. Lehn, K. Rissanen. *Chem. Commun.* **1997**, 1323-1324.

²⁹ a) Use of Molecular Recognition To Drive Chemical Evolution : Mechanisms of an Automated Genetic Algorithm Implementation. A. V. Eliseev, M. I. Nelen. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 5, 825-834. b) The Advantage of Being Virtual-

On peut également séparer l'analyse d'une bibliothèque complexe en sous-bibliothèques que l'on aura simplifiées de manière séquentielle³⁰ (Figure I17) après des essais préliminaires sur la bibliothèque entière pour déterminer les briques de bases les plus intéressantes.³¹

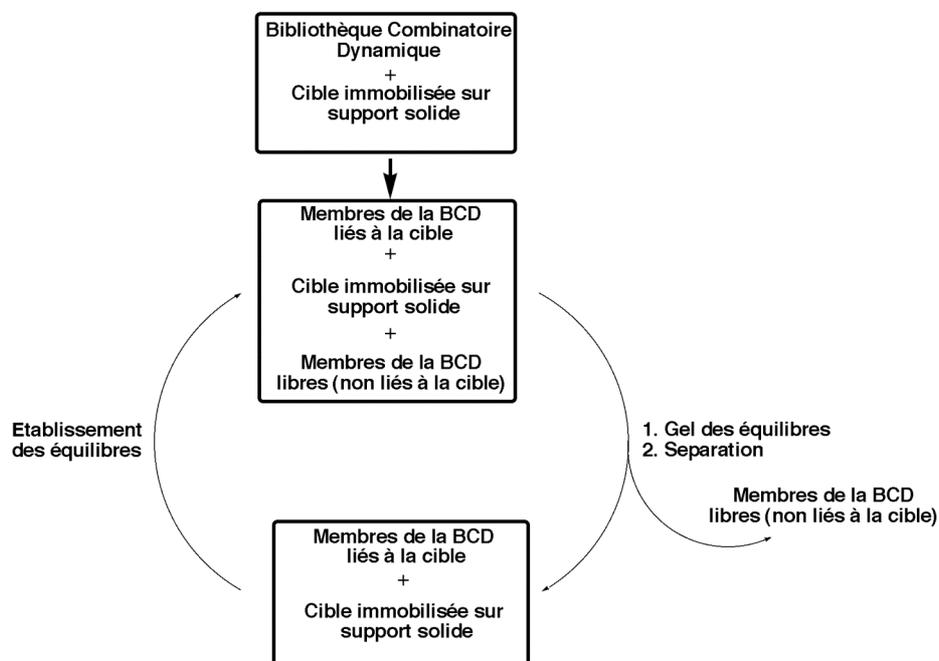


Schéma I3: Procédé itératif pour la sélection des membres d'une bibliothèque combinatoire dynamique (BCD) ayant une forte affinité pour une cible moléculaire immobilisée sur support solide.^{18b}

Target Induced Adaptation and Selection in Dynamic Combinatorial Libraries. K. Severin. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2665-2680.

³⁰ Dynamic Deconvolution of a Preequilibrated Dynamic Combinatorial Library of Acetylcholinesterase Inhibitors. T. Bunyapaiboonsri, O. Ramström, S. Lohmann, J.-M. Lehn, L. Peng, M. Goeldner. *ChemBioChem.* **2001**, 2, 438-444.

³¹ What are the Limits to the Size of Effective Dynamic Combinatorial Libraries? P. T. Corbet, S. Otto, J. K. M. Sanders. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1825-1827.

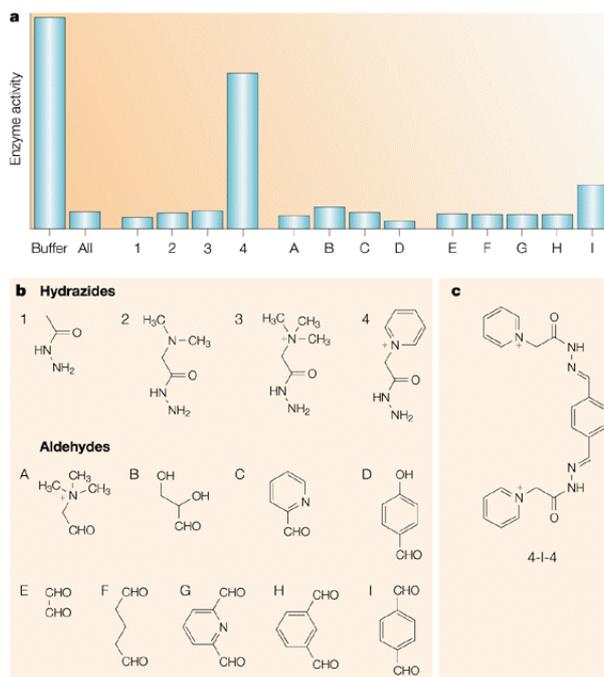


Figure I17: Déconvolution dynamique d'une bibliothèque combinatoire dynamique d'acylhydrazones testés vis-à-vis de l'inhibition d'une acétylcholine esterase. a) La suppression séquentielle de chaque brique de base dont les structures sont représentées en b) permet d'évaluer les activités individuelles. c) La combinaison des molécules 4 et I fournit le meilleur inhibiteur.

A cette difficulté d'analyse s'ajoute la difficulté de savoir si c'est effectivement le ou les composés ayant la meilleure affinité pour la cible qui sont amplifiés. En effet des exemples expérimentaux ont montré des divergences entre l'amplification et la constante d'affinité. Dans les travaux cités précédemment et portant sur la découverte d'inhibiteurs de la neuraminidase par CCD¹⁸, le composé ayant le facteur d'amplification le plus élevé n'est pas celui possédant la meilleure affinité pour la cible. (Figure 18)

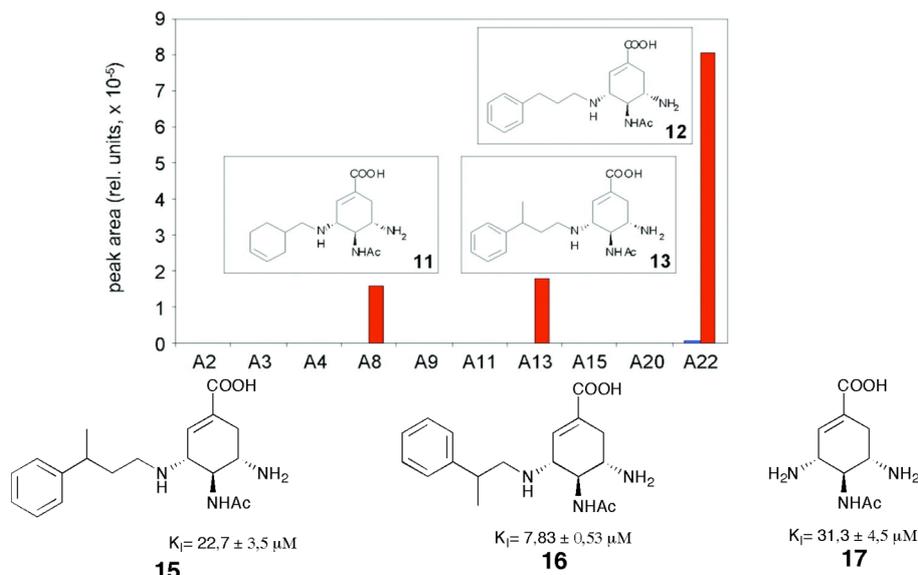


Figure I18: A) Expression relative des composants d'une bibliothèque combinatoire dynamique en présence (barres rouges) et en l'absence (barres bleues) d'une cible enzymatique, la neuraminidase. B) On constate que bien que le composé **15** soit fortement amplifié lors de l'expérience de sélection par la cible, son activité n'est pourtant pas beaucoup plus importante que celle de l'amine de départ **17**. De plus le composé **16** possède une meilleure activité que le composé **15** et n'est pas amplifié lors de l'expérience.

Dans cet exemple l'analyse de la bibliothèque combinatoire dynamique s'est fait après la réduction des fonctions réversibles imines, en amines. Les auteurs expliquent les faibles corrélations entre activité des amines obtenues après réduction et leurs amplifications relatives par un biais résultant de la réduction qui modifie les propriétés stéréoelectroniques de l'inhibiteur.

Severin a également mis en évidence que ce n'est pas nécessairement les composés ayant la meilleure affinité pour la cible dont la concentration augmente le plus en sa présence.³² Il est même possible que l'addition de cette cible entraîne une baisse en concentration de certains des meilleurs ligands.³³ (Figure I19)

³² Adaptive Behavior of Dynamic Combinatorial Libraries Generated by Assembly of Different Building Blocks. Z. Grote, R. Scopelliti, K. Severin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3821-3825.

³³ Selection Experiments with Dynamic Combinatorial Libraries : the Importance of the Target Concentration. I. Saur, K. Severin. *Chem. Commun.* **2005**, 1471-1473.

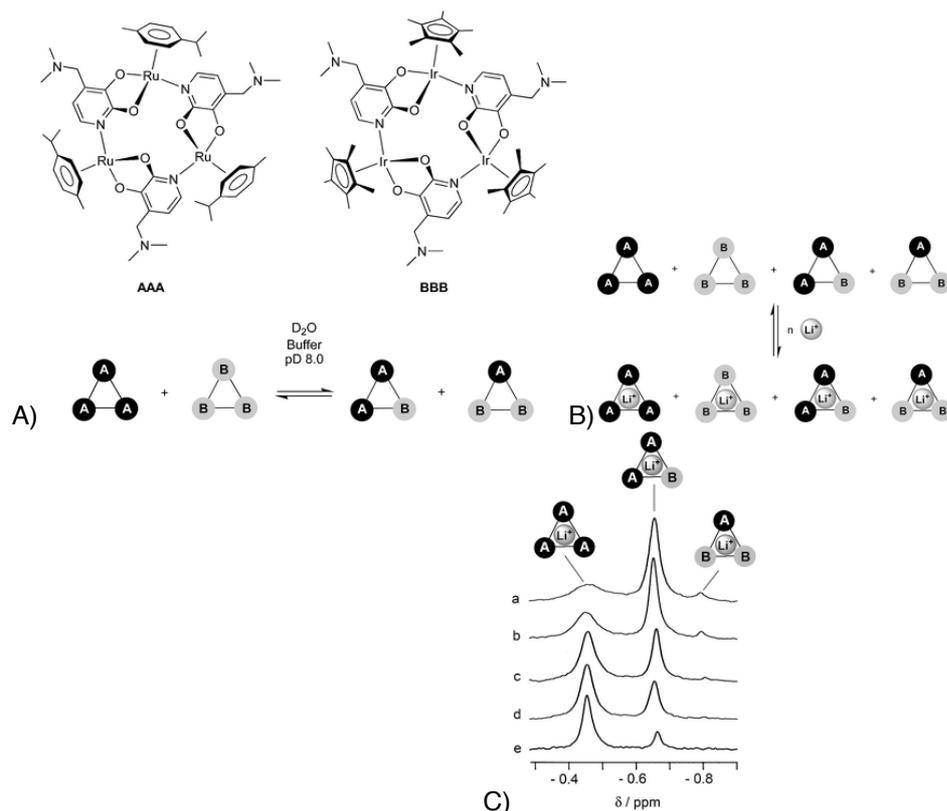


Figure I19: A) En solution les espèces trimétalliques AAA et BBB échangent rapidement leurs constituants pour générer un mélange dynamique d'assemblages homo et hétérométalliques. B) L'addition d'ion Li^+ à ce mélange de récepteurs macrocycliques AAA, BBB, AAB, ABB constitue une bibliothèque combinatoire dynamique. C) Spectre RMN du ^7Li (D_2O) du mélange de récepteurs macrocycliques AAA, BBB, AAB, ABB à une concentration totale de 5,0 mM après équilibration en présence de 0.2 (e), 2.5 (d), 5.0 (c), 15 (b), et 40 équivalents de Li^+ (a).

Dans cet exemple lorsque la concentration de cible est basse (voir Figure I19 c)(e)) c'est bien le récepteur ayant la meilleure affinité pour la cible AAA qui est amplifié. Par contre lorsque l'on augmente la concentration en Li^+ , l'espèce AAB devient progressivement majoritaire, alors que son affinité pour la cible est moindre que celle du récepteur AAA.

Cela confirme les simulations qui prévoient qu'à des concentrations élevées de cible moléculaires la corrélation entre l'affinité et l'amplification est moins bonne. Les auteurs de cette étude mettent en évidence la supériorité des bibliothèques virtuelle combinatoires dynamiques pour lesquelles les amplifications provoquées par une cible potentielle sont les plus fortes.^{29b}

Une autre étude expérimentale a montré ce même type de comportement lorsque les affinités pour la cible de différents membres de la bibliothèque sont similaires, ou lorsque cette cible est présente en large excès.³⁴

³⁴ Competition between Receptors in Dynamic Combinatorial Libraries: Amplification of the Fittest? P. T. Corbett, J. K. M. Sanders, S. Otto. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9390-9392.

L'intérêt de ces études réside principalement dans la proposition de conditions expérimentales optimales permettant une amplification maximale des meilleurs ligands. En effet, la corrélation entre affinité et amplification peut être perturbée par la présence dans la bibliothèque de composés d'affinité moyenne comprenant des briques nécessaires à la construction des meilleurs ligands. Ces composés modèrent l'amplification des meilleurs ligands en consommant les unités de bases qui les constituent. La réduction de la concentration en cible peut permettre d'éviter ce type de biais en favorisant l'amplification des meilleurs ligands. L'analyse d'une bibliothèque combinatoire dynamique peut donc être plus efficace en faisant varier la concentration de la cible. On peut par exemple travailler à des concentrations équimolaires de cible pour repérer les premières affinités pour ensuite faire une sélection des meilleurs ligands en réduisant la concentration de cible.³⁵ Ainsi il ressort de ces simulations que l'amplification des meilleurs ligands peut être effective dans des bibliothèques combinatoires dynamiques comprenant de 10 à 10⁶ composés.(Figure I20)

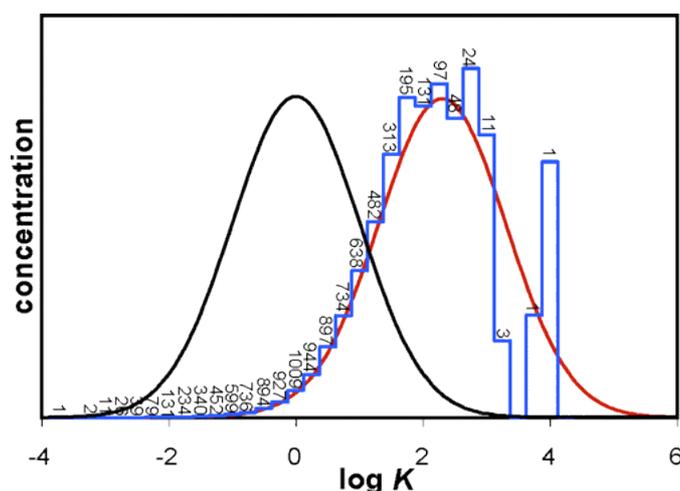


Figure I20: Les histogrammes représentent la composition d'une bibliothèque combinatoire dynamique en l'absence (noir) et en présence (rouge) d'une matrice et une simulation d'une BCD contenant 10000 composés (bleu). A chaque barre est assignée le nombre de composé pour chaque domaine d'affinité.

Ces simulations restent simplistes et ne prennent pas en compte différents facteurs pouvant être cruciaux. Par exemple un cas de modélisation de la modification de la séquence d'un polymère à l'équilibre par effet de gabarit à partir d'une séquence cible a été décrit.³⁶ Mais cette simulation ne prend pas en compte l'effet de la multivalence, ou de la coopérativité qui restent encore à ce jour mal compris malgré les différents modèles proposés. Plus généralement, ces simulations traitent d'équilibres en solutions et par

³⁵ Correlation between Host-Guest Binding and Host Amplification in Simulated Dynamic Combinatorial Libraries. P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3139-3143.

³⁶ "Masterpiece" Copolymer Sequences by Targeted Equilibrium-Shifting. J. S. Moore, N. W. Zimmerman *Org. Lett.* **2000**, 2, 915-918.

conséquent ne s'appliquent pas dès lors que l'on aborde le domaine des matériaux, qu'ils soient solides³⁷ ou sous forme de gels.³⁸

Ces études ne tiennent également pas compte de l'effet de la température sur la sélectivité thermodynamique.³⁹ On peut imaginer améliorer cette sélectivité en travaillant à des températures plus basses que la température ambiante. Mais évidemment qui dit température plus basse dit cinétique plus lente, ce qui peut poser d'autres problèmes que la perte de temps liée à l'analyse, comme la stabilité de la cible quand il s'agit de matériel biologique, dans les conditions expérimentales sur une longue durée, ou des problèmes de solubilité totale de la bibliothèque en particulier en solution aqueuse.

Nouvelles approches et perspectives en chimie combinatoire dynamique

Un autre type de bibliothèque dynamique a été décrit où les produits sont formés réversiblement, *in situ* au sein d'un cristal d'une protéine cible, dans des conditions d'équilibre thermodynamique.⁴⁰ Dans ce cas ce n'est pas la perturbation de l'équilibre qui permet l'identification des ligands, mais la modification de la densité électronique du site actif de la protéine en présence de bibliothèques combinatoires dynamiques. Il a été montré que cette modification de la densité électronique permet d'identifier le ligand d'intérêt parmi une BCD comptant 30 combinaisons possibles.

Outre les nouvelles méthodes d'analyses, l'essor de la chimie combinatoire dynamique et plus généralement de la chimie constitutionnelle dynamique nécessite également l'utilisation de nouvelles fonctions chimiques et la mise au point de nouvelles conditions expérimentales optimales et douces pour l'établissement des équilibres entre elles. Cela peut se faire en particulier par l'utilisation de catalyseurs.⁴¹

³⁷ Dynamic Polymer Blends-component Recombination between Neat Dynamic Covalent Polymers at Room Temperature. T. Ono, T. Nobori, J.-M. Lehn. *Chem. Commun.* **2005**, 1522-1524.

³⁸ Gelation-driven Component Selection in the Generation of Constitutional Dynamic Hydrogels based on Guanine-quartet Formation. N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 5938-5953.

³⁹ Protonic and Temperature Modulation of Constituent Expression by Component Selection in a Dynamic Combinatorial Library of Imines. N. Giuseppone, J.-M. Lehn. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1715-1722.

⁴⁰ Detection of Ligands from a Dynamic Combinatorial Library by X-ray Crystallography. M. S. Congreve, D. J. Davis, L. Devine, C. Granata, M. O'Reilly, P. G. Wyatt, H. Jhoti. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4479-4482.

⁴¹ Scandium(III) Catalysis of Transimination Reactions. Independent and Constitutionally Coupled Reversible Processes. N. Giuseppone, J.-L. Schmitt, E. Schwartz, J.-M. Lehn. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5528-5539.

L'apparition des bibliothèques pseudo combinatoires dynamiques est intéressante.⁴² Elle tire avantage des phénomènes de sélection par un récepteur jouant le rôle de groupement protecteur lors de la destruction des mauvais inhibiteurs.(Figure I21)

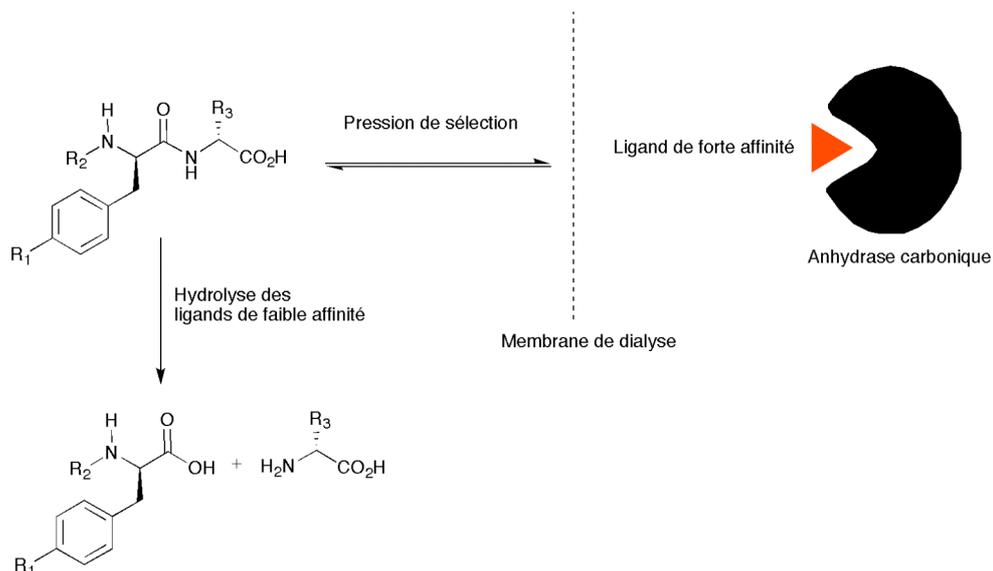


Figure I21: Principe d'une bibliothèque combinatoire pseudo-dynamique: L'enzyme cible est isolée dans une chambre formée par une membrane de dialyse. Les inhibiteurs traverseront cette membrane par diffusion plus rapidement si leur affinité pour l'enzyme est faible. A l'extérieur de cette chambre Une réaction de destruction irréversible et non sélective détruit les inhibiteurs d'autant plus vite que leur affinité est mauvaise.

⁴² Amplification of Screening Sensitivity through Selective Destruction: Theory and Screening of a Library of Carbonic Anhydrase Inhibitors. J. D. Cheeseman, A. D. Corbett, R. Shu, J. Croteau, J. L. Gleason, R. J. Kazlauskas. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5696-5701.

Les polymères dynamiques: Dynamères

On peut effectuer à ce niveau un parallèle avec la biologie moléculaire en prenant l'exemple particulier du cytosquelette qui se constitue par la polymérisation dynamique de monomères bien définis (actine, tubuline,...) et dont l'architecture s'adapte aux besoins de la cellule et de son environnement. Ces polymères biologiques ont une faculté d'adaptation leur conférant des propriétés telles que la croissance à partir de points donnés, l'auto réparation, ou encore la désagrégation à l'infini⁴³ en fonction des phases du cycle cellulaire.

La figure I22 montre l'exemple des microtubules qui constituent une partie du cytosquelette. Ces polymères dynamiques supramoléculaires résultent de l'auto assemblage induit par le GTP de dimères des tubulines α et β . L'hydrolyse du GTP (Guanosine-5'-triphosphate) en GDP (Guanosine-5'-diphosphate) entraîne une déstabilisation, puis la décomposition de cet assemblage polymérique. Comme ces événements sont réversibles, les microtubules sont en constante évolution que ce soit de part leur taille ou leur localisation en fonction des besoins de la cellule. Différentes substances pharmacologiques ont une influence sur la dynamique de polymérisation et la stabilité des microtubules.

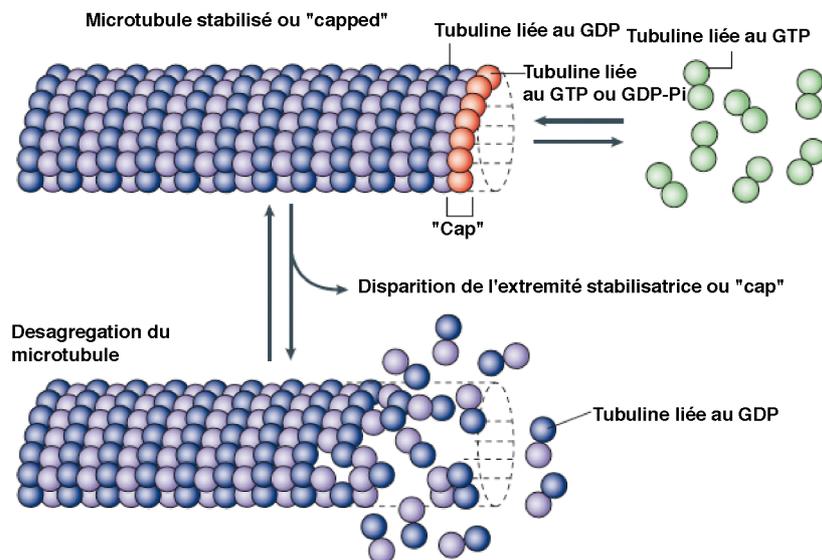


Figure I22: Dynamique d'association GTP-dépendante des tubulines α et β microtubules constituant du cytosquelette. Le polymère supramoléculaire ainsi obtenu est en équilibre avec sa forme dissociée, et sa structure est polaire (une extrémité +, et une extrémité -).

⁴³ a) Conserved Microtubule-actin Interactions in Cell Movement and Morphogenesis. O. C. Rodriguez, A. W. Schaefer, C. A. Mandato, P. Forscher, W. M. Bement, C. M. Waterman-Storer. *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 599-609. b) Microtubule Dynamics: Treadmilling comes around again. C. Waterman-Storer, E. D. Salmon. *Curr. Biol.* **1997**, 7, 369-372. c) Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. M. A. Jordan, L. Wilson. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253-265.

Cette adaptabilité peut être source d'inspiration pour le chimiste et c'est ainsi que la chimie des polymères dynamiques a été développée.^{44a-f} Bien que les polymères à l'équilibre sont connus et étudiés depuis de nombreuses années⁶ ce n'est que très récemment que les propriétés dynamiques de ces macromolécules ont été exploitées dans l'optique de la chimie constitutionnelle dynamique.

Ces polymères ont la particularité d'être composés de monomères liés entre eux par des liaisons covalentes ou non et dont la formation est réversible dans certaines conditions. Leur structure et leurs propriétés sont donc susceptibles de s'adapter en fonction des conditions dans lesquelles ils sont placés, et cela même après la polymérisation. Dans ce cadre, la chimie constitutionnelle dynamique pourrait avoir des retombées dans le domaine des matériaux dits "intelligents" dont les propriétés macroscopiques seraient modifiées par une dynamique au niveau moléculaire, contrôlée par les conditions environnantes.

Différents types de monomères et de liaisons chimiques ont été utilisés pour la synthèse de telles macromolécules

Les différents types de polymères dynamiques

Les polymères supramoléculaires, résultant de l'établissement de liaisons non covalentes entre les monomères, sont du fait de la faible énergie des interactions en jeu, par nature dynamiques. Ce domaine de recherche est très prolifique et ces dernières années ont vu émerger de nouveaux types de monomères ayant des propriétés nouvelles en tant que matériaux^{45a,b} (Figure I23).

On peut également noter l'utilisation de motifs classiques de reconnaissance moléculaire, comme l'appariement des acides nucléiques, basés sur la formation de doubles hélices d'ADN entre brins complémentaires.^{44e}

⁴⁴ a) Dynamers: Polyacylhydrazone Reversible Covalent Polymers, Component Exchange, and Constitutional Diversity. W. G. Skene, J.-M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 8270-8275. b) Dynamers: Dynamic Molecular and Supramolecular Polymers. J.-M. Lehn. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 814-831. c) Polymer Scrambling: Macromolecular Radical Crossover Reaction between the Main Chains of Alkoxyamine-Based Dynamic Covalent Polymers. H. Otsuka, K. Aotani, Y. Higaki, A. Takahara. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4064-4065. d) Dynamic Formation of Graft Polymers via Radical Crossover Reaction of Alkoxyamines. Y. Higaki, H. Otsuka, A. Takahara. *Macromolecules* **2004**, 37, 1696-1701. e) Modular, Well-Behaved Reversible Polymers from DNA-Based Monomers. E. A. Fogelman, W. C. Yount, J. Xu, S. L. Craig. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4026-4028. f) Synthesis of Functionalized Polyethers by Ring-Opening Metathesis Polymerization of Unsaturated Crown Ethers. H. D. Maynard, R. H. Grubbs. *Macromolecules* **1999**, 32, 6917-6924.

⁴⁵ a) Reversible Polymers formed from Self-Complementary Monomers using Quadruple Hydrogen Bonding. R. P. Sijbesma, F. H. Beijer, L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, J. H. K. K. Hirschberg, R. F. M. Lange, J. K. L. Lowe, E. W. Meijer. *Science* **1997**, 278, 1601-1604. b) Supramolecular Polymers. L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, E. W. Meijer, R. P. Sijbesma. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 4071-4097.

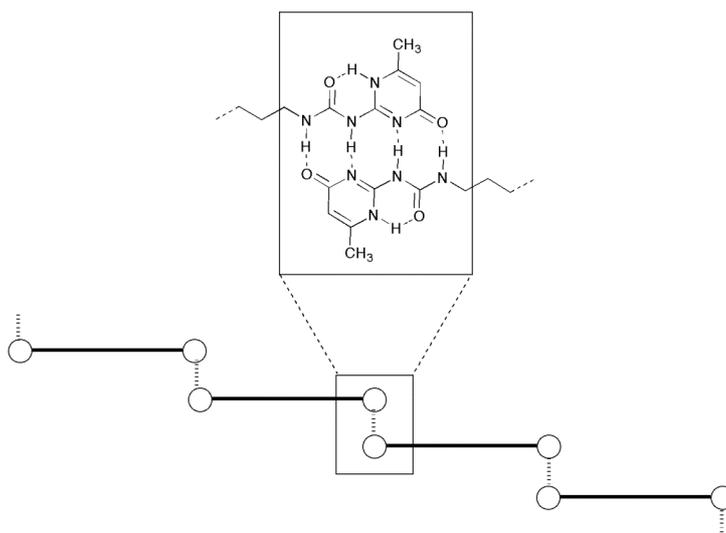


Figure I23: Exemple de polymère supramoléculaire basé sur un système auto-complémentaire à 6 liaisons hydrogènes.

Les polymères dynamiques de type covalent^{44a-d, 47} sont quant à eux basés sur l'introduction d'une ou plusieurs liaisons chimiques covalentes réversibles dans la jonction entre les monomères.

Comme mentionné précédemment de nombreux exemples de polymères de ce type ont été décrits. Ils résultent de la polymérisation de monomères portant des fonctions vinyliques (methylacrylate, dans des conditions expérimentales particulières où l'équilibre est déplacé par évacuation des monomères⁴⁶), aldéhydes (chloral), éther cycliques (THF), acétals cycliques (1,3-dioxolane), esters cycliques (lactide), amides cycliques (ϵ -caprolactam) et des monomères inorganiques (le soufre, ou l'octamethylcyclotetrasiloxane).⁷

Un polymère réversible offre des avantages par rapport à un polymère statique résultant d'une polymérisation irréversible.

En particulier, des variations d'environnement physique (température^{47a,b}, pression, pH, éclairage) peuvent influencer directement la structure covalente du polymère et induire ainsi une réorganisation au plan moléculaire. Les paramètres de l'environnement chimique, comme la présence d'un type de molécule (ion métallique, molécule hôte ou réceptrice, ...), ou un changement de solvant, sont également utilisables pour provoquer un phénomène d'évolution moléculaire dirigé.

Des exemples récents développés notamment au laboratoire ont démontré non seulement la faisabilité des échanges dans différentes conditions, mais également que les

⁴⁶ Reversibility of the Propagation Reaction in Polymerization Processes and its Manifestation in the Phenomenon of a "Ceiling Temperature". F. S. Danton, K. J. Ivin. *Nature* **1948**, 162, 705-707.

⁴⁷ a) A Thermally Re-Mendable Cross-Linked Polymeric Material. X. Chen, M. A. Dam, K. Ono, A. Mal, H. Shen, S. R. Nutt, K. Sheran, F. Wudl. *Science* **2002**, 295, 1698-1702. b) Thermal Reorganization and Molecular Weight Control of Dynamic Covalent Polymers Containing Alkoxyamines in Their Main Chains. H. Otsuka, K. Aotani, Y. Higaki, Y. Amamoto, and A. Takahara. *Macromolecules* **2007**, 40, 1429-1434.

phénomènes de sélection et de réorganisation des polymères ouvrent des perspectives dans des voies très diverses.

Il a été montré que des polymères polyiminofluorènes dynamiques basés sur la formation réversible d'imes subissent une réorganisation réversible en présence de certains ions métalliques. Ce qui permet alors de les détecter par le biais des propriétés spectroscopiques du senseur ainsi obtenu.⁴⁸(Figure I24)

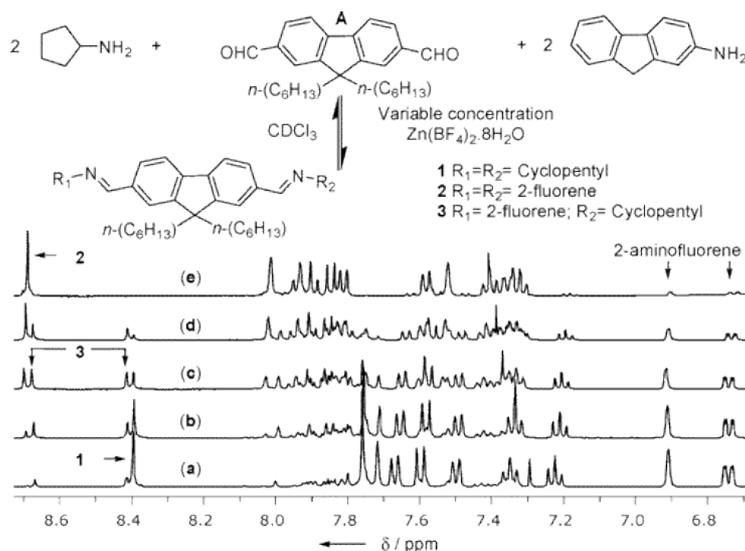


Figure I24: Bibliothèque constitutionnelle dynamique d'iminofluorènes. Les échanges sont catalysés par $Zn(BF_4) \cdot 8H_2O$. Sont représentés les spectres RMN du 1H ($CDCl_3$) à 400 MHz pour différentes concentrations de $Zn(BF_4) \cdot 8H_2O$ à 298K. (a) 0 M. (b) 3.10×10^{-2} M. (c) 6.2×10^{-2} M. (d) 8.68×10^{-2} M. (e) 1.24×10^{-1} M. Concentration initiale en A : 5.12×10^{-2} M.

Des phénomènes d'échanges et de réorganisation ont également été mis en évidence à l'état solide.³⁷ Ces travaux menés au laboratoire ont montré la faisabilité des réactions d'échanges et par conséquent des changements de constitution à l'état solide dans des films de polyacylhydrazones. (Figures I25-I26)

⁴⁸ Constitutional Dynamic Self-Sensing in a Zinc^{II}/Polyiminofluorenes System. N. Giuseppone, J.-M. Lehn. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11448-11449.

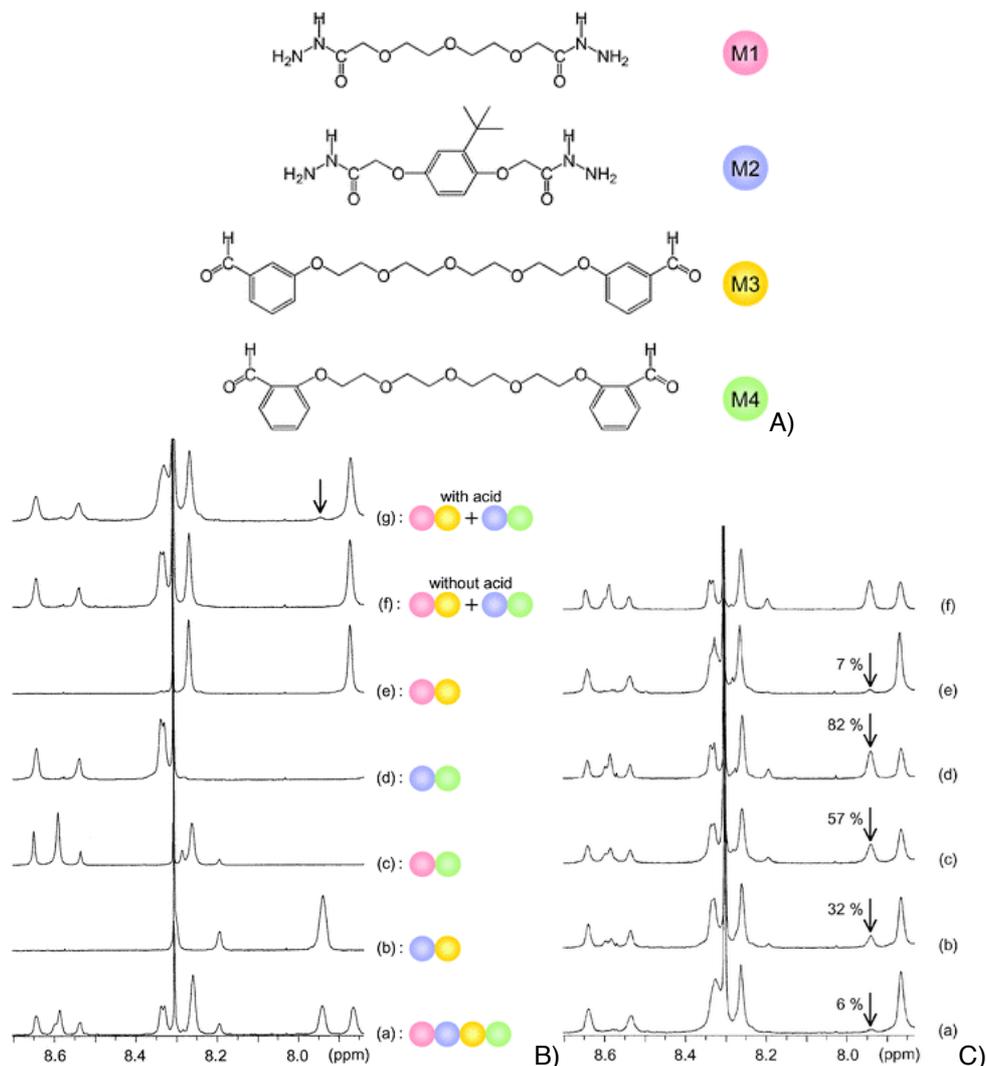


Figure I25: A) Monomères de base M1, M2, M3, M4 B) Suivi de la composition du polymère par RMN du ^1H (CDCl_3): Polymère résultant de la polycondensation de M1, M2, M3, M4, (a) ; M2, M3 (b) ; M1, M4 ;(c) M2, M4 (d); M1, M3 (e); Mélange de polymères M1+M3 et M2+M4 sans acide(f) ; Mélange de polymères M1+M3 et M2+M4 en présence d'une catalyse acide. C) Spectre RMN du ^1H du mélange des polymères M1+M3 et M2+M4 en présence d'une catalyse acide stocké à 23-25°C pendant (b) 3 jours, (c) 10 jours, (d) 30 jours, (e) à -30°C 10 jours, (f) Polymères résultant de la polycondensation de M1, M2, M3, M4.

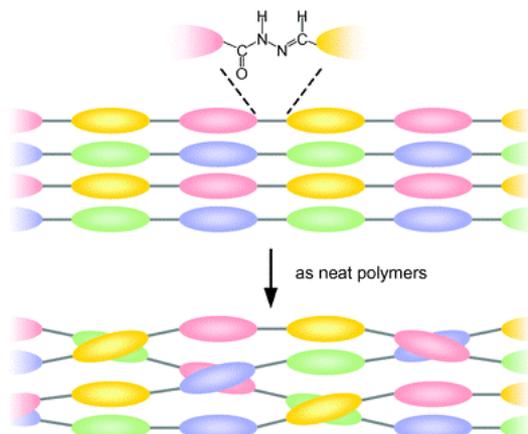


Figure I26: Représentation schématique de la réorganisation constitutionnelle engendrée par réaction d'échange (transhydrazone) à l'état solide.

Il a également été montré que ces échanges à l'état solide ou en solution peuvent être accompagnés d'une modification des propriétés mécaniques des films obtenus par cette méthode de recombinaison dynamique.⁴⁹

Les biopolymères dynamiques

Afin de combiner les propriétés d'adaptation des polymères dynamiques covalents, et les propriétés des polymères biologiques différentes études ont mené à la préparation de polymères dynamiques incorporant des monomères dérivés des briques de base des polymères biologiques comme les protéines et les acides nucléiques.

Dans le cadre de la chimie combinatoire, différents exemples sont basés sur l'utilisation d'acides aminés modifiés de manière à générer dans des conditions données des bibliothèques d'oligomères dynamiques cycliques ou non.^{50a-c} (Figure I27)

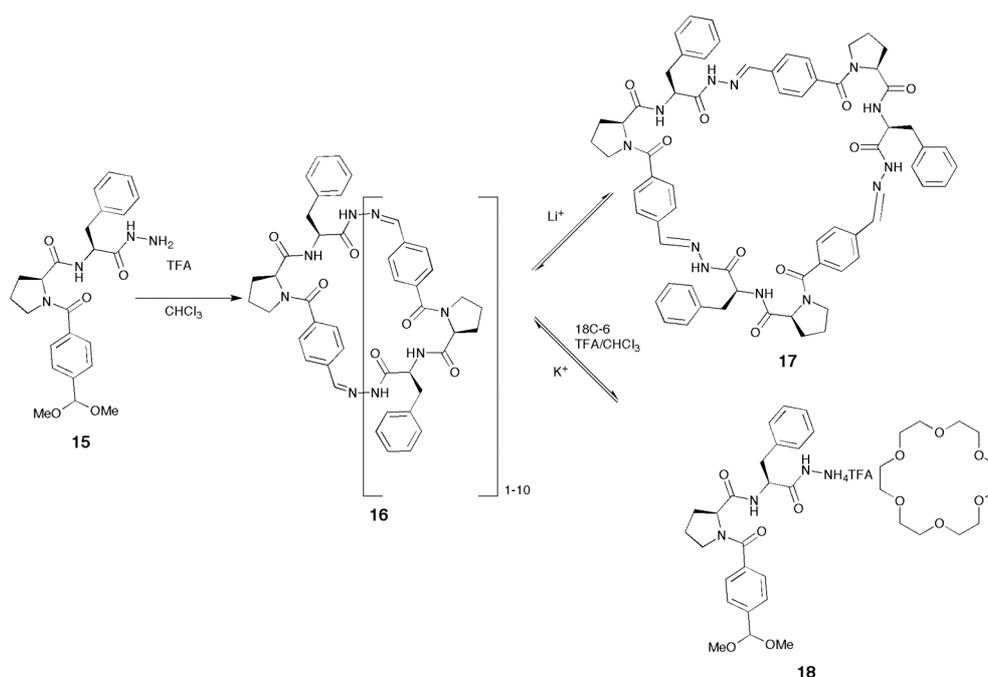


Figure I27: Pseudopeptides dynamiques décrits dans la littérature. En présence d'ion Li⁺ le macrocyle **17** est fortement amplifié. La polycondensation peut également être renversée pour revenir au monomère de départ après ajout d'un éther couronne qui stabilise l'ammonium **18**.

Ces exemples sont soit basés sur l'utilisation de la combinaison aldéhyde-acylhydrazide en solvant organique, soit sur l'exploitation d'une protéase comme la

⁴⁹ Soft-to-hard Transformation of the Mechanical Properties of Dynamic Covalent Polymers through Component Incorporation. T. Ono, S. Fujii, T. Nobori, J.-M. Lehn. *Chem. Commun.* **2007**, 46-48.

⁵⁰ a) Identification and Isolation of a Receptor for *N*-Methyl Alkylammonium Salts: Molecular Amplification in a Pseudo-peptide Dynamic Combinatorial Library. G. R. L. Cousins, R. L. E. Furlan, Y.-F. Ng, J. E. Redman, J. K. M. Sanders. *Angew. Chem.Int. Ed.* **2001**, 40, 423-428. b) Molecular Amplification in a Dynamic Combinatorial Library using Non-covalent Interactions. R. L. E. Furlan, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders. *Chem. Commun.* **2000**, 1761-1762. c) A New Cyclic Pseudopeptide Receptor for Li⁺ from a Dynamic Combinatorial Library. R. L. E. Furlan, Y.-F. Ng, S. Otto, J. K. M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8876-8877.

termolysine.^{51a-b} Cette enzyme catalyse à la fois la réaction d'hydrolyse et la réaction de formation de la liaison peptidique.

Au laboratoire, des monomères "hétéro"bifonctionnalisés (aldéhyde-acylhydrazide) ont été synthétisés dans le but d'obtenir des polyacylhydrazones.⁵²(Figure I28)

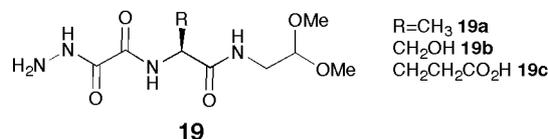


Figure I28: Exemples de monomères aldéhyde/hydrazide synthétisés précédemment au laboratoire.

Ces composés n'ont pas permis de mettre en évidence la formation de polymères, notamment du fait de problèmes de solubilité en solvant aqueux. Seule la formation d'oligomères cycliques a pu être constatée par spectrométrie de masse.

Plus récemment des dérivés d'acides nucléiques ont été préparés au laboratoire afin de les incorporer dans des polymères⁵³ ou des assemblages supramoléculaires.³⁸

Les polymères ainsi obtenus ont montré une augmentation du degré de polymérisation en présence d'espèces polyanioniques comme des polyaspartates, des polyphosphates, ou des brins d'ADN.(Figure I29)

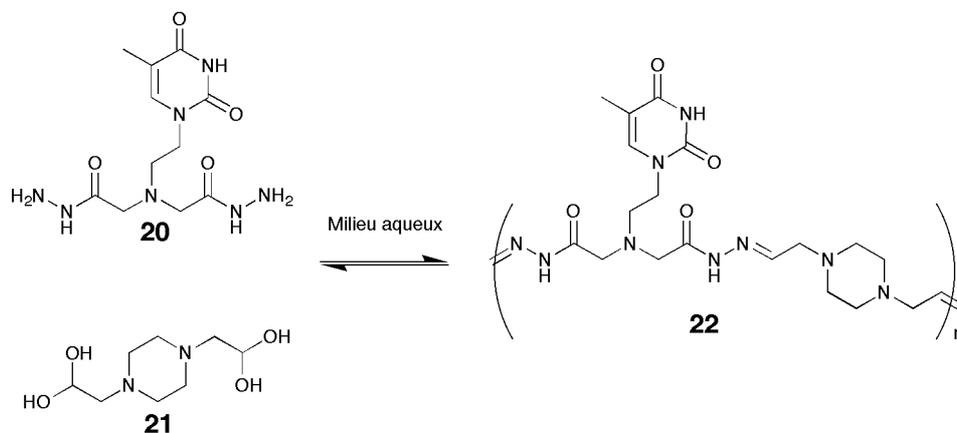


Figure I29: Polymère dynamique **22** incorporant la base pyrimidique thymine. Ce polymère possède une forte densité de charges positives de part la présence de nombreuses amines dans sa chaîne principale, et est de ce fait capable d'interagir avec des polyanions (comme l'ADN) par liaisons électrostatiques.

Après celle des protéines et celle des acides nucléiques, la troisième grande classe des polymères biologiques est celle des polysaccharides.

⁵¹ a) Nonspecific Protease-catalysed Hydrolysis/Synthesis of a Mixture of Peptides: Product Diversity and Ligand Amplification by a Molecular Trap. P. G. Swann, R. A. Casanova, A. Desai, M. M. Frauenhoff, M. Urbanic, U. Slomczynska, A. J. Hopfinger, G. C. Le Breton, D. L. Venton. *Biopolymers* **1996**, 40, 617-625. b) Pseudodynamic Combinatorial Libraries: A new Receptor-Assisted Approach for Drug Discovery. Andrew D. Corbett, Jeremy D. Cheesman, Romas J. Kazlauskas, and James L. Gleason. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2432-2436.

⁵² Sophie Lohmann **2003** Thèse de doctorat ULP Strasbourg.

⁵³ DyNAs: Constitutional Dynamic Nucleic Acid Analogues. N. Sreenivasachary, D. T. Hickman, D. Sarazin, J.-M. Lehn. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8581-8588.

Polysaccharides Naturels et glycobiologie

Constitués d'enchaînements linéaires ou ramifiés d'unités saccharides, connectées par liaison glycosidique, les polysaccharides sont ici divisés en cinq groupes selon leurs fonctions :

1. Les polysaccharides de structure qui confèrent aux cellules, aux organes ou aux organismes une stabilité mécanique.
2. Les polysaccharides fixant l'eau qui empêchent le dessèchement des cellules et des tissus.
3. Les polysaccharides de réserve qui servent au stockage des sucres riches en énergie.
4. Les oligo- et polysaccharides impliqués dans des phénomènes de reconnaissance moléculaire.
5. Les polysaccharides cycliques qui possèdent des propriétés structurales intéressantes et la possibilité de former des complexes avec les molécules organiques.

Les polysaccharides sont produits par une grande variété d'espèces qu'elles soient végétales, animales, bactériennes ou membres de la famille des champignons. Ces biopolymères adoptent une telle diversité de structure et de fonctions qu'il ne serait pas possible d'en faire un catalogue exhaustif. Nous nous contenterons d'en évoquer les exemples les plus significatifs.

Les polysaccharides de structure

La cellulose est un homoglycane formé par l'enchaînement de résidus glucose relié en $\beta(1\rightarrow4)$ **23**. Cette jonction rigide confère au polymère une structure secondaire en feuillet permettant l'établissement de réseaux de liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaire. (Figure I30) Ces liaisons hydrogènes combinées avec des forces de Van der Waals entraînent une cristallisation des chaînes de polymères pour former des fibres tridimensionnelles.⁵⁴ Du fait de cette cristallinité, la cellulose est extrêmement résistante et insoluble dans l'eau malgré le caractère hydrophile des monomères qui la compose. Les molécules de cellulose peuvent contenir plus de 10 000 résidus glucose et atteindre un poids moléculaire de 200 000 Daltons pour une longueur de 6 à 8 μm . Il s'agit du constituant majeur de la paroi des cellules végétales et de la substance organique la plus abondante sur

⁵⁴ a) Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I_{β} from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. Y. Nishiyama, P. Langan, H. Chanzy. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9074-9082. b) Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I_{α} from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. Y. Nishiyama, J. Sugiyama, H. Chanzy, P. Langan. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14300-14306.

terre. Le coton est constitué de fibres de cellulose pratiquement pure. Associée à d'autres polymère comme la lignine et l'hémicellulose, la cellulose forme le bois.(Figure I31)

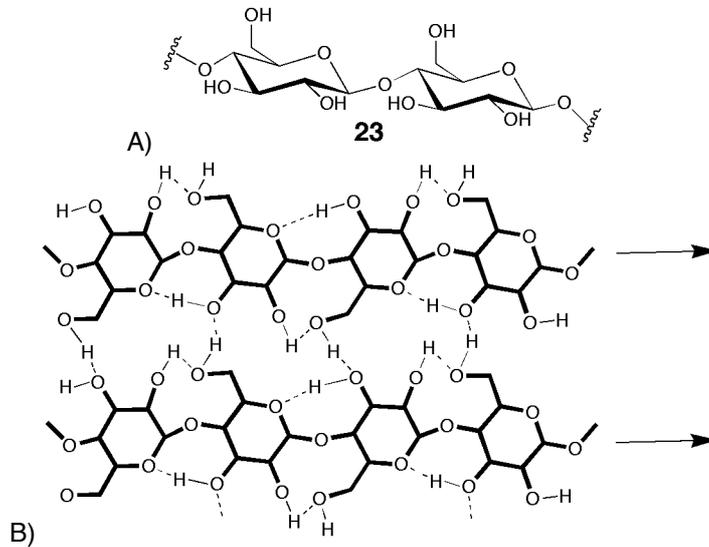


Figure I30: A) Structure moléculaire du motif monomérique de la cellulose et B) Réseaux de liaison hydrogènes entraînant la cristallisation des chaînes pour former la cellulose de type I β . C) Représentation schématique de ce réseau de liaison H obtenu par diffraction des rayons X et des neutrons.⁵⁴

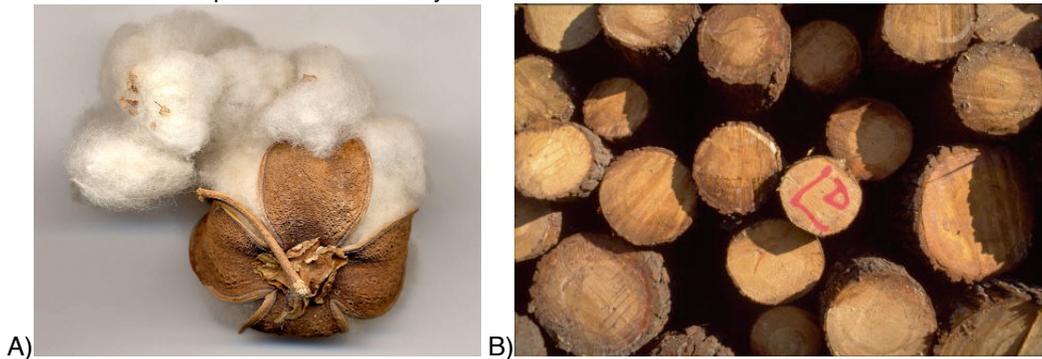


Figure I31: A) Fibres de cotons formés de cellulose pure. B) Associée à la lignine et l'hémicellulose, la cellulose forme le bois.

La chitine est un homopolymère de N-acétylglucosamines reliées en $\beta(1\rightarrow4)$ 24.(Figure I32) Ses propriétés sont similaires à celles de la cellulose. Elle constitue la trame des carapaces des insectes et des crustacés.(Figure I33) On la retrouve également dans la paroi des champignons.

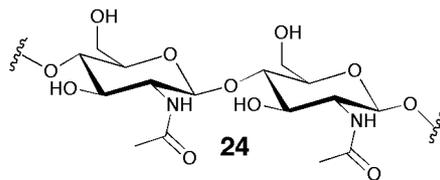


Figure I32: Structure moléculaire du motif monomérique de la chitine.



Figure I33: La chitine est le constituant principal de l'exosquelette A) des insectes et B) des crustacés.

Les pectines sont composées d'enchaînement de résidus acide galactopyranosique liés en $\alpha(1\rightarrow4)$ **25**. (Figure I34 A) La proportion de conversion des fonctions acides en esters et des fonctions alcools en groupement acétyle est variable. La pectine est le polysaccharide responsable de la texture des fruits par exemple. (Figure I34 B) Quand les fruits vieillissent la pectine est dégradée en constituants de base et n'assure plus son rôle de maintien. Les fruits ramollissent.

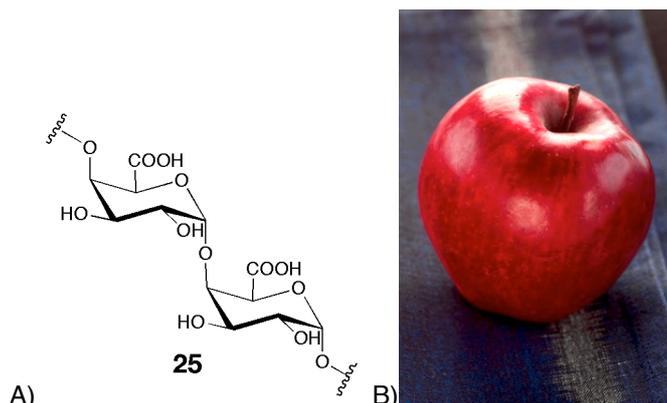


Figure I34: A) Structure moléculaire du motif monomérique des pectines. B) La pectine assure la consistance et la forme des fruits.

Les polysaccharides fixant l'eau

Les dextranes sont des polysaccharides formés par des résidus glucose liés en $\alpha(1\rightarrow6)$ **26**. (Figure I35) Le degré et l'emplacement des ramifications déterminent la structure tridimensionnelle de ces polymères. Ils sont synthétisés par des bactéries du type *Leuconostoc* et *Streptococcus* et sont utilisés en microchirurgie comme anticoagulant. Les dextranes sont disponibles commercialement dans une large gamme de poids moléculaires allant de 10 000 à 150 000 Daltons. En présence d'eau, les dextranes forment des mucilages visqueux ou des gels qui après réticulation chimique sont utilisés pour la séparation des macromolécules (gels *Sephadex*).

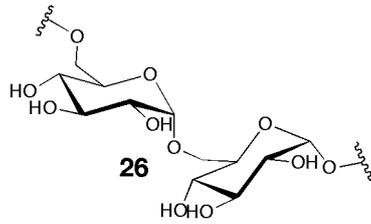


Figure I35: Structure moléculaire du motif monomérique des dextrans.

L'agarose 27 et la carrageenine sont extraits des algues et peuvent également être utilisés pour former des gels (l'agar agar est utilisé pour préparer les gels d'agarose pour la séparation de macromolécules en biologie moléculaire en particulier).(Figure I36)

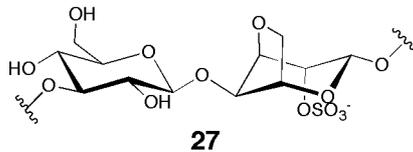


Figure I36: Structure moléculaire du motif monomérique de l'agarose.

L'acide hyaluronique 28 est un composant important de la matrice extracellulaire.(Figure I38) Il fait partie de la famille des glycosaminoglycanes dont l'élément de base est un sucre aminé ainsi que l'acide glucuronique ou l'acide iduronique. On trouve ces glycosaminoglycanes sous forme libre ou comme composant des proteoglycanes partout dans les organismes. L'acide hyaluronique se compose d'unités disaccharides dans lesquelles la N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique sont enchaînés alternativement en β -(1 \rightarrow 4) et β -(1 \rightarrow 3). (Figure I37) En raison de la conformation de cette liaison β -(1 \rightarrow 3), les molécules d'acide hyaluronique, qui peuvent contenir quelques milliers de résidus monosaccharides, sont enroulés en hélice. Les groupements carboxyliques des résidus glucuroniques, dirigés vers l'extérieur, ont la possibilité de fixer des ions calcium. La forte hydratation de ces groupes permet à l'acide hyaluronique et à d'autres glycosaminoglycanes de former des gels et de fixer jusqu'à 10 000 fois leur propre volume d'eau (l'humeur vitrée de l'œil contient environ 1% d'acide hyaluronique et 98% d'eau).

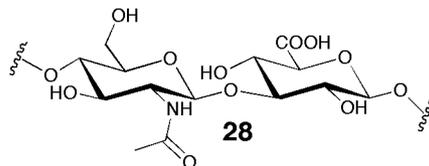


Figure I37:Structure moléculaire du motif monomérique de l'acide hyaluronique.

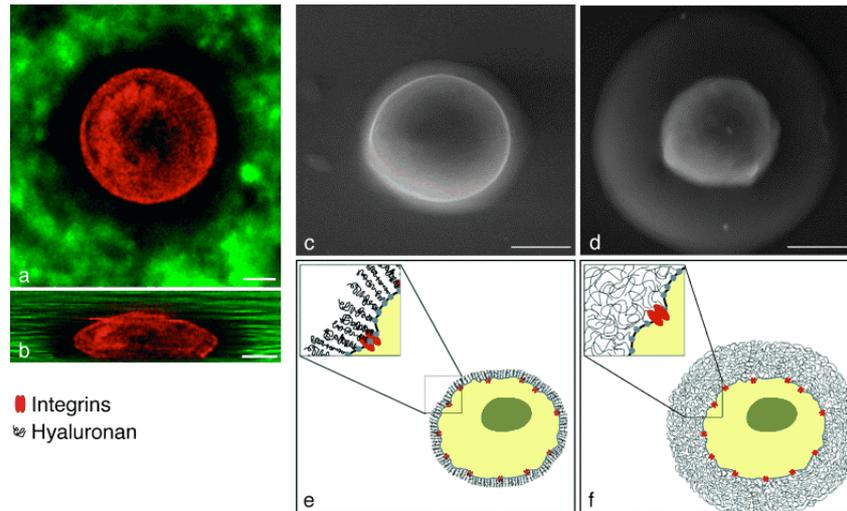


Figure I37: L'acide hyaluronique **28** forme une couche de gel autour de certaines cellules.⁵⁵ a) et b) Microscopie de fluorescence mettant en évidence une zone d'exclusion (en noir) de 5 μm autour d'une cellule de type chondrocyte (en rouge) dans laquelle des particules de silice fluorescentes (en vert) ne pénètrent pas. c) et d) Image de microscopie électronique environnementale de la couche d'acide hyaluronique. Autour d'une cellule épithéliale (c) cette couche a une épaisseur de $2.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$. Autour d'une cellule du cartilage (chondrocyte) (d) cette couche a une épaisseur de $4.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$. e) Représentation schématique des chaînes d'acide hyaluronique en brosse à la surface d'une cellule épithéliale. f) Représentation schématique de la couche d'acide hyaluronique à la surface d'un chondrocyte.

Les polysaccharides de réserve

En raison de leur nature polymérique, les sucres de réserve exercent une pression osmotique plus faible et peuvent être stockés en plus grande quantité que leurs constituants de base comme le glucose.

L'amidon 29 produit par les plantes est une combinaison de deux polysaccharides appelés amylopectine et α -amylose. L'amylopectine est un polymère ramifié, pratiquement insoluble dans l'eau, dont la chaîne principale, constituée de résidus glucose liés en α -(1 \rightarrow 4), porte des embranchements du type α -(1 \rightarrow 6) tous les 24-30 résidus. Les molécules d'amylopectine peuvent contenir des centaines de milliers de résidus glucose et leur masse peut donc atteindre jusqu'à 10^8 Daltons. L' α -amylose est composée de chaînes non ramifiées de 200 à 300 résidus glucose liés en α -(1 \rightarrow 4). En raison de la configuration α sur le carbone anomérique, de telles chaînes forment une hélice avec 6 à 8 résidus par tour. (Figure I39) Cette hélice, dont le cœur est hydrophobe, est capable de former des complexes avec différentes substances comme l'iode (réaction iodoamyloïde: les atomes d'iode se déposent à l'intérieur des hélices d'amidon et prennent dans cet environnement hydrophobe une couleur bleue intense).

⁵⁵ Spatial and Temporal Sequence of Events in Cell Adhesion: From Molecular Recognition to Focal Adhesion Assembly. M. Cohen, D. Josester, B. Geiger, L. Addadi. *ChemBioChem* **2004**, 5, 1393-1399.

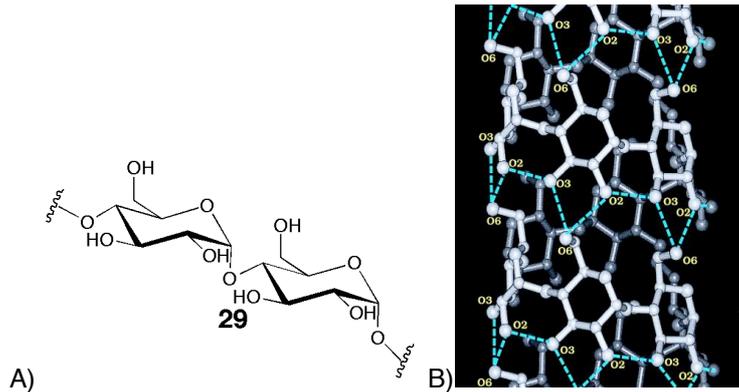


Figure I39: **A)** Structure moléculaire de l'amylose. **B)** Modèle de la structure en hélice des chaînes d'amylose obtenue par diffraction des rayons X⁵⁶. Cette conformation est stabilisée par un réseau de liaison hydrogènes.

Le glycogène est l'équivalent de l'amidon chez les animaux. Il est présent dans toutes les cellules mais en plus grande proportion dans les cellules des muscles squelettiques et dans le foie où il joue son rôle de réserve énergétique sous la forme de granules cytoplasmiques. Sa structure est semblable à celle de l'amylopectine à la différence que les embranchements sont plus nombreux et répétés tous des 8 à 12 résidus glucose le long de la chaîne principale en α -(1→4).

Les oligo- et polysaccharides comme molécules de reconnaissance: "The sugar code"

Pour décrire avec précision une jonction glycosidique, il n'y a pas un (la séquence) mais trois paramètres indépendants qui sont nécessaires: a) la séquence des monomères, b) la localisation des jonctions, et c) la configuration du carbone anomérique. En ce sens ils se différencient des polypeptides et des acides nucléiques pour lesquels le nombre de fonctions chimiquement équivalentes pour l'élongation de la chaîne sont limités. (Schéma I4)

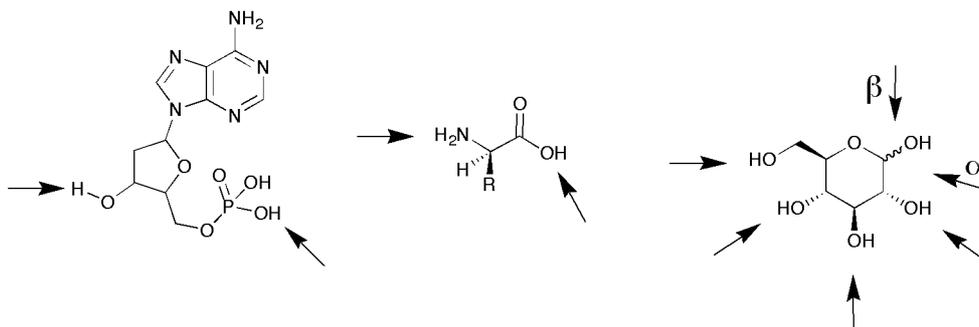


Schéma I4: Illustration du nombre et du type de points de jonctions possibles sur le glucose. Alors que sur un nucléotide (à gauche) ou un acide aminé (au centre) l'élongation de la chaîne ne peut se faire que de manière linéaire, sur un monosaccharide (à droite) l'addition d'un monomère supplémentaire peut se faire sur les fonctions hydroxyles en positions C2, C3, C4, et C6, et sur les deux positions anomériques en C1.

⁵⁶ V-Amylose at Atomic Resolution: X-ray Structure of a Cycloamylose with 26 Glucose Residues (cyclomaltohexacosaoose). K. Gessler, I. Uson, T. Takaha, N. Krauss, S. M. Smith, S. Okada, G. M. Sheldrich, W. Saenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 4246-4251.

Ainsi il est courant de rencontrer des structures de type branchées pour les polysaccharides alors que ce n'est pas le cas pour les protéines et l'ADN ou l'ARN. Si on estime que le nombre de monomères accessibles pour la synthèse des polysaccharides est de 20 saccharides (de type pyranose) différents, il en résulte que le nombre théorique d'hexamères possibles et de $1.44 \cdot 10^{15}$ hexasaccharides.⁵⁷ Ce nombre est à comparer avec les $6,4 \cdot 10^7$ (20^6) hexapeptides constructibles à partir des 20 acides aminés les plus communs, et aux 4096 (4^6) hexanucléotides issus de la combinaison de 4 nucléotides. Ces calculs ne font qu'approcher la diversité potentielle de ces molécules étant donné qu'ils ne prennent pas en compte l'introduction de substituants comme des groupes sulfates ou phosphates sur les fonctions alcools des sucres.

Étant donné que des molécules réceptrices sont capables de différencier ces différentes combinaisons, alors on peut considérer que les oligo-et polysaccharides sont des vecteurs d'information extrêmement efficaces et complexes. Emil Fischer l'avait bien compris, et c'est en se basant sur de la stéréospécificité de l'action de l'émulsine et l'invertine sur le gentobiose et l'amygdaline (deux disaccharides) qu'il a bâti son principe de "clef et serrure" ("Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie **Schloss und Schlüssel** zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung auf einander ausüben zu können"⁵⁸).

Sous forme libre ou conjugué à d'autres biomolécules (lipides, protéines) les saccharides sont impliqués dans un grand nombre de phénomènes biologiques. Les glycoprotéines ou glycolipides sont par exemple exprimés à la surface des cellules à la manière d'antennes capables d'interagir avec les cellules et macromolécules environnantes.

Les molécules capables de lier et reconnaître ces oligosaccharides sont des protéines appelées lectines. Les lectines assurent la traduction de l'information biologique contenue dans la structure tridimensionnelle des oligosaccharides en phénomènes d'adhésion, de prolifération ou de migration cellulaire par exemple. Ces interactions lectines-oligosaccharides orchestrent de nombreux phénomènes biologiques comme la réponse immunitaire,⁵⁹ le développement,⁶⁰ ou le cancer.⁶¹

⁵⁷ Chemical Biology of the Sugar Code. H. J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger. *ChemBioChem* **2004**, 5, 760-764.

⁵⁸ "Pour utiliser une image, je dirais que l'enzyme et le glycoside doivent pouvoir s'emboîter à la manière d'une clef dans une serrure pour qu'une transformation chimique puisse avoir lieu entre eux" E. Fischer. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.

⁵⁹ Glycosylation and the Immune System. P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek. *Science* **2001**, 291, 2370-2376.

⁶⁰ Introduction to Galectins. H. Leffler, S. Carlson, M. Hedlung, Y. Qian, F. Poirier. *Glycoconjugate J.* **2004**, 19, 433-440.

⁶¹ Glycans in Cancer and Inflammation-Potential for Therapeutics and Diagnostics. D. H. Dube, C. R. Bertozzi. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 477-488.

Pour illustrer l'importance de ces processus de reconnaissance, voici l'exemple du plus important système de groupes tissulaires, le système ABO, qui est le déterminant principal des groupes sanguins. (Schéma I5) Découvert en 1901 par Karl Landsteiner, ce système est fondé sur l'existence d'anticorps naturels dirigés contre les antigènes A ou B à la surface des érythrocytes. Tous les anticorps produits par l'individu sont dirigés contre les antigènes non exprimés par ses propres érythrocytes. Ces antigènes sont associés aux gènes A, B, et O qui codent pour diverses glycosyltransférases chargées de dérivatiser l'antigène H. Selon l'enzyme exprimée, un groupement N-acétyl-galactosamine (groupe A), un groupement galactose (groupe B), ou aucun groupement (groupe O) sera introduit sur l'antigène H. Cet oligosaccharide est ancré dans la membrane des érythrocytes sous la forme d'un glycolipide. Le groupe sanguin d'un individu est donc déterminé, ou plutôt codé, par la structure de certains groupements oligosaccharides présent à la surface de ses érythrocytes.

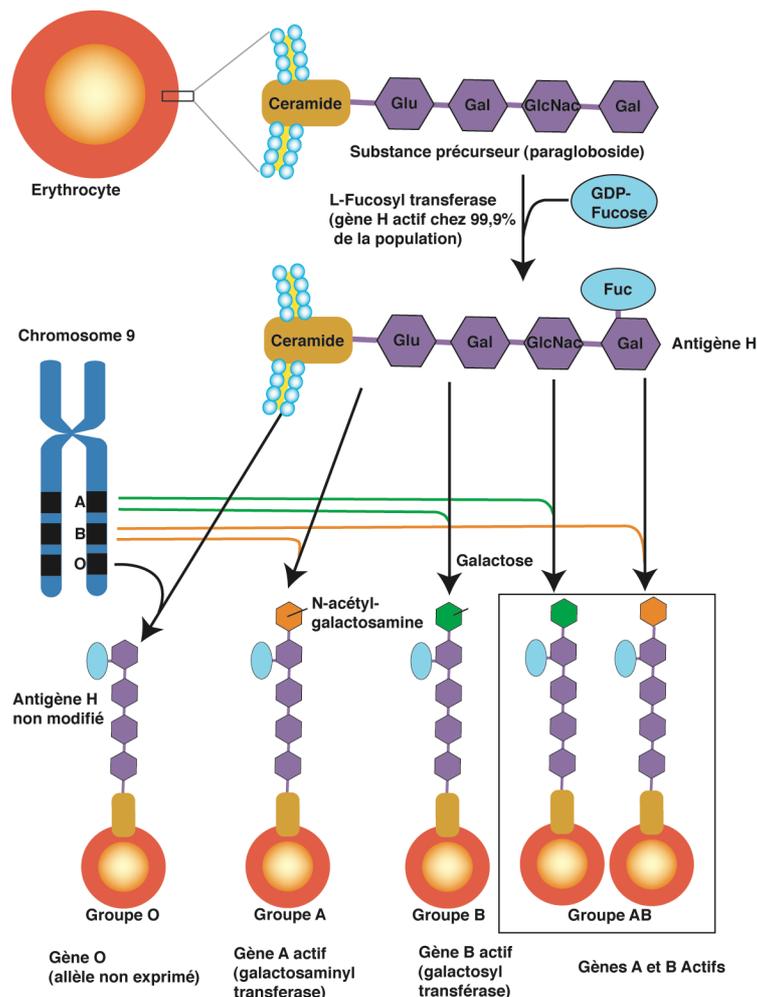


Schéma I5: Le système des groupes sanguins ABO est basé sur le polymorphisme des antigènes présents à la surface des érythrocytes. La structure de ces oligosaccharides dépend du génotype de l'individu et de l'expression de glycosyltransférases chargées de leurs synthèses.

Les polysaccharides cycliques

Les cyclodextrines comme leur nom l'indique sont des oligosaccharides cycliques dérivés de l'amidon après traitement par une combinaison d'enzymes amylolytiques produites par des bactéries *Bacillus macerans*, des cyclodextrines glucotransférases (CGTases) et d'autres bactéries. Le mélange d'oligomères cycliques ainsi obtenu est ensuite purifié par des séparations chromatographiques ou des cristallisations fractionnées.

Les 3 tailles de cycle les plus communément rencontrées sont des macrocycles à 6 (l' α -cyclodextrine **30**), 7 (la β -cyclodextrine **31**), et 8 (la γ -cyclodextrine **32**) résidus. (Figure I40) Ces molécules adoptent la forme d'un récepteur conique avec une cavité intérieure hydrophobe et une surface extérieure hydrophile. (schéma I6) Cette caractéristique permet à ces molécules amphiphiles d'accueillir de nombreuses substances hydrophobes⁶² et ainsi d'augmenter leur solubilité dans l'eau, ce qui a de nombreuses applications industrielles⁶³ et pharmaceutiques.⁶⁴

Cette architecture basée sur une poche hydrophobe entourée par des fonctions hydrophiles facilement dérivatisables par d'autres fonctions fait des cyclodextrines des modèles d'enzymes.⁶⁵

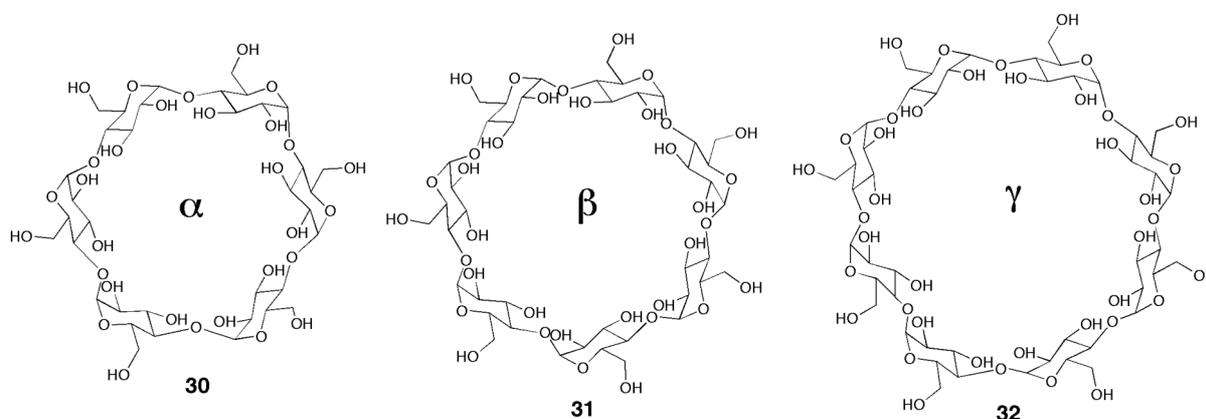


Figure I40: Les 3 cyclodextrines les plus connues: l' α -cyclodextrine (cyclomaltohexaose), la β -cyclodextrine (cyclomaltoheptaose), et la γ -cyclodextrine (cyclomaltooctaose).

⁶² Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. M. V. Rekharsky, Y. Inoue. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1917.

⁶³ Industrial Applications of Cyclodextrins. A. R. Hedges. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2035-2044.

⁶⁴ Cyclodextrin Drug Carrier Systems. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2045-2076.

⁶⁵ Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives. R. Breslow, S. D. Dong. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997-2011.

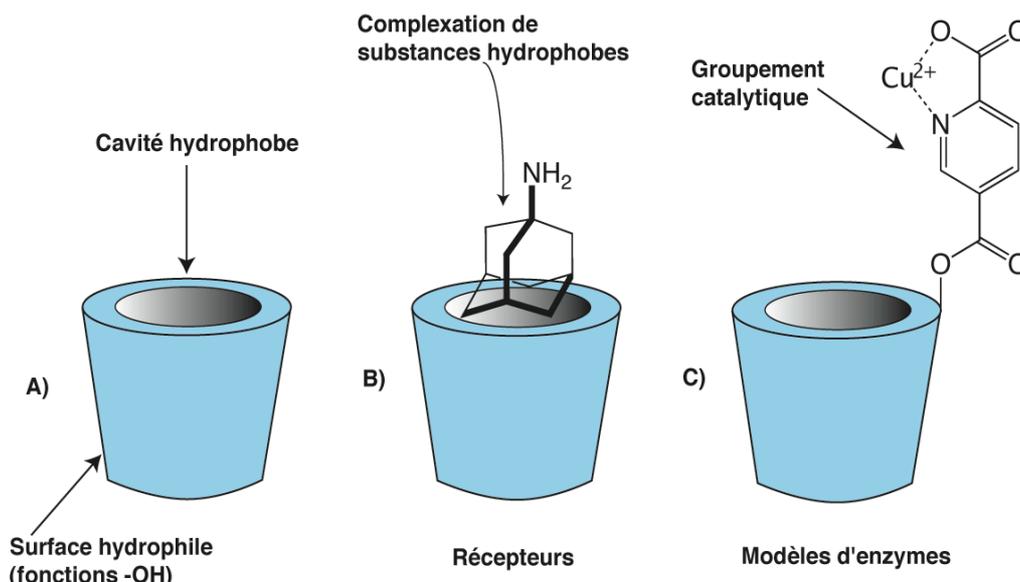


Schéma 16: A) Représentation schématique de la forme conique des récepteurs cyclodextrines. B) Schématisation de l'utilisation des cyclodextrines comme des récepteurs de molécules hydrophobes. C) Schématisation de l'utilisation des cyclodextrines comme modèles d'enzyme.

Des cyclodextrines comprenant un plus grand nombre d'unités sucres ont été isolées et caractérisées.⁶⁶ Ces composés macrocycliques possèdent des structures étonnantes comme par exemples la cyclomaltohexaosaose (cyclodextrine à 26 résidus glucoses) dont la structure a été résolue par diffraction des rayons X.⁵⁶ (Figure I41) Cette structure a permis d'établir un modèle de la conformation en l'hélice de l'amylose à l'échelle atomique.

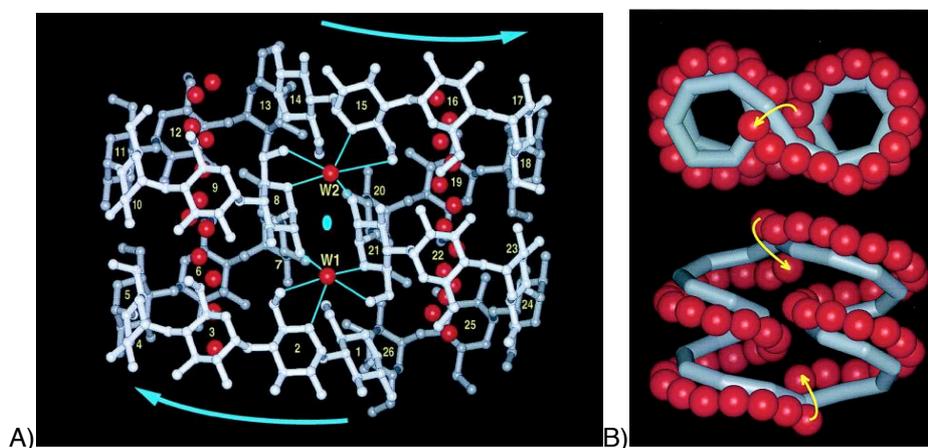


Figure I41: A) Structure tridimensionnelle de la cyclomaltohexaosaose (26 résidus glucoses): Cette cyclodextrine adopte une conformation particulière composée de deux hélices antiparallèles adjacentes; des molécules d'eau (en rouge) occupent les cavités des deux hélices. B) Représentation schématique de cette structure où seuls les atomes d'oxygène O(2) et O(3) sont représentés.

Nous venons de voir que les polysaccharides sont d'une immense diversité structurale du fait des unités monomériques saccharides qui les composent et des nombreuses variétés de connections possibles entre elles. Même une infime variation de

⁶⁶ Structures of the Common Cyclodextrins and their Larger Analogues-Beyond the Doughnut. W. Seanger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, T. Takaha. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1787-1802.

structure procure des propriétés radicalement différentes aux polymères comme c'est le cas si on compare la cellulose et l'amidon qui ne diffèrent pourtant que par la configuration d'une seule liaison dans le motif monomérique.

Ces macromolécules sont intéressantes d'une part pour leurs propriétés de biocompatibilité et de biorecognition, mais également en tant que matériaux. Du point de vue structural les polysaccharides sont capables d'adopter une structure secondaire bien définie (en hélice pour l'amidon et le schizophyllane⁶⁷, en feuillet pour la cellulose,...) ce qui en fait des objets d'étude et d'inspiration fascinants pour les chimistes toujours à la recherche d'architectures plus complexes et d'outils pour les élaborer.

Polymères analogues de polysaccharides

Les nombreuses utilisations de la cellulose comme matériaux (coton, bois, ...) ainsi que son caractère biodégradable ont motivé des recherches variées que ce soit dans le but de modifier cette matière première ou bien dans le but de contrôler ses propriétés par des synthèses non naturelles notamment par voie chimique.^{68a-b} Les applications de la cellulose et de ses dérivés touchent des domaines très variés comme l'immobilisation de protéines, d'anticorps, d'héparine, la séparation d'énantiomères, ou la formation de matériaux composites avec d'autres polymères naturels ou synthétiques.^{68a} Des analogues synthétiques de cellulose ont également été préparés.⁶⁹(Figure I42)

D'autres types de polymères analogues de polysaccharides naturels ont été préparés dans des optiques différentes. Ainsi des enchaînements linéaires d'unités sucre, peuvent avoir des applications dans le domaine des matériaux biocompatibles et biodégradables.⁷⁰(Figure I43)

⁶⁷ Polysaccharide-Polynucleotide Complexes. 2. Complementary Polynucleotide Mimic Behavior of the Natural Polysaccharide Schizophyllan in the Macromolecular Complex with Single-Stranded RNA and DNA. K. Sakurai, M. Mizu, S. Shinkai. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 641-650.

⁶⁸ a) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3358-3393. b) Challenge of Synthetic Cellulose. S. Kobayashi. *J. Pol. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 693-710.

⁶⁹ Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 21) Towards New Cellulose I Mimics : Synthesis of Dialkynyl C-glucosides of *peri*-Substituted Anthraquinone. K.V.S.N. Murty, A. Vasella. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, 84, 939-962. Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 15) Oligomers of Cellobiose-Derived Dialkynes and First Crystal Structure of an Anomeric Pair of Trichloroacetimidates. A. Ernst, W. B. Schweizer, A. Vasella. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, 81, 2157-2189.

⁷⁰ a) Sugar-containing Polyamines Prepared Using Galactose Oxidase Coupled with Chemical Reduction. Xiao-Chaun Liu, Jonathan S. Dordick. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 466-467. b) In Situ Preparation of β -D-1-O-Hydroxylamino Carbohydrate Polymers Mediated by Galactose Oxidase. P. R. Andreana, W. Xie, H. N. Cheng, L. Qiao, D. J. Murphy, Q.-M. Gu, P. G. Wang. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1863-1866.

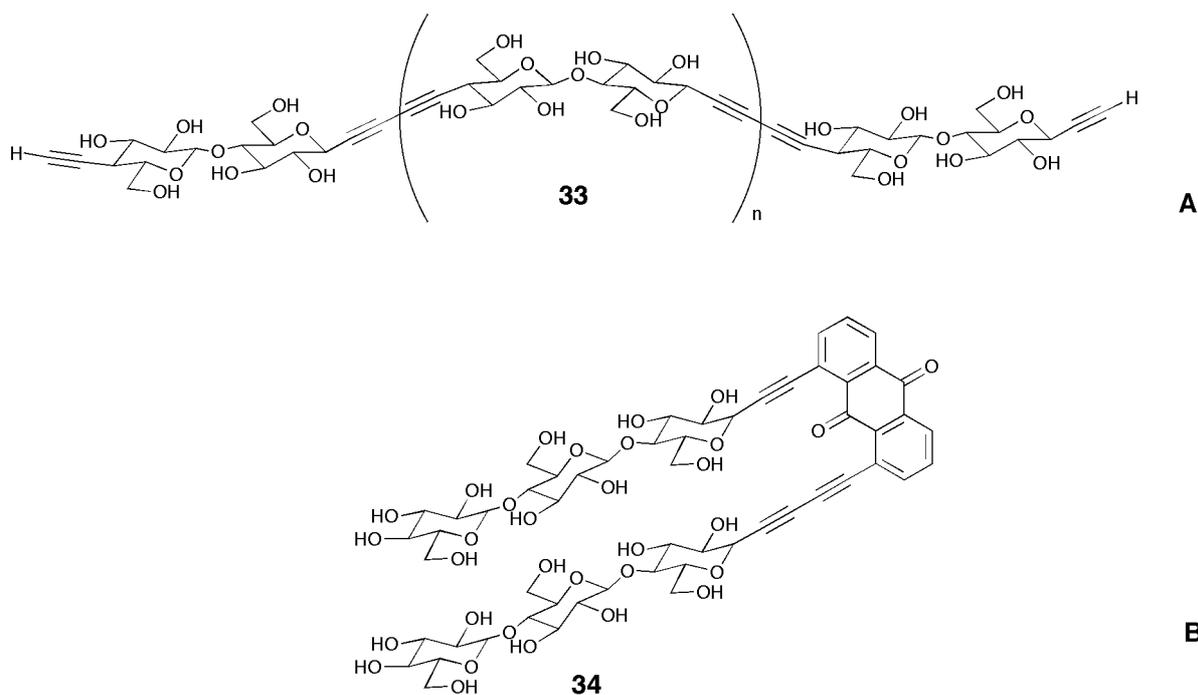


Figure I42: **A** Oligomères de cellobiose **33** préparés par couplage d'acétylènes. Les études RMN n'ont pas montré d'association intermoléculaire par liaison hydrogène entre ces oligomères. **B** Modèle de cellulose I_β **34**. L'absence de liaison hydrogène entre les deux chaînes oligosaccharides montre que des oligomères de ce type constituerait un bon analogue de cellulose I_β.

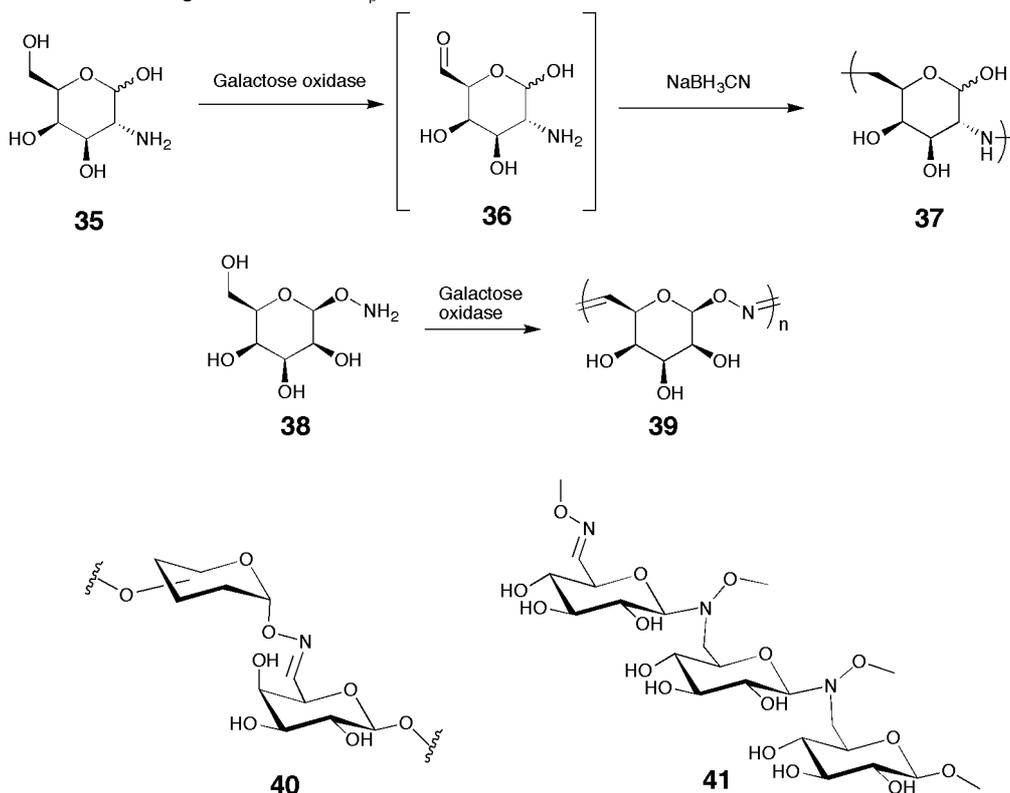


Figure I43: **A**) Polysaccharide **37** synthétisé par amination réductrice. Ce polymère n'a aucun caractère dynamique du point de vue constitutionnel. **B**) Poly-oxime **38** préparé par oxydation in situ par une galactose oxydase. Ce polymère est décrit comme stable vis-à-vis de l'hydrolyse et aucune étude de réversibilité ou d'échange n'a été mentionnée. **C**) Analogues de la drosocine **40** préparés par dérivatisation chimosélective d'une unité saccharide.⁷¹ **D**) Oligosaccharide linéaire **41** de type $\beta(1 \rightarrow 6)\text{N}(\text{OMe})$.⁷²

⁷¹ A strategy for the chemoselective synthesis of *O*-linked glycopeptides with native sugar-peptide linkages. E. C. Rodrigues, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9905-9906.

Plus récemment des polymères linéaires d'unités de type sucres ont été synthétisés par des réactions de polycondensation (figure I43).⁷³ Ces polymères résultent soit de l'amination réductrice d'un aldéhyde généré par réaction enzymatique ^{70a}, soit par la transformation de cet aldéhyde en oxime^{70b, 71}. Le polyoxime **39** ainsi formé est stable vis-à-vis de l'hydrolyse.

D'autres approches utilisant la formation d'hémiaminal à partir de sucres réducteurs ont permis la synthèse d'analogues linéaires d'oligosaccharides⁷², de colchicine⁷⁴ et de glycopeptides.⁷⁵

Encore une fois, les propriétés dynamiques de ces polymères sont soit inexistantes, soit non exploitées.

Tout comme les polyacylhydrazones classiques, les polyacylhydrazones à base de dérivés de saccharides sont connus depuis des décennies.⁷⁶ La formation, en principe réversible, d'acétals a été également exploitée pour la préparation de polymères linéaires en milieu organique.⁷⁷(Figure I44) Seulement leur caractère dynamique n'a ni été mis en évidence ni utilisé.

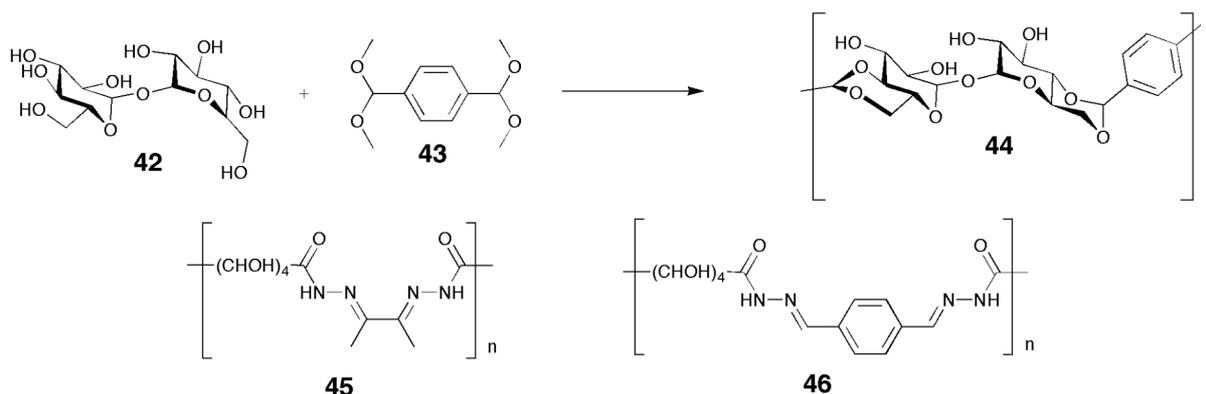


Figure I44: Exemples de polymères à base de sucres décrits dans la littérature préparés soit par formation d'acétal **44**, soit par polycondensation d'acylhydrazones **45**, et **46**. Ces deux derniers polymères sont peu solubles. Des films transparents et flexibles ont été obtenus. Les polymères incorporant la 2,3-butanedione ont donné les meilleurs résultats.

⁷² Solution and solid-phase chemoselective synthesis of (1→6)-amino(methoxy) di- and trisaccharide analogues. F. Peri, A. Deutman, B. La Ferla, F. Nicotra. *Chem. Commun.* **2002**, 1504-1505.

⁷³ Chemoselective ligation in glycochemistry. F. Peri, F. Nicotra. *Chem. Commun.* **2004**, 623-627.

⁷⁴ Colchicine Glycorandomization Influences Cytotoxicity and Mechanism of Action. A. Ahmed, N. R. Peters, M. K. Fitzgerald, J. A. Watson, F. M. Hoffmann, J. S. Thorson. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14224-14225.

⁷⁵ Chemo- and Stereoselective Glycosylation of Hydroxylamino Derivatives: A Versatile Approach to Glycoconjugates. F. Peri, P. Dumy, M. Mutter. *Tetrahedron* **1998**, 54, 12269-12278.

⁷⁶ Polymers from Carbohydrate-based Monomers, 1 Poly(acylhydrazone)s from d-Glucarodihydrazone and Related Compounds. George A. F. Roberts, Iwan M. Thomas. *Makromol. Chem.* **1981**, 182, 2611-2617.

⁷⁷ A Facile Synthesis of a Novel Polyacetal containing Trehalose Residue in the Main Chain. N. Teramoto, Y. Arai, Y. Shibasaki, M. Shibata. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 56, 1-6.

La réaction de formation d'acylhydrazone a été utilisée notamment pour la création de réseaux de polysaccharides fonctionnalisés soit par des aldéhydes⁷⁸ (polymère **47**) soit par des hydrazides⁷⁹ (polymère **48**). La réaction de formation d'acétals a également été utilisée à cet effet.⁸⁰(Figure I45) Ces composés sont intéressants de par la formation de gels, et par leur dégradabilité, appliquée au relargage contrôlé de substances actives.⁸¹ Leur structure moléculaire n'est pas clairement définie ce qui compliquerait l'analyse de leur dynamique constitutionnelle.

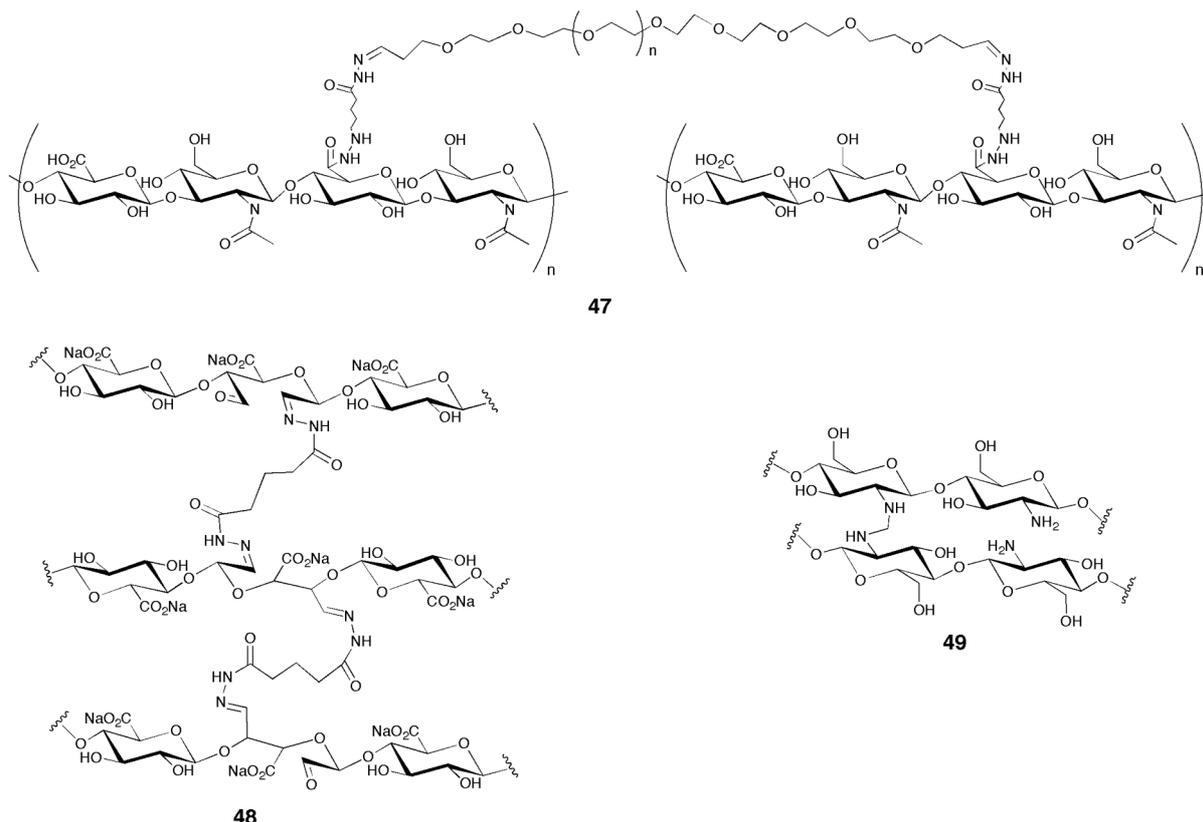


Figure I45: Hydrogels biocompatibles générés par la ramification et l'interconnexion par liaison acylhydrazone de polysaccharides naturels. Le polymère **47** dérivé de l'acide hyaluronique forme des films d'hydrogels utilisés dans la cicatrisation de plaies (essais animaux). Le polymère **48** dérivé du polyglucuronate forme des hydrogels biocompatibles dégradables. Le polymère **49** obtenu par réticulation du chitosane par le formaldéhyde forme des hydrogels.

⁷⁸ Degradation Behavior of Covalently Cross-Linked Poly(aldehyde glucuronate) Hydrogels. K. Y. Lee, K. H. Bouhadir, D. J. Mooney. *Macromolecules* **2000**, 33, 97-101.

⁷⁹ Glycosaminoglycan Hydrogel Films as a Bio-interactive Dressings for Wound Healing. K. R. Kirker, Y. Luo, J. H. Nielson, J. Shelby, G. D. Prestwich. *Biomaterials* **2002**, 23, 3661-3671.

⁸⁰ External Stimuli Response on a Novel Chitosan Hydrogel Crosslinked with Formaldehyde. A. Singh, S. S. Narvi, P. K. Dutta and N. D. Pandey. *Bull. Mater. Sci.* **2006**, 29, 233-238.

⁸¹ A Hyaluronic Acid-Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells. Y. Luo, M. R. Ziebel, and G. D. Prestwich. *Biomacromolecules* **2000**, 1, 208-218.

Le concept de "click chemistry"⁸² a été appliqué à la préparation d'analogues de polysaccharides en mettant à profit la cycloaddition d'azides sur des alcynes terminaux. (Figure I46) Cependant en regardant les rendements de réactions de plus près on se rend compte que l'efficacité de cette réaction n'est pas aussi générale qu'initialement proposée. Dans certains exemples⁸³ les rendements sont de l'ordre de 59 à 38%, ce qui n'en fait pas une réaction supérieure à une glycosylation classique.

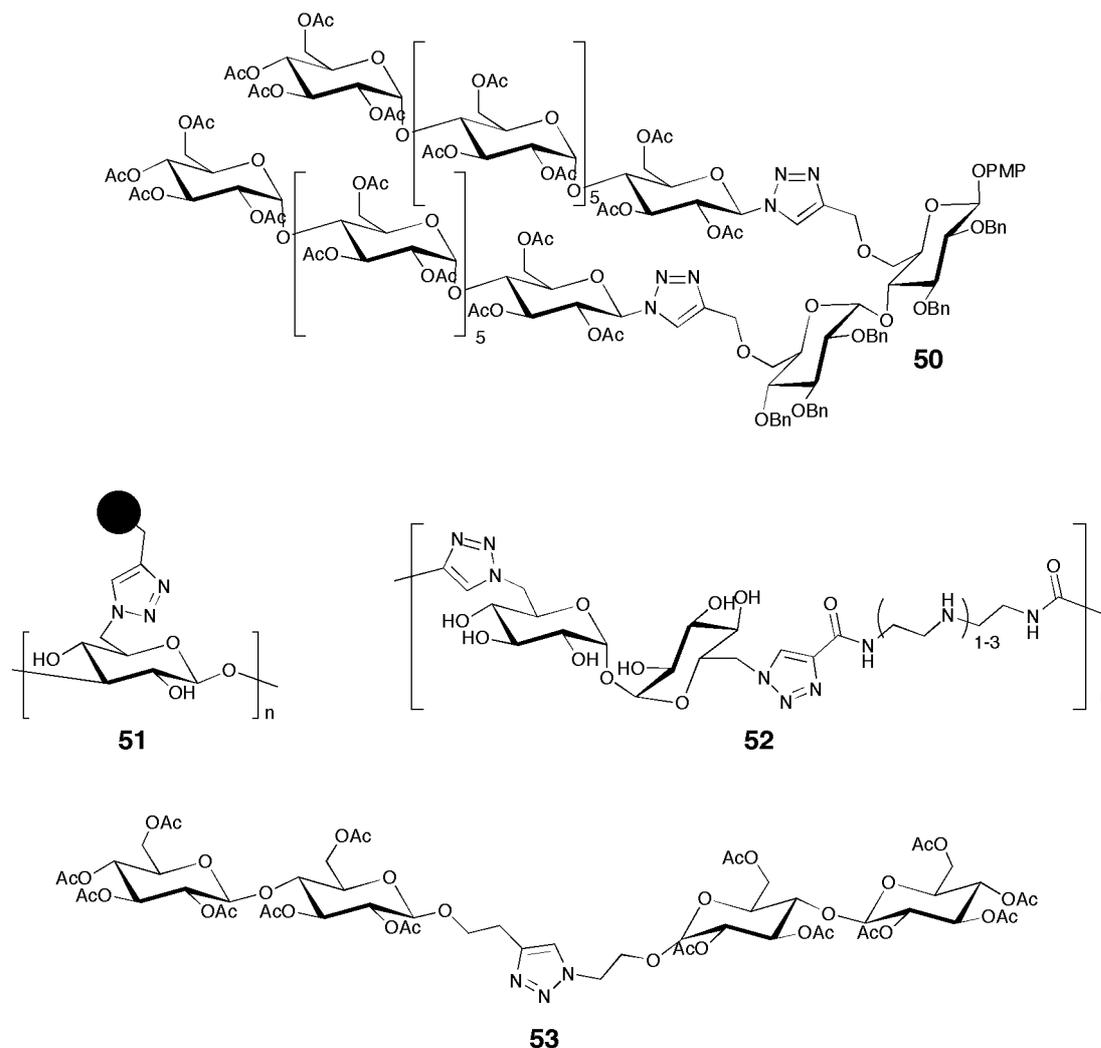


Figure I46: Analogues de polysaccharides préparés par "click chemistry": La réaction de cycloaddition de Huisgen (3+2) a été utilisée pour préparer des précurseurs d'analogues d'amidon **50**,⁸³ dérivatiser des polysaccharides naturels **51**,⁸⁴ synthétiser des glycovecteurs de gènes **52**,⁸⁵ et préparer des analogues d'oligosaccharides et de glycopeptides **53**.⁸⁶

⁸² Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. C. H. Kolb, G. M. Finn, B. K. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

⁸³ "Click Chemistry" en route to Pseudo-starch. L. Marmuse, S. A. Nepogodiev, R. A. Field. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2225-2227.

⁸⁴ "Click Chemistry" on Polysaccharides: a Convenient, General, and Monitorable Approach to Develop (1→3)-β-D-glucans with Various Functional Appendages. T. Hasegawa, M. Umeda, M. Numata, C. Li, A.-H. Bae, T. Fujisawa, S. Haraguchi, K. Sakurai, S. Shinkai. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 35-40.

⁸⁵ Trehalose Click Polymers inhibit Nanoparticle Aggregation and Promote pDNA Delivery in Serum. S. Srinivasachari, Y. Liu, G. Zhang, L. Prevette, T. M. Reineke. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8176-8184.

⁸⁶ "Click Chemistry" Inspired Synthesis of *pseudo*-Oligosaccharides and Amino Acid Glycoconjugates. S. Hotha, S. Kashyap. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 364-367.

Des oligomères cycliques constituent des analogues des molécules réceptrices que sont les cyclodextrines.^{87a-f} (figure I47)

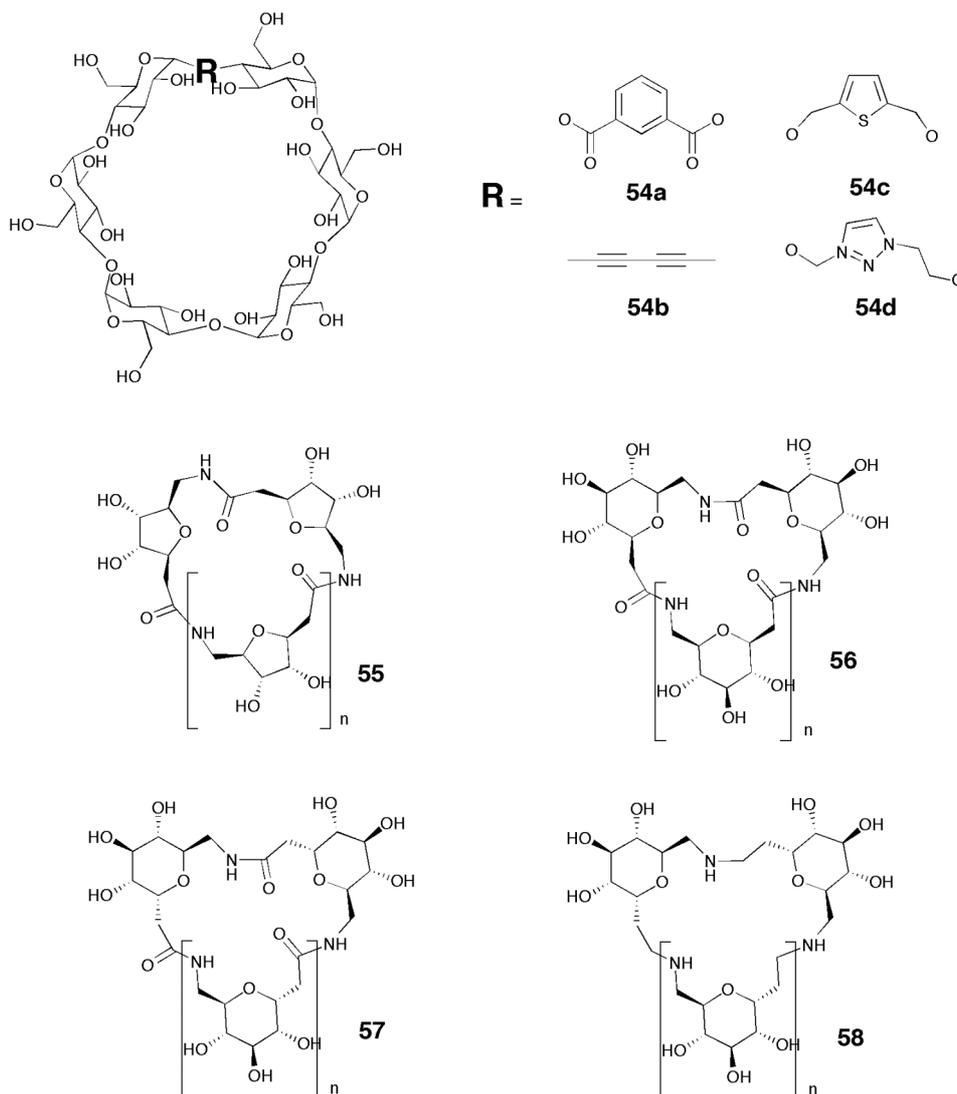


Figure I4: Exemples (non-exhaustifs) d'analogues de cyclodextrines: **54a**^{87b}, **54b**^{87a}, **54c**^{87a}, **54d**^{87a}, **55**^{87g}, **56**^{87g}, **57**^{87c}, **58**^{87c}.

⁸⁷ a) Synthesis of Cyclodextrin Analogues Containing a Buta-1,3-diyne-1,4-diyl or a Butane-1,4-diyl unit. B. Hoffmann, D. Zanini, I. Ripoche, R. Bürl, A. Vasella. *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1862-1888. ; Synthesis of Cyclodextrin Analogues Containing a Buta-1,3-diyne-1,4-diyl or a 1,2,3-Triazole unit and Analysis of Intramolecular Hydrogen Bonds. B. Hoffmann, B. Bernet, A. Vasella. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 265-287. b) A Facile Synthesis of Novel Types of Cyclodextrin Derivatives by Insertion of an Aromatic Dicarboxyl Spacer onto a Permethyated α -cyclodextrin Skeleton. T. Kida, T. Michinobu, W. Zhang, Y. Natatsuji, I. Ikeda. *Chem. Commun.* **2002**, 1596-1597. c) Synthesis of Orthogonally Protected Cyclic Homooligomers from Sugar Amino Acids. M. Ménand, J.-C. Blais, L. Hamon ; J.-M. Valéry, J. Xie. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4423-4430. d) Synthesis and Intramolecular Nitrile Oxide Cycloaddition of 3,5'-Ether-linked Pseudooligosaccharide Derivatives: An Approach to Chiral Macrooxacycles. J. Sengupta, R. Mukhopadhyay, A. Bhattacharjya, M. M. Bhadhade, G. V. Bhosekar. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8579-8582. e) Synthesis of Carbamate-Containing Cyclodextrin Analogues. P. Y. Chong, P. A. Petillo. *Org. Lett.* **2000**, 2, 8, 1093-1096. f) Cyclotrehalins : Cyclooligosaccharide Receptors Featuring a Hydrophobic Cavity. J. M. Benito, J. L. Jiménez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. Garcia Fernandez. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 9, 3674-3676. g) Synthesis and Structural Analysis of Cyclic Oligomers Consisting of Furanoid and Pyranoid ϵ -Sugar Amino Acids. R. M. van Well, L. Marinelli, K. Erkelens, G. A. van der Marel, A. Lavecchia, H. S. Overkleef, J. H. van Boom, H. Kessler, M. Overhand. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 12, 2303-2313.

Les Polysaccharides dynamiques

Précédents décrits dans la littérature

Des pseudopolyrotaxanes basés sur la formation d'un complexe entre une cyclodextrine modifiée par un résidu disaccharide, et un polymère linéaire ont été décrits.^{88a-b}

Cette nouvelle approche pour la préparation de ligands multivalent dits "dynamiques" a pour but d'imiter la flexibilité et la fluidité des systèmes biologiques dans lesquels les ligands glycosylés sont souvent ancrés dans des membranes lipidiques. Ces ligands (ainsi que leurs récepteurs) peuvent ainsi se déplacer, se regrouper, et s'orienter afin de maximiser leurs interactions avec leurs partenaires.

Dans le cas du polyrotaxane développé par Stoddart *et al.* (Schémas 17, 18, 19) les ligands saccharides présentent non pas un caractère dynamique du point de vue constitutionnel, mais une dynamique de conformation découlant de la liberté de mouvement de rotation et de translation des rotaxanes. Ils sont ainsi libres d'adapter leur répartition, leur espacement, et leur concentration locale, sur une même chaîne de polymère.

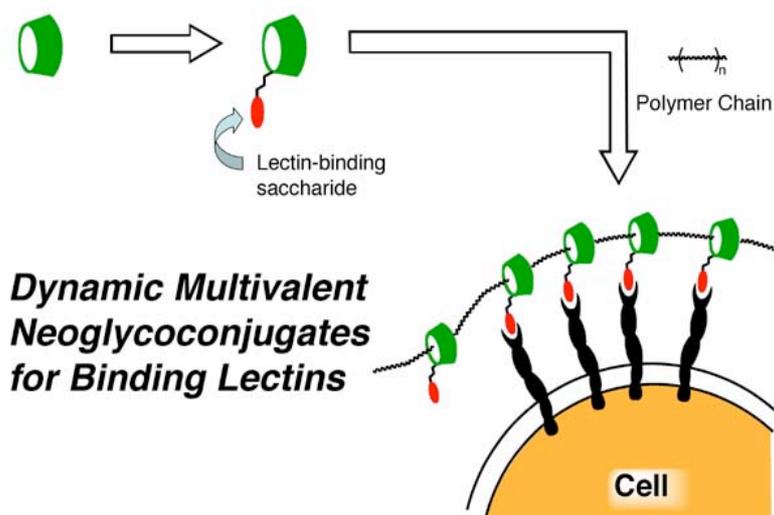


Schéma 17: Représentation schématique du concept de ligand dynamique multivalent de lectines développé par Stoddart *et al.*

⁸⁸ a) Dynamic Multivalent Lactosides Displayed on Cyclodextrin Beads Dangling from Polymer Strings. A. Nelson, J. F. Stoddart. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3783-3786. b) A Self-Assembled Multivalent Pseudopolyrotaxane for Binding Galectin-1. A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. S. Joiner, L. G. Baum, J. F. Stoddart. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11914-11922.

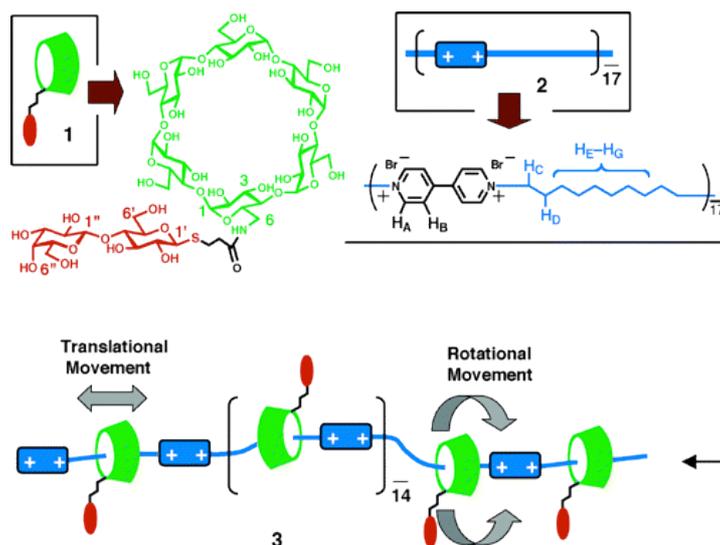


Schéma I8: Structure moléculaire et formation du pseudopolyrotaxane.

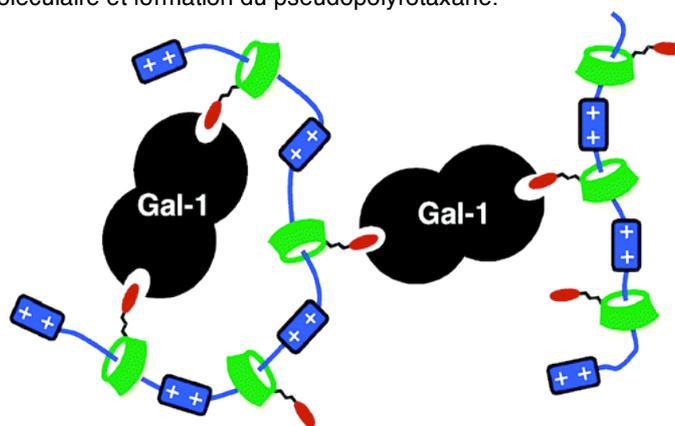


Schéma I9: Mode de liaison possible du pseudopolyrotaxane avec sa cible biologique la galectine 1.

Un exemple de polymère réversible préparé à partir de sucres cycliques et d'esters boroniques aromatiques est connu.⁸⁹(Figure I48) Il s'agit de polymères solubles en conditions aqueuses dont le degré de polymérisation est contrôlé par le pH. La formation du polymère **63** est observée à pH basique (pH= 11), alors que sa dissociation est observée en abaissant le pH (pH= 3).

On peut également mentionner que la formation d'acétal a également été utilisée mais sans en exploiter le caractère réversible.⁷⁷ La structure de ces polymères est éloignée de celle des polysaccharides naturels où deux monomères ne sont séparés que par un seul oxygène.

⁸⁹ pH-dependent reversible polymers formed from cyclic sugar-and aromatic boronic acid-based bolaamphiles. I. Nakazawa, S. Suda, M. Masuda, M. Asai, T. Shimizu. *Chem. Commun.* **2000**, 881-882.

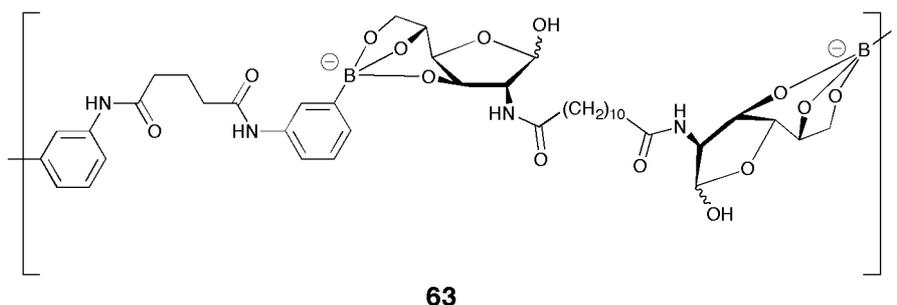


Figure I48: Polymère dynamique **63** préparé par la formation réversible d'esters boroniques.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux récepteurs biomimétiques cycliques par chimie combinatoire dynamique^{50a-c} des exemples d'oligomères cycliques dynamiques d'unités sucres ont été publiés. Ces macrocycles sont générés par la formation et l'échange de ponts disulfures en milieu aqueux dans des conditions neutres ou basiques.⁹⁰ Durant le cours de cette étude des travaux sur des récepteurs cycliques dynamiques basés sur la réaction de formation d'acylhydrazones ont été décrits. La dynamique de ces édifices moléculaire semble évidente, bien qu'aucune preuve n'ait été apportée.⁹¹ (Figure I49)

⁹⁰ Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides in Water. S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12063-12064.

⁹¹ Synthesis of Cyclic Oligomers of a Modified Sugar Amino acid Utilising Dynamic Combinatorial Chemistry. Laurent F. Bornaghi, Brendan L. Wilkinson, Milton J. Kiefel, Sally-Ann Poulsen. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9281-9284.

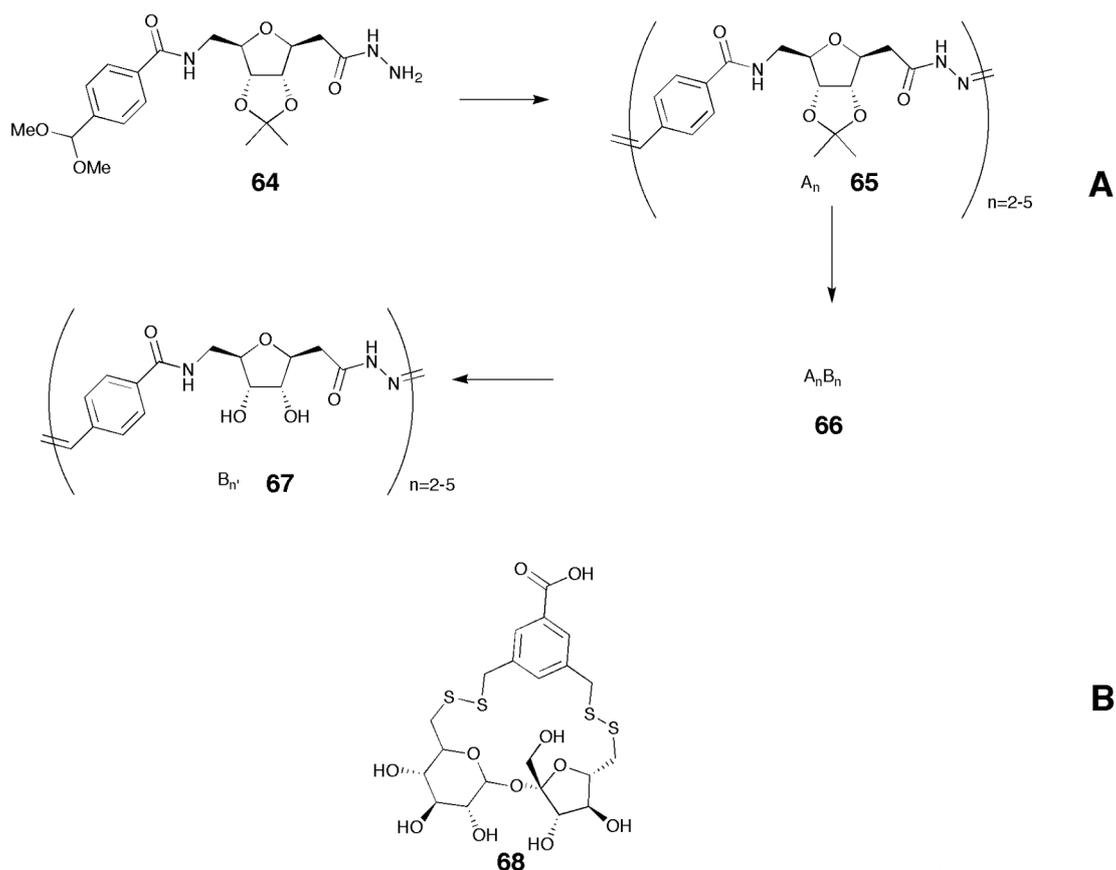


Figure I49: Oligomères cycliques dynamiques basés sur des unités sucres: **A** Macrocycles **67** basés sur la formation réversible de liaisons acylhydrazones comprenant une unité aminoacide dérivé de sucre; **B** Macrocycle **68** basé sur la formation réversible de ponts disulfures

Des polymères supramoléculaires incorporant des unités saccharides ont été décrits. Le premier exemple de ce type de polymère est basé sur l'appariement réversible et spécifique de séquences de paires de bases d'ADN situées à chaque extrémité d'un bras espaceur.⁹²(Schéma I10) Dans ces polymères les sucres constituent la chaîne principale des brins d'ADN.

⁹² Modular, Well-Behaved Reversible Polymers from DNA-Based Monomers. Elizabeth A. Fogelman, Wayne C. Yount, Jun Xu, Stephen L. Craig. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4026-4028.

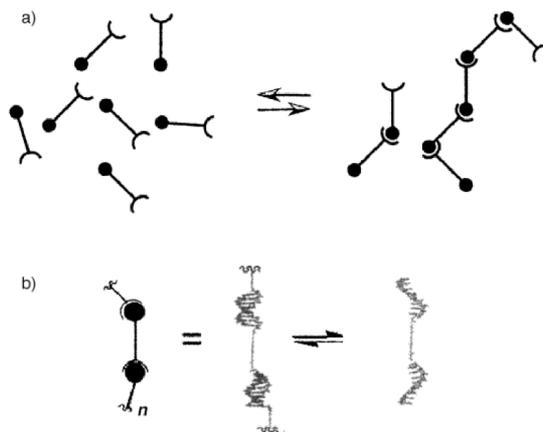


Schéma I10: Représentation schématique de polymères réversibles basés sur l'appariement de séquences d'ADN.

Plus récemment, les principes de la chimie constitutionnelle dynamique ont été mis à profit dans la mise au point d'un nouveau type de ligand multivalent construit par auto-assemblage en présence d'un récepteur biologique. (Schéma I11) L'auto-assemblage supramoléculaire de glycodendrimères pour former des nanoparticules non covalentes a été décrit.⁹³ Cette nouvelle approche utilise la propriété qu'ont certains glycodendrimères de s'auto-assembler de manière non-covalente pour former des nanoparticules chacune faisant office de ligand multivalent. Cet auto-assemblage étant dynamique, le ligand initial, qu'il soit multivalent au départ ou oligovalent, est capable de modifier sa constitution pour optimiser son interaction avec la cible moléculaire qu'est le récepteur biologique. Ces nanoparticules présentent à leurs surfaces des résidus saccharides et constituent donc des ligands polyvalents non covalents qui ont été utilisés pour l'inhibition d'interactions protéines-sucres *in vitro* et *in vivo*.

⁹³ Non-Covalent Polyvalent Ligands by Self-Assembly of Small Glycodendrimers: A novel concept for the inhibition of polyvalent Carbohydrate-Protein Interactions In Vitro and In Vivo. G. Thoma, M. B. Streiff, A. G. Katopodis, R. O. Duthaler, N. H. Voelcker, C. Ehrhardt, C. Masson. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 99-117.

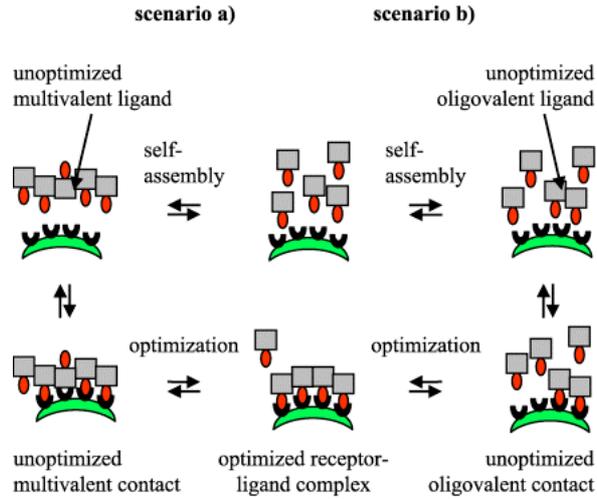


Schéma I11: Formation d'un complexe polyvalent récepteur ligand par auto-assemblage dynamique de briques élémentaires. Scénario a) Un ligand multivalent préformé entre en contact avec le récepteur. Il s'en suit une optimisation du ligand par interaction avec l'ensemble multivalent de récepteur qui fait alors office de "template". Scénario b) Des agrégats oligovalents de taille réduite n'interagissent que faiblement avec l'ensemble multivalent de récepteur. L'optimisation se fait par la croissance du ligand multivalent directement à la surface de l'ensemble de récepteurs.

Description du projet de recherche

Comme nous venons de le voir, un certain nombre de polymères analogues de polysaccharides ont été préparés par différentes méthodes.

Cependant, ces polymères n'ont pas de caractère dynamique, et ils ne peuvent donc pas s'adapter à leur environnement (température, pH, présence de récepteurs, ligands,...).

Notre sujet de recherche consiste justement à fonctionnaliser des saccharides naturels afin qu'ils puissent s'associer entre eux de manière réversible. D'après les précédentes études au laboratoire la jonction imine peut être utilisée à cet effet, et il s'agit donc de remplacer la jonction glycosidique par une jonction de type imine (acylhydrazone, hydrazone, ou oxime). (Schéma I12)

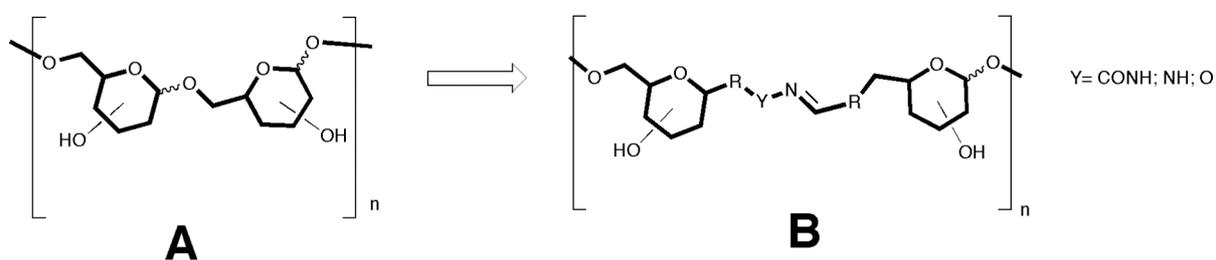


Schéma I12: Remplacement de la jonction glycosidique par une jonction imine réversible de type acylhydrazone (Y= CONH), hydrazone (Y= NH), ou oxime (Y=O).

Nous souhaitons également que les polymères qui en résulteront soient des analogues de polymères naturels, cela afin de combiner les propriétés de bioreconnaissances et de matériaux des polysaccharides naturels avec le caractère adaptatif des polymères dynamiques covalents. Ces analogues dynamiques de polysaccharides naturels peuvent être de 3 types différents (schéma I13):

1. Analogues de polysaccharides naturels à chaîne principale dynamique résultant de la polycondensation de saccharides par des réactions réversibles.
2. Analogues de polysaccharides naturels ramifiés: A) à chaîne principale dynamique ou B) fonctionnalisés de manière réversible par des chaînes latérales de saccharides.
3. Analogues de polysaccharides doublement dynamiques où la chaîne principale et les chaînes latérales sont dynamiques.

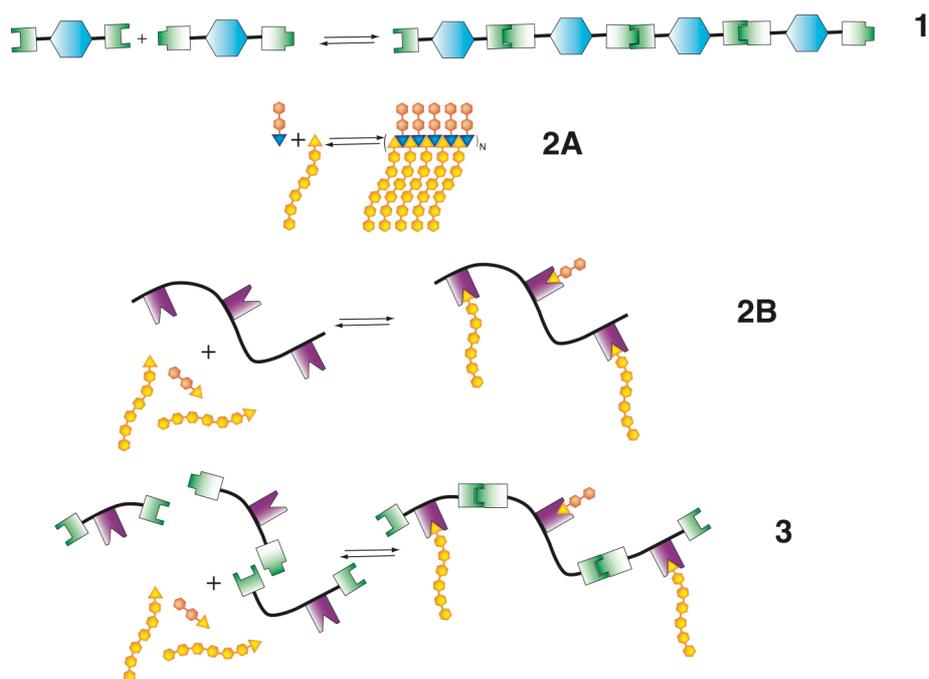


Schéma I13: Les différents types de polymères dynamiques analogues de polysaccharides **1)** à chaîne principale dynamique **2A)** ramifié à chaîne principale dynamique **2B)** ramifié à greffage latéral dynamique **3)** doublement dynamique à chaîne principale et greffage latéral dynamiques.

L'étape suivante sera de démontrer le caractère dynamique de ces polymères, puis de contrôler les phénomènes de réorganisation constitutionnels par l'introduction d'une cible moléculaire (ions, ou molécule organique) ou des facteurs physiques (température) ou chimiques (pH).

Si les résultats sont encourageants, on pourra également envisager d'étendre ces travaux à des récepteurs d'intérêt biologique comme ceux qui sont chargés de reconnaître les poly- et oligosaccharides à la surface des cellules.

**CHAPITRE II
POLYSACCHARIDES DYNAMIQUES
LINEAIRES À JONCTION
ACYLHYDRAZONE**

Chapitre II: Polysaccharides Dynamiques Linéaires à Jonction Acylhydrazone

Le choix de la jonction réversible

Les fonctions chimiques impliquées dans des réactions équilibrées sont nombreuses (cf. introduction pages 17 et 18 Figures I5 et I6), et un certain nombre d'entre elles ont déjà été utilisées dans la préparation de polymères dynamiques covalents.

Le choix du type de jonction réversible à utiliser dépend des conditions nécessaires à l'établissement des équilibres. Ces dernières doivent être compatibles avec l'application souhaitée pour le polymère. Dans notre cas, les monomères sont des molécules dérivées de composés naturels et sensibles à des conditions extrêmes de température et de pH. Les conditions dans lesquelles le polymère est réversible doivent être par conséquent relativement douces. Des travaux du laboratoire nous ont poussé à choisir la réaction de formation de bases de Schiff à cet effet.

La réaction de formation de base de Schiff entre composés carbonylés et aminés est connue pour être réversible et a déjà été appliquée avec succès à la synthèse de polymères dynamiques covalents. Parmi les différents types de bases de Schiff (imines, oximes, hydrazones, acylhydrazones, ...), les acylhydrazones sont celles qui ont été les plus utilisées dans le domaine de la chimie combinatoire dynamique¹, et en particulier dans la préparation de polymères dynamiques.² Les conditions d'établissements des équilibres et les vitesses d'échanges entre réactifs et produits ont été étudiées de manière extensive et optimisées³, et de ce fait nous avons basé le début de notre étude sur l'utilisation de ce type de jonctions (Figure II1).

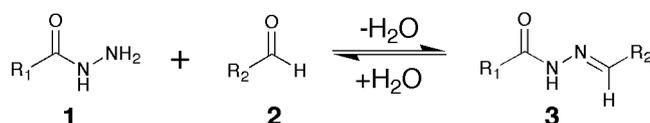


Figure II1: Réaction de formation équilibrée d'acylhydrazone **3** par condensation d'un aldéhyde **2** et d'un acylhydrazide **1**.

Les acylhydrazones sont stables en milieux aqueux à l'instar des oximes et des hydrazones, alors que les imines sont en général totalement hydrolysées dans ces

¹ cf. Chapitre I: Introduction référence 14 page 23.

² cf. Chapitre I: Introduction références 37 page 34, 44 page 37.

³ Optimising the reversibility of hydrazone formation for dynamic combinatorial chemistry. R. Nguyen, I. Huc. *Chem. Commun.* **2003**, 8, 942-943.

conditions.⁴ On peut également contrôler la vitesse des réactions d'échanges en faisant varier le pH. De manière générale, les échanges sont accélérés en abaissant le pH (jusqu'à des valeurs de 4 ou 5) et fortement ralentis à pH neutre ou légèrement basique (8-9).³

Cela nous permet donc d'envisager de réaliser la synthèse de polymères dynamiques covalents du type **6** (Figure II2) en milieux aqueux, ce qui est, bien entendu, une condition nécessaire si on souhaite appliquer ces polymères à des cibles biologiques comme des protéines (lectines, enzymes,...).

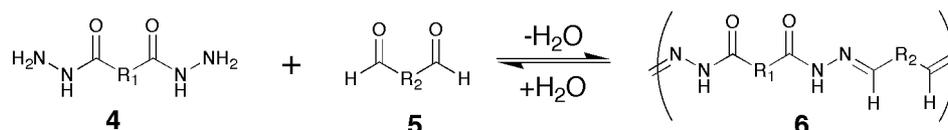


Figure II2: Copolymère polyacylhydrazone **6** préparé par polycondensation entre un monomère bis-hydrazide **4** et un monomère **5** dialdéhyde.

Premiers essais: dérivés homo-fonctionnalisés du glucose

Pour générer des analogues de polysaccharides naturels linéaires nous avons choisi de remplacer la jonction glycosidique par une jonction acylhydrazone dans un polysaccharide naturel, le dextrane (Schéma II1).

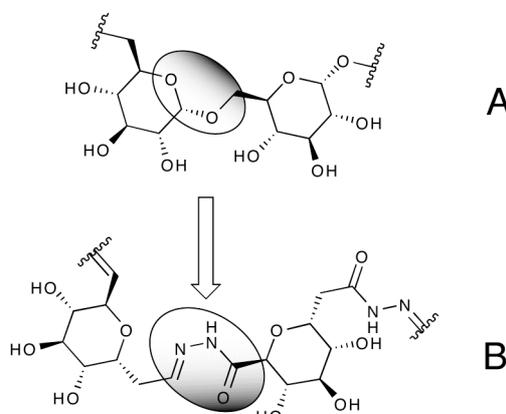


Schéma II1: **A** Motif monomérique des dextranes. **B** Analogue dynamique de dextrane obtenu après remplacement de la jonction glycosidique par une jonction acylhydrazone.

La chaîne principale des dextranes est composée de résidus glucose connectés par des liaisons glycosidiques du type α(1→6).⁵ Il nous faut donc introduire les fonctions polymérisables aldéhydes et acylhydrazides aux positions 1 et 6 du glucose.

Dans un premier temps afin d'éviter tout problème d'hydrolyse de liaisons glycosidique nous avons choisi d'utiliser des dérivés du type C-glycosides dans lesquels l'oxygène anomérique

⁴ Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution C. Godoy-Alcantar, A. K. Yatsimirsky, J. M. Lehn. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 979-985.

⁵ cf. Chapitre I: Introduction pages 45 et 46.

est remplacé par un carbone. Ce type de composé n'est pas hydrolysable et évite les réactions secondaires potentielles représentées dans la Figure II3 et qui peuvent résulter d'une hydrolyse de la jonction glycosidique. Nous verrons au chapitre suivant que cela était inutile étant donné le fait que la réversibilité de la liaison glycosidique n'a pas été observée dans les conditions expérimentales utilisées.

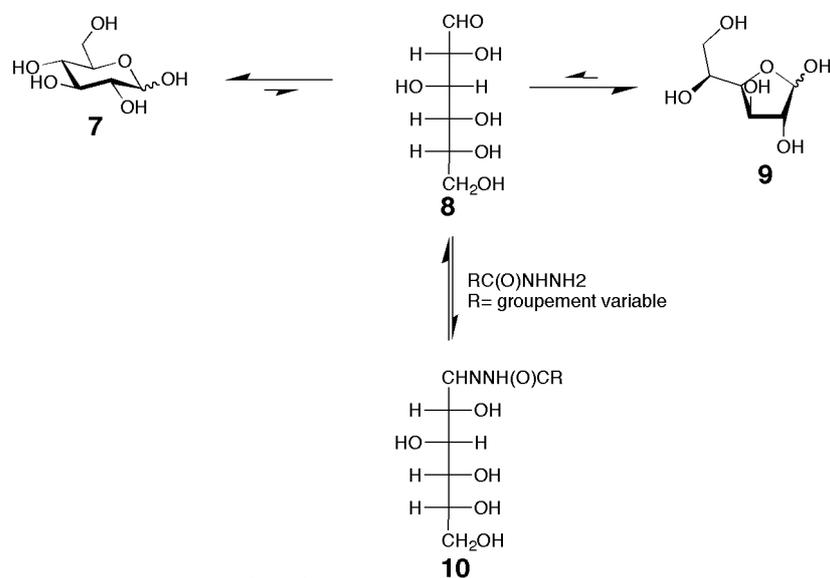


Figure II3: Equilibres entre formes cycliques et linéaires dans le cas d'un hexose en solution dans l'eau. La forme linéaire **8** est un aldéhyde qui peut réagir dans une réaction équilibrée avec les acylhydrazides. Sa présence rajoute donc des équilibres constitutionnels en plus des équilibres configurationnels.

En se basant sur ces critères nous avons entrepris la synthèse des composés C-glycosides bis-hydrazide **20** et dialdéhyde **17a** à partir du précurseur **13** décrit dans la littérature.⁶

⁶ a) One-pot Synthesis of 1-Allyl- and 1-allynyl-6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glycosides from Methyl Tetra-O-Benzyl- α -D-glycosides. S.-C. Hung, C.-C. Lin, C.-H. Wong. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5419-5422. b) Synthesis of Sugar Azido or Amino esters and Their Use as Building Blocks for the Preparation of Saccharide Nucleosides. J. Xie. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 20, 3411-3418.

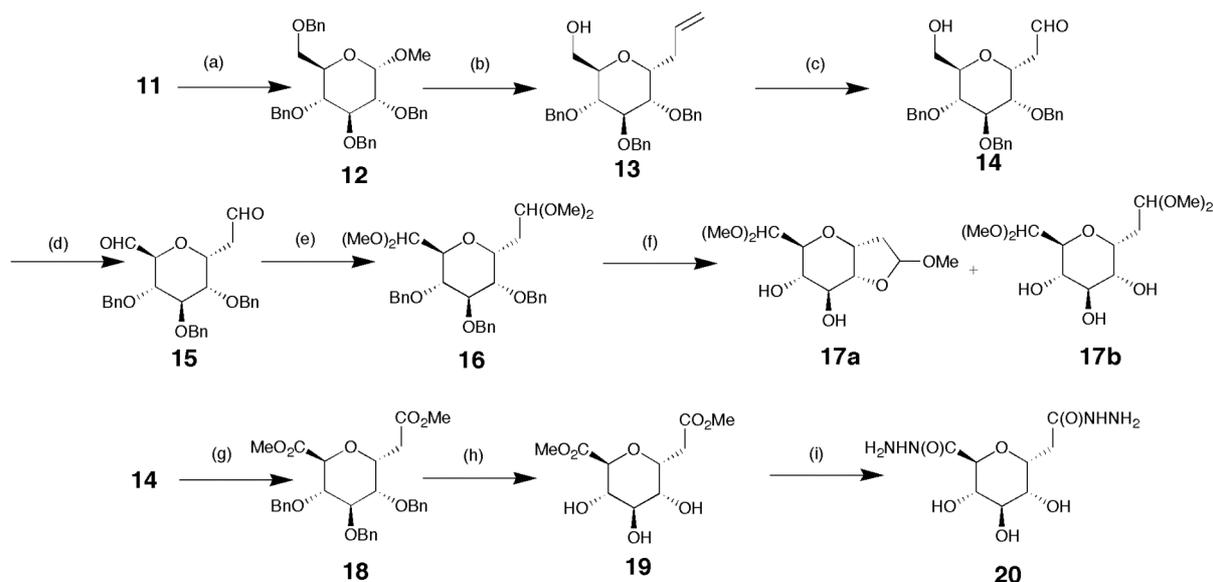


Figure II4: Synthèse des C-glycosides 17a et 20, réactifs et conditions réactionnelles. (a) NaH (5 equiv.), BnBr (5 equiv.), DMF, 98% ; (b) (i) TMSOTf (0,5 equiv.), allyltriméthylsilane (2 equiv.), CH₃CN (ii) Ac₂O, CH₂Cl₂, 5 min (iii) NaOMe, MeOH, 1 heure, 35% sur 3 étapes ; (c) O₃, puis PPh₃ (2 equiv.), CH₂Cl₂/MeOH:4/1, 83% ;(d) TEMPO (0,01 equiv.), acide trichlorocyanurique (1,7 equiv.), CH₂Cl₂, (e) CeCl₃ 0,4M dans MeOH, Triméthylorthoformate, 30% sur deux étapes (f) Pd/C, H₂, MeOH, 70% (g) (i) TEMPO (0,01 equiv.), acide trichlorocyanurique (1,7 equiv.), CH₂Cl₂ (ii) NaClO₂ (12 equiv.), H₂PO₄, H₂O₂, CH₃CN (iii) MeI (2,4 equiv.), K₂CO₃ (2,4 equiv.), DMF, 69% sur 3 étapes ;(h) Pd/C, H₂, MeOH/H₂O:4/1 ; (i) NH₂NH₂ monohydrate (8 equiv.), MeOH, 70% sur deux étapes.

Synthèse des composés 17a et 20

La voie de synthèse des C-glycosides **17a** et **20** qui a été utilisée (Figure II4) a l'avantage d'utiliser un intermédiaire commun **15** permettant d'accéder soit à **17a** soit à **20** en rajoutant une étape d'oxydation en diacide.

Après protection de tous les hydroxyles libres du α -D-glucopyranoside de méthyle **11** en éthers benzyliques dans des conditions standards, le methyl per-benzyl- α -D-glucoside **12** est converti en 1-allyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-glucoside **13** en une étape en le traitant par l'allyltriméthylsilane en présence d'un acide de Lewis, le triflate de triméthylsilyle, suivi de l'addition d'anhydride acétique.^{6a} Cette suite de réactions consiste tout d'abord en une C-allylation induite par l'activation du groupement méthoxy anomérique par l'acide de Lewis en présence d'allyltriméthylsilane. L'ajout d'anhydride acétique permet une débenzylation régio-sélective de l'hydroxyle en position 6 suivie de l'acylation *in situ* de l'alcool libre en présence de l'anhydride acétique catalysée par l'acide de Lewis toujours présent dans le milieu réactionnel. Une déprotection de l'intermédiaire acétylé, par le méthanolate de sodium, s'est révélée pratique du fait des propriétés de l'intermédiaire **13**, dont la purification est plus aisée que celle de l'acétate correspondant à partir d'un mélange réactionnel très complexe.

L'étape suivante permet d'obtenir l'aldéhyde **14** par une ozonolyse de l'alcène **13** dans des conditions réductrices. Ce composé s'est révélé à première vue étonnamment insoluble dans les solvants organiques usuels ce qui a compliqué son oxydation en dialdéhyde **15**.

Cette oxydation a été réalisée dans un premier temps à l'aide du periodinane de Dess-Martin⁷, mais cette méthode n'ayant pas donné de bons résultats (réaction très lente même en présence d'un grand excès d'oxydant, mauvaise conversion), une oxydation à l'aide du radical libre 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) en présence d'acide trichloroisocyanurique a été utilisée.⁸ Le dialdéhyde **15** ainsi obtenu est un produit instable, et bien qu'il soit possible de le chromatographier sur silice, il se dégrade lentement à température ambiante et sa déprotection par hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon a donné lieu à la formation d'un mélange complexe. Cela peut s'expliquer notamment par la grande réactivité de l'aldéhyde en position 6, qui est connu pour former très facilement des hydrates et des acétals intermoléculaires.⁹ C'est pourquoi ce dialdéhyde est transformé en diacétal par la méthode de Luche utilisant une catalyse par le chlorure de cérium dans le méthanol en présence de triméthylorthoformate.¹⁰ Le diacétal **16** peut ensuite être déprotégé par hydrogénation en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon pour fournir majoritairement le composé **17a** et non le composé **17b** attendu. Lors de la déprotection la formation d'un produit secondaire a été observée. (Figure II6 signaux 1 et 2) Nous pensons qu'il pourrait s'agir du composé **17b**, mais pour des raisons énoncées plus loin, la structure de ce produit n'a pas été déterminée. Le composé déprotégé est donc obtenu avec un rendement global de 6% sous la forme d'un mélange de deux produits, probablement **17a** et **17b**. A ce moment de l'étude il n'a pas été possible d'isoler le composé **17a**, c'est pourquoi il a été utilisé en mélange.

Le dialdéhyde **15** a été converti en diméthylester **18** par la succession d'une oxydation en diacide dans des conditions très douces¹¹ suivi d'une estérification dans la DMF en présence d'iodure de méthyle et de carbonate de potassium.¹² Le diester **18** peut ensuite

⁷ A Useful 12-I-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species. D. B. Dess, J. C. Martin. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277-7287.

⁸ A Very Mild and Chemoselective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds. L. De Luca, G. Giacomelli, A. Porcheddu. *Org. Lett.* **2001**, 3, 3041-3043.

⁹ Dialdosides-(1,5) of Glucose and Galactose: Synthesis, Reactivity, and Conformation. S. Singh, S. Nambiar, R. A. Porter, T. L. Sander, K. G. Taylor. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2300-2307.

¹⁰ Efficient Synthesis of Acetals Catalysed by Rare Earth Chlorides. J.-L. Luche, A. L. Gemal. *Chem. Commun.* **1978**, 976-978.

¹¹ Selective Oxidation of Aldehydes to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite-Hydrogen Peroxide. E. Dalcanale, F. Montarani. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 567-569.

¹² Synthesis of C-Glycosides of 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic Acid. Stereoselectivity in an Enolate Reaction. K. Luthman, M. Orbe, T. Waglund, A. Claesson. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3777-3784.

être déprotégé par hydrogénation en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon. Le diester **19** est ensuite converti en dihydrazide **20** (rendement global 16%) par traitement avec de l'hydrazine dans le méthanol.¹³

Polymérisation des composés **17a** et **20** par polycondensation

Ayant effectué la synthèse des monomères **17a** et **20** il nous restait ensuite à générer le dialdéhyde **17ah** par hydrolyse du diacétal **17a** en milieu aqueux acide (Figure II5), puis à le mettre en présence du bis hydrazide **20** en milieu neutre à pH=7, pour ensuite déterminer si la polycondensation a bien lieu, et si elle entraîne la formation d'un polymère, dont le caractère dynamique resterait alors à démontrer.

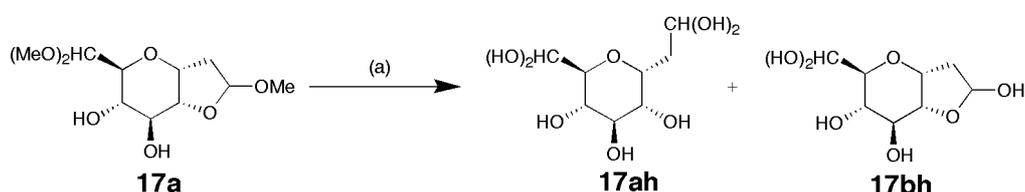


Figure II5: Déprotection par hydrolyse du composé **17a**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) pH<1, TFA, D₂O, 50°C, 3h.

La déprotection de **17a** a donné lieu à la formation d'un mélange probablement à cause de la formation d'un hémiacétal cyclique **17bh**. Comme pour le composé **17a** la structure de ce composé **17bh** n'a pas été vérifiée pour des raisons énoncées plus loin dans le bilan de ces premiers essais.(page 75)

¹³ Pectic (Poly-D-galacturonic) Hydrazide. M.L.Wolfrom, G.N. Kowkabany, W.W. Binkley. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 4011-4012.

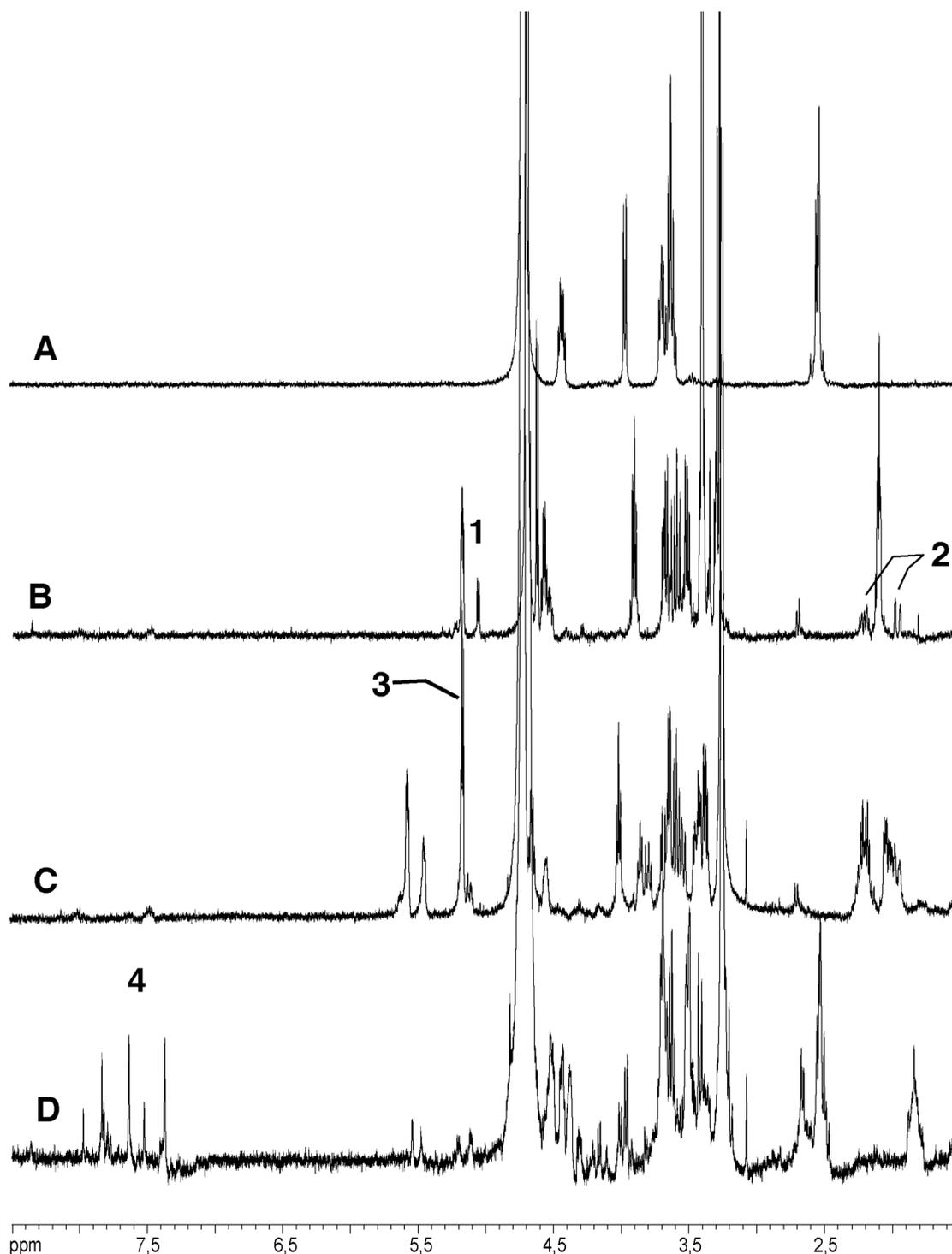


Figure II6: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère dihydrazide **20**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **17a** sous forme protégé. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du dialdéhyde **17ah** sous forme de dihydrate. Le signal 3 correspond aux signaux des hydrates d'aldéhydes. **D** Spectre RMN du ^1H (D_2O , $\text{pD}=7$) du mélange (suspension) obtenu après ajout de un eq. de **20** à une solution de **17ah** à 10 mM. Les signaux 4 correspondent aux signaux des acylhydrazones obtenus par polycondensation.

Après mélange de **17ah** et **20** à une concentration de 10 mM par RMN du ^1H on observe bien l'apparition de signaux correspondant à la formation d'acylhydrazone (Figure II6 signaux 4), la polycondensation a donc bien lieu. C'est à ce stade que les premiers problèmes de solubilité ont été rencontrés. Bien que la déprotection de **17a** ne pose pas de

problème, la polycondensation de **17ah** et de **20** donne lieu à la formation *quasi* immédiate d'un précipité blanc impossible à redissoudre en chauffant la suspension obtenue.

La qualité des spectres RMN du ^1H est médiocre à cause de la présence de ce précipité qui en plus réduit la concentration du surnageant. En effet, seule une petite partie des oligomères reste en solution est cela à une concentration faible ce qui n'est pas l'idéal pour suivre un mélange complexe par cette technique d'analyse.

Ce précipité peut s'expliquer par la propension à la fois des polyacylhydrazones et des sucres à former des liaisons hydrogène intermoléculaires, souhaitables dans certains cas (car ils augmentent la cohésion des matériaux), mais qui ici entraînent la précipitation des produits de polycondensation. L'ajout de DMSO pour atténuer la force des liaisons hydrogènes n'a pas permis de redissoudre le précipité.

Cela pose trois problèmes majeurs

1. La caractérisation des produits de polycondensation (hypothétiquement des polymères), ainsi que la démonstration de leur caractère dynamique, sont extrêmement difficiles si les méthodes spectroscopiques en solution comme la RMN ne peuvent pas être utilisées.
2. Le principe de Le Chatelier veut que si un des membres d'une bibliothèque dynamique précipite, alors tous les équilibres seront déplacés vers la formation de ce produit. Cela veut donc dire que les capacités d'adaptation de ces bibliothèques seront biaisées par des problèmes de solubilités. Il sera plus difficile d'amplifier, par le principe d'évolution moléculaire dirigée¹⁴, un des membres (soluble) de la bibliothèque si, dans le même temps, les équilibres sont déplacés vers la formation d'un ou plusieurs produits insolubles qui précipitent.
3. Des produits de polycondensation insolubles dans l'eau ne seront pas applicables à d'éventuelles applications biologiques nécessitant par exemple la mise en présence des polymères dynamiques et d'une cible telle qu'une enzyme ou une lectine.

Bilan des premiers essais

Plusieurs leçons sont déjà à tirer de ce premier exemple. Premièrement, la synthèse des composés **17a** et **20** est laborieuse ce qui limite grandement les quantités de produits utilisables pour effectuer les nombreux tests et expériences nécessaires à l'étude des polymères. Le monomère dialdéhyde **17ah** pose notamment problème étant donné qu'il est

¹⁴ cf. Chapitre I: Introduction page 23.

obtenu avec un rendement global de 6% sous la forme d'un mélange ce qui complique encore l'analyse du mélange des produits de polycondensation.

Ensuite la solubilité des polyacylhydrazones étant un facteur limitant et difficilement prévisible à ce stade, il a fallu envisager la préparation d'un plus grand nombre de monomères différents, et ensuite tester la solubilité des différentes combinaisons possibles en espérant que certaines d'entre elles soient plus solubles. Nous avons par exemple envisagé de préparer des monomères plus ou moins rigides, dans lesquels nous pourrions faire varier la distance entre les fonctions polymérisables.

C'est pourquoi dans la suite de ce travail nous nous sommes donc concentrés sur des monomères plus faciles d'accès. Une synthèse modulable permettant de varier facilement les fonctions polymérisables sur une même unité de base serait idéale.

Monomères dérivés du 2,5-anhydro-D-mannitol

Nous avons recherché des unités saccharides facilement accessibles, et modifiables de manière symétrique en minimisant l'utilisation de groupes protecteurs. Il nous est apparu que le 2,5-anhydro-D-mannitol (Schéma II2) correspond à ces critères de par sa symétrie C_2 et par la présence de deux fonctions alcools primaires en position 1 et 6. Ces deux fonctions sont modifiables sélectivement par oxydation et par alkylation ce qui permet d'introduire directement soit une fonction acide carboxylique en position 1 et 6, soit des groupements protecteurs à ces mêmes positions.

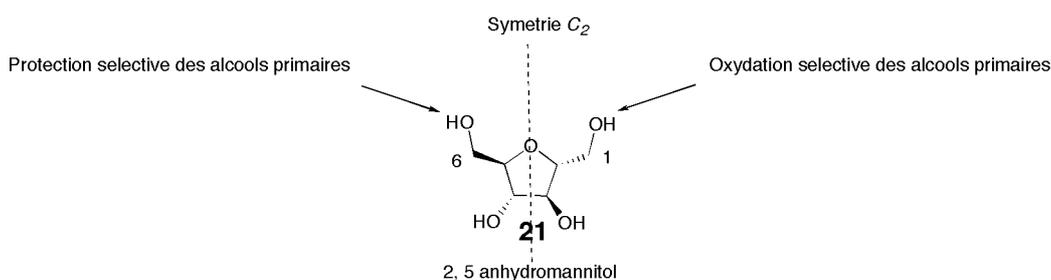


Schéma II2: Le motif 2,5-anhydro-D-mannitol **21** est symétrique et facilement modifiable par des oxydations et des protections régiosélectives.

Synthèse des monomères dérivés du 2,5-anhydro-D-mannitol

La Figure II7 suivante résume la préparation des monomères bis-hydrazides et dialdéhydes obtenus à partir du diester **24**.

Le diester **24** a été obtenu en se basant sur des procédures décrites dans la littérature.¹⁵ Il est accessible rapidement à partir de la glucosamine commerciale, par une suite de désamination nitreuse et d'oxydation sélective des alcools primaires dans l'acide nitrique. L'oxydation est suivie d'une estérification dans le méthanol puis d'une purification sur gel de silice pour donner le produit cristallin **24**. Ce diester peut ensuite être transformé directement en monomère bis-hydrazide **25** par traitement par de l'hydrazine, soit en monomère dialdéhyde protégé **26** par réaction avec la 3,3-diéthoxy-propylamine ou la 2,2-diméthoxy-éthylamine pour donner **27**. Il est important de noter que même si les rendements sont modestes, ces synthèses sont courtes (1-2 étapes à partir de produits commerciaux, comprenant seulement une à deux chromatographies), ce qui facilite grandement l'accès aux monomères, que l'on peut alors facilement obtenir à l'échelle du gramme en quelques jours. Ce qui n'était pas le cas pour la synthèse des composés **17a** et **20** qui nécessitait 6 et 8 étapes avec pour la plupart des purifications laborieuses par chromatographie sur gel de silice

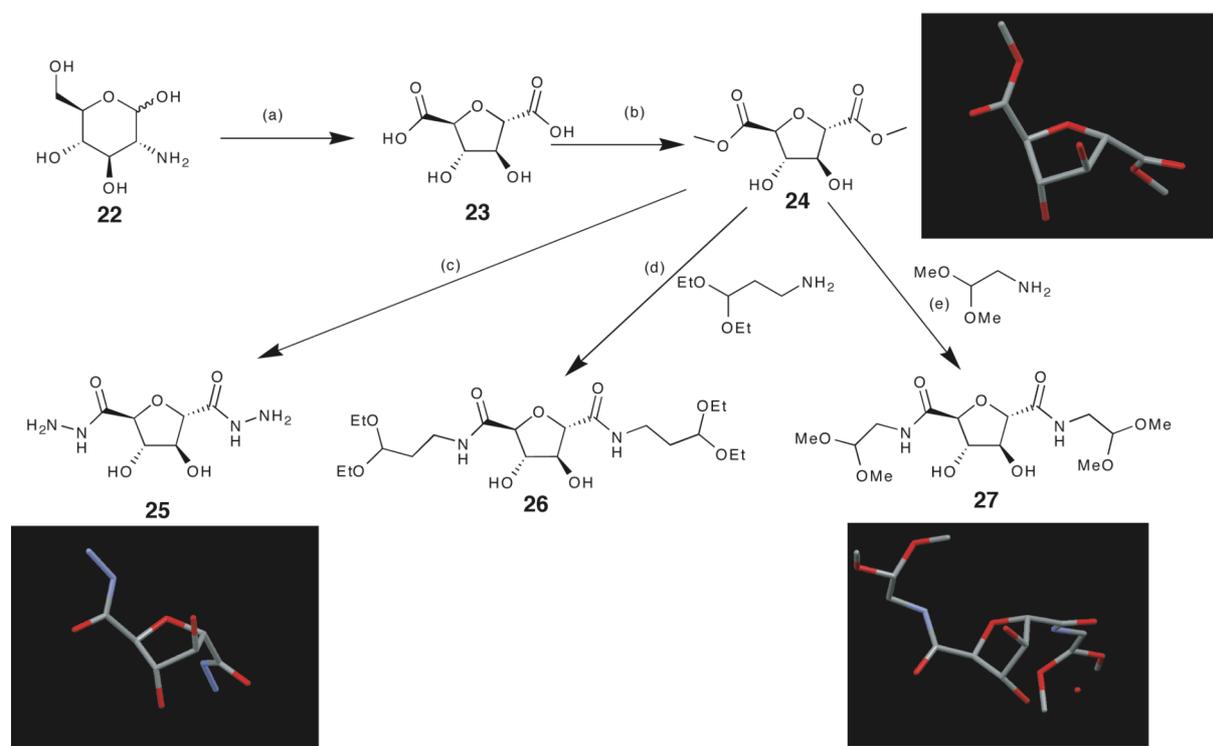


Figure II7: Synthèse des monomères 25, 26 et 27, réactifs et conditions réactionnelles. (a) HNO_3 , 80°C ; (b) MeOH, 20% sur deux étapes; (c) NH_2NH_2 monohydrate, MeOH, 50% ;(d) 3,3-diéthoxy-propylamine, MeOH, reflux 3H, 20%; (e) 2,2-diméthoxy-éthylamine, MeOH, reflux 3H, 44%. Les structures tridimensionnelles présentées ont été obtenues par diffraction des rayons X sur des monocristaux. Dans la structure du composé **27** un oxygène supplémentaire est présent sur une des fonctions acétal, cela est dû au fait que dans la maille cristalline ces deux positions sont occupées dans un ratio de 60/40.

¹⁵ a) Über Isozuckersäure. Ferd. Teimann. *Chemische Berichte* **1894**, 18, 141-147. b) Über Muscarin. Synthese von bisquaternären, dem Muscarin ähnlichen Verbindungen. J.Kiss, H.Furter, F.Lohse, E.Hardegger. *Helv. Chim. Acta* **1961**, 18, 141-147.

Afin de réduire la distance entre deux unités sucres dans les polymères, nous avons également cherché à synthétiser un monomère dialdéhyde où les fonctions aldéhydes seraient directement attachées sur le cycle du sucre.

Pour ce faire les deux fonctions alcool primaires du 2,5-anhydro-D-mannitol¹⁶ **21** ont été protégé régiosélectivement par du chlorure de trityle, pour obtenir après benzylation et déprotection des groupements trityl, le diol **28** décrit dans la littérature.¹⁷ Ce composé peut ensuite être oxydé en dialdéhyde et protégé par formation d'acétal pour donner **29**. Une déprotection finale par le méthanolate de sodium fournit le monomère dialdéhyde protégé **30**.

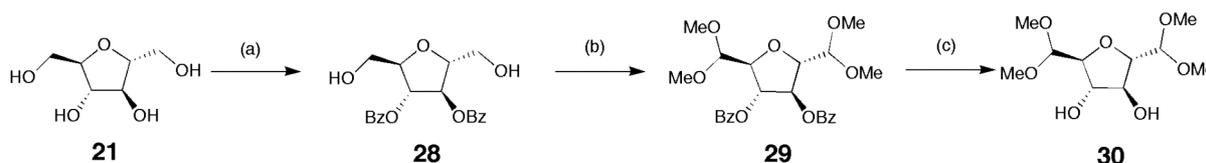


Figure II8: Synthèse du monomère 30, réactifs et conditions réactionnelles. (a) i. TrCl, pyridine ii. BzCl, pyridine iii. AcOH, H₂O; (b) i. TEMPO, acide trichloroisocyanurique ii. CH(OMe)₃, MeOH, *p*-toluene sulfonic acid, 53% sur deux étapes; (c) NaOMe, MeOH, 80%.

Polymerisations: Tests de solubilité des différentes combinaisons de monomères

Les trois dialdéhydes protégés **30**, **26**, et **27** donnent accès après déprotection par hydrolyse en milieu acide à trois monomères dialdéhydes **30h**, **26h**, et **27h**. Ces réactions ont été suivies par RMN du ¹H dans le D₂O en observant la disparition des signaux attribués aux fonctions acétals des dialdéhydes protégés, et par l'apparition des signaux attribués aux fonctions aldéhydes libres. Dans tous les cas les hydrates des aldéhydes sont majoritairement observés. (Figure II9, II10, II11, II12, II13, et II14)

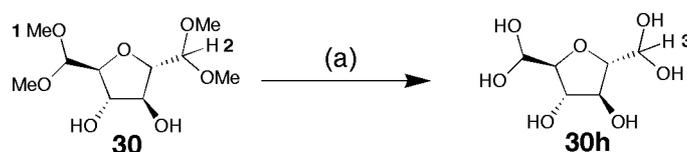


Figure II9: Déprotection par hydrolyse du composé 30, réactifs et conditions réactionnelles. (a) pD<1, DCI, 50 °C, 24 H, D₂O. Les indices pour l'attribution des protons sont à rapporter Figure II10.

¹⁶ Original Synthesis of Linear, Branched and Cyclic Oligoglycerol Standards. S. Cassel, C. Debaig, T. Benvegno, P. Chaïmbault, M. Lafosse, D. Plusquellec, P. Rollin. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 5, 875-896.

¹⁷ Synthesis of Poly-*O*-sulfated Glycosides of 2,5-anhydro-D-mannitol. J. Kuszmann, G. Medgyes, S. Boros. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1739-1749.

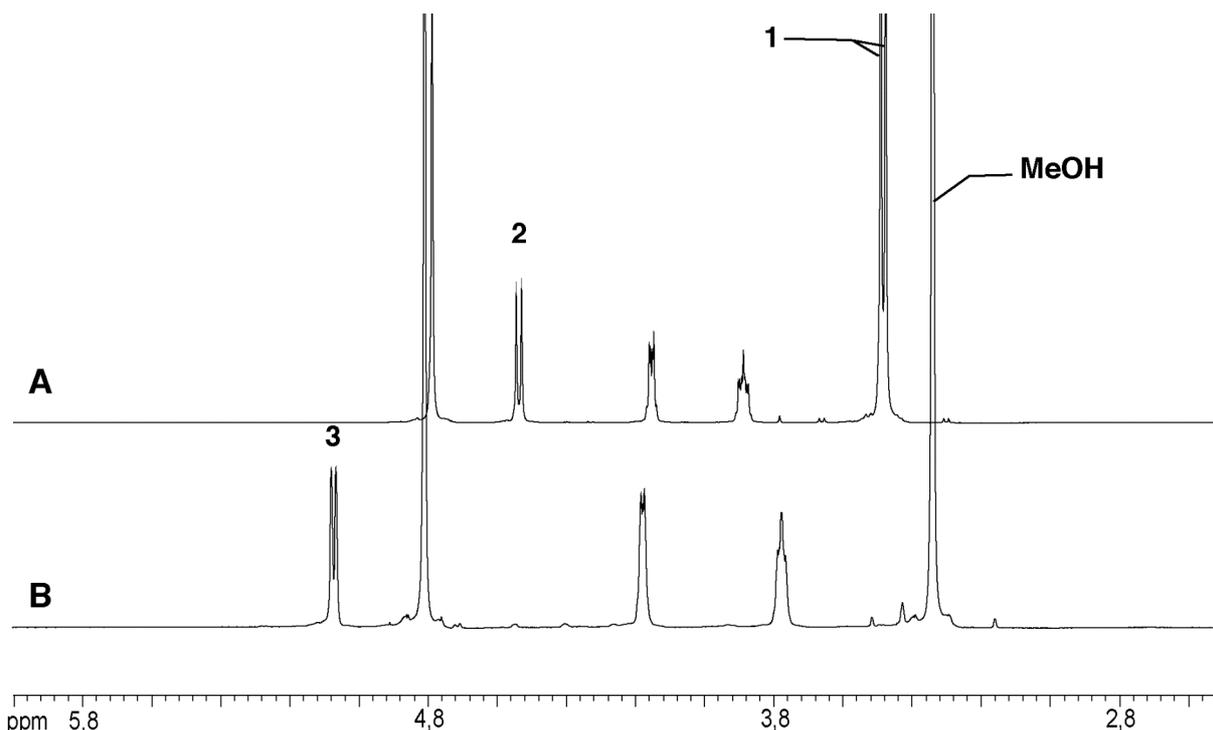


Figure II10: Déprotection du monomère **30**: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du diacétal **30**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du dialdéhyde déprotégé **30h**. La forme dihydrate **30h** de ce composé prédomine en solution dans l'eau. La réaction d'hydrolyse peut être suivie par la diminution des pics des protons des fonctions acétals de **30** signaux 1 et 2, et par l'augmentation du pic 3 des protons des fonctions hydratés de **30h**. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter Figure II9.

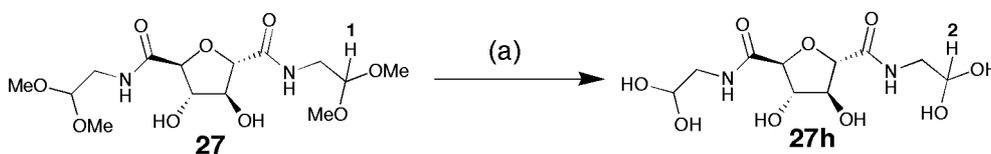


Figure II11: Déprotection par hydrolyse du composé **27**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) $\text{pD} < 1$, DCI , 30°C , 12h , D_2O . Les indices pour l'attribution des protons sont à rapporter Figure II12.

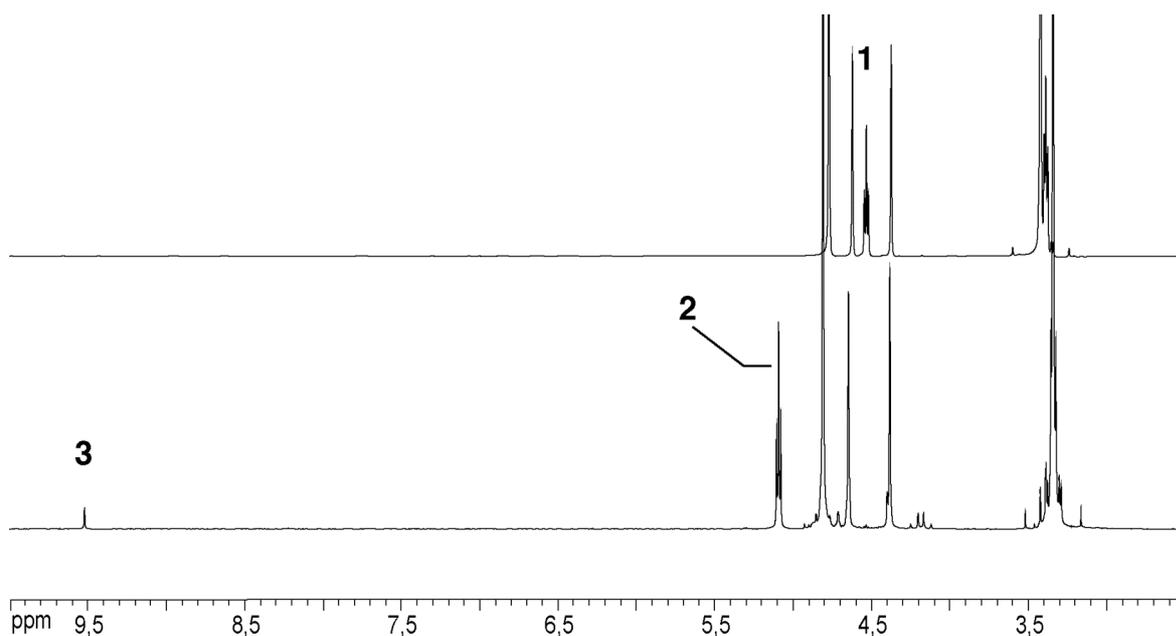


Figure II12: Déprotection du monomère **27**. **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du diacétal **27**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du dialdéhyde déprotégé **27h**. La déprotection peut être suivie par la disparition du pic des protons des fonctions acétals de **27** (signal 1). La forme dihydrate **27h** de ce composé prédomine en solution dans l'eau comme le montre le ratio entre le signal 2 des protons des fonctions hydrates et celui des fonctions aldéhydes (signal 3). Les références 1 et 2 pour l'attribution des signaux sont à rapporter Figure II11.

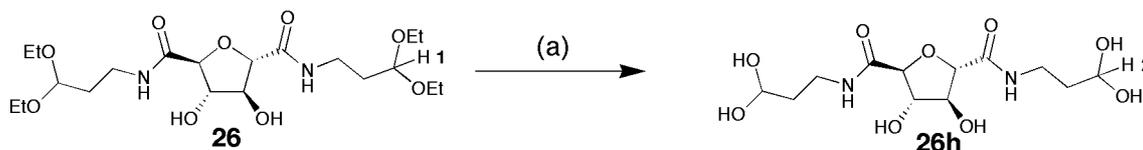


Figure II13: Déprotection par hydrolyse du composé **26**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) $\text{pD} < 1$, DCI , 30°C , 12h , D_2O . Les indices pour l'attribution des protons sont à rapporter Figure II14.

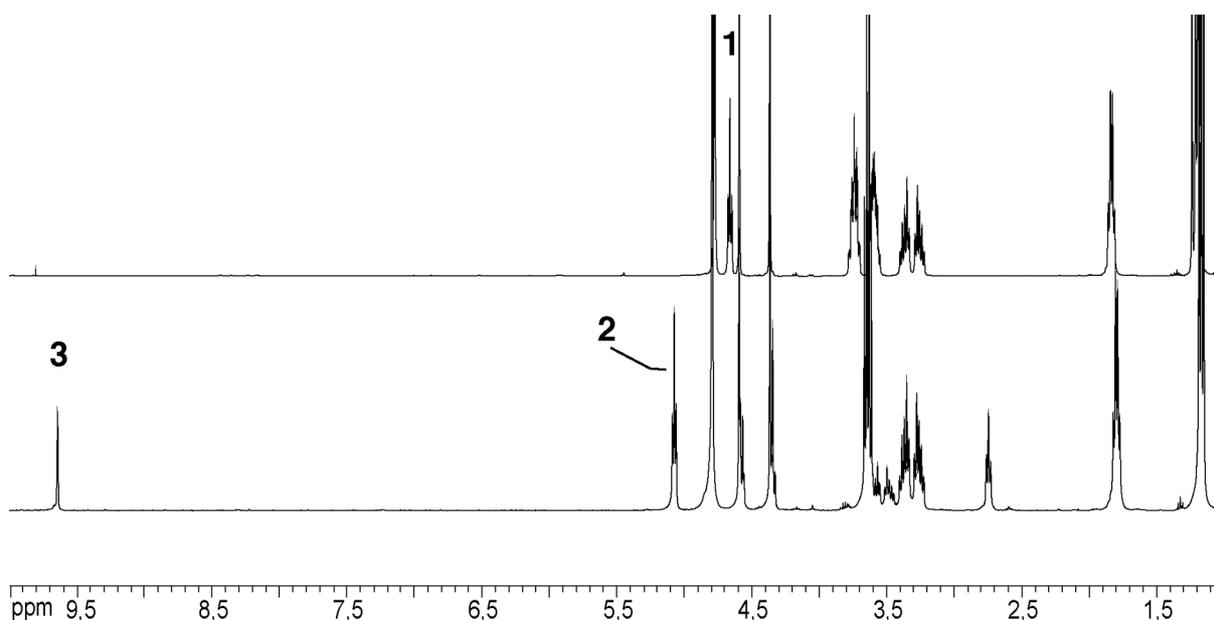


Figure II14: Déprotection du monomère **26**. **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du diacétal **26**, on peut aisément suivre cette réaction en observant la diminution de l'intensité du signal des protons des fonctions acétals de **26** (signal 1). **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du dialdéhyde déprotégé **26h**. La forme dihydrate **26h** de ce composé prédomine en solution dans l'eau comme le montre le ratio entre le signal 2 des protons des fonctions hydrates et celui des fonctions aldéhydes (signal 3). Les références 1 et 2 pour l'attribution des signaux sont à rapporter Figure II13.

Nous devrions alors pouvoir obtenir trois polymères dynamiques par polycondensation lorsque le monomère bis-hydrazide **25** est ajouté en équivalence à la solution d'un monomère dialdéhyde **30h**, **26h**, ou **27h** en milieu aqueux tamponné à pD= 5 à une concentration de 20 mM par exemple.

Dans le cas du monomère dialdéhyde **30h** on observe la formation d'un précipité blanc impossible à redissoudre par chauffage de la solution aqueuse ou par ajout de DMSO. Pour le dialdéhyde **27h** les produits de polycondensation précipitent rapidement à température ambiante, et sont redissous pour un temps en chauffant la solution aqueuse à 50°C, température à laquelle la précipitation s'observe toujours, mais après un temps plus long (24h). De ce fait les produits de polycondensation **31** et **32** n'ont pas été caractérisés plus en détails.(Figure II15)

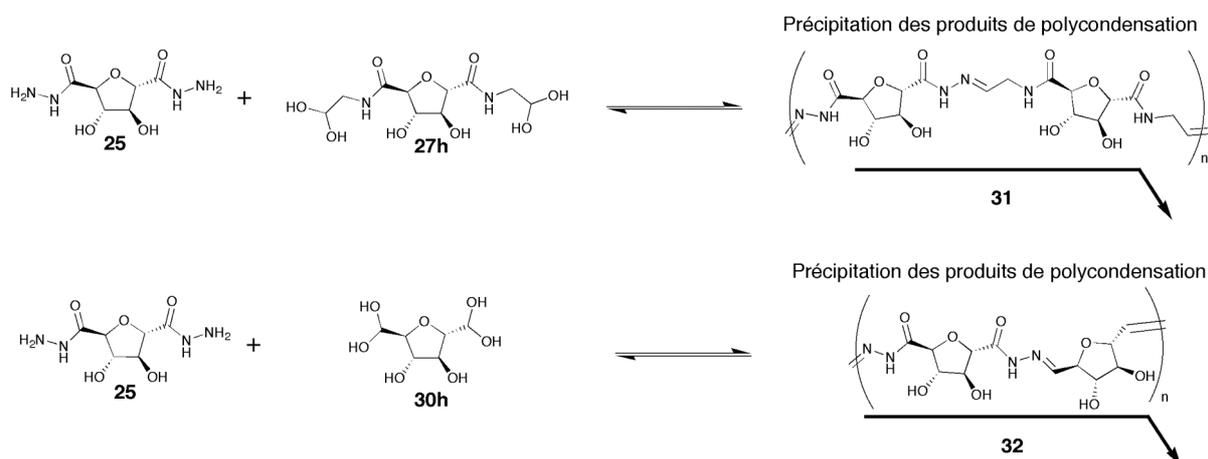


Figure II15: Essais de polymérisation des dialdéhydes **30h** et **27h** avec le bis-hydrazide **25**. Ces deux combinaisons ont donné lieu à la formation de produits de polycondensation insolubles. **31** est insoluble dans tous les solvants testés y compris dans le DMSO à chaud, **32** est insoluble dans D₂O à température ambiante et pD=5, et précipite lentement (24 h) à 50 °C.

Par contre les produits de polycondensation **33** obtenus par ajout de **25** au dialdéhyde **26h** (Figure II16) restent en solution dans l'eau à une concentration en monomère de 25 mM. On observe bien par RMN du ¹H la diminution de la proportion d'hydrates (Figure II17 le signal 2 est plus intense que le signal 4) et l'apparition de signaux correspondant à la formation d'acylhydrazones (Figure II17 signaux 3).

Le temps d'équilibration varie selon le pD. A pD=5, après 10 min l'équilibre est atteint, et on n'observe plus de changement dans le spectre RMN du ¹H du polymère dynamique **25+26h**. A pD= 7 le temps d'équilibration est d'environ 9 heures, mais les échantillons sont équilibrés pendant au moins 24 heures.

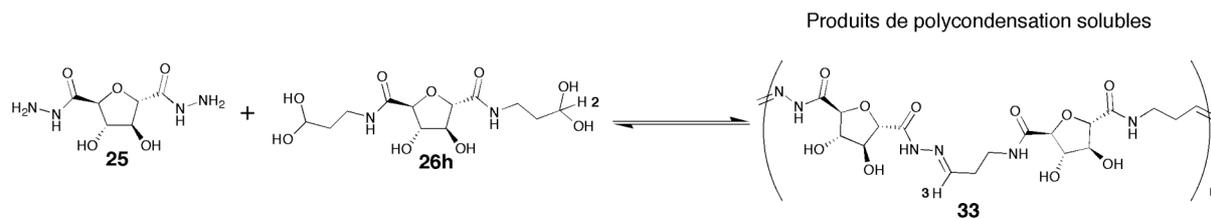


Figure II16: Polymérisation du dialdéhyde **26h** avec le bishydrazide **25**. Cette combinaison a donné lieu à la formation de produits de polycondensation **33** solubles dans l'eau. Les indices pour l'attribution des protons sont à rapporter Figure II17.

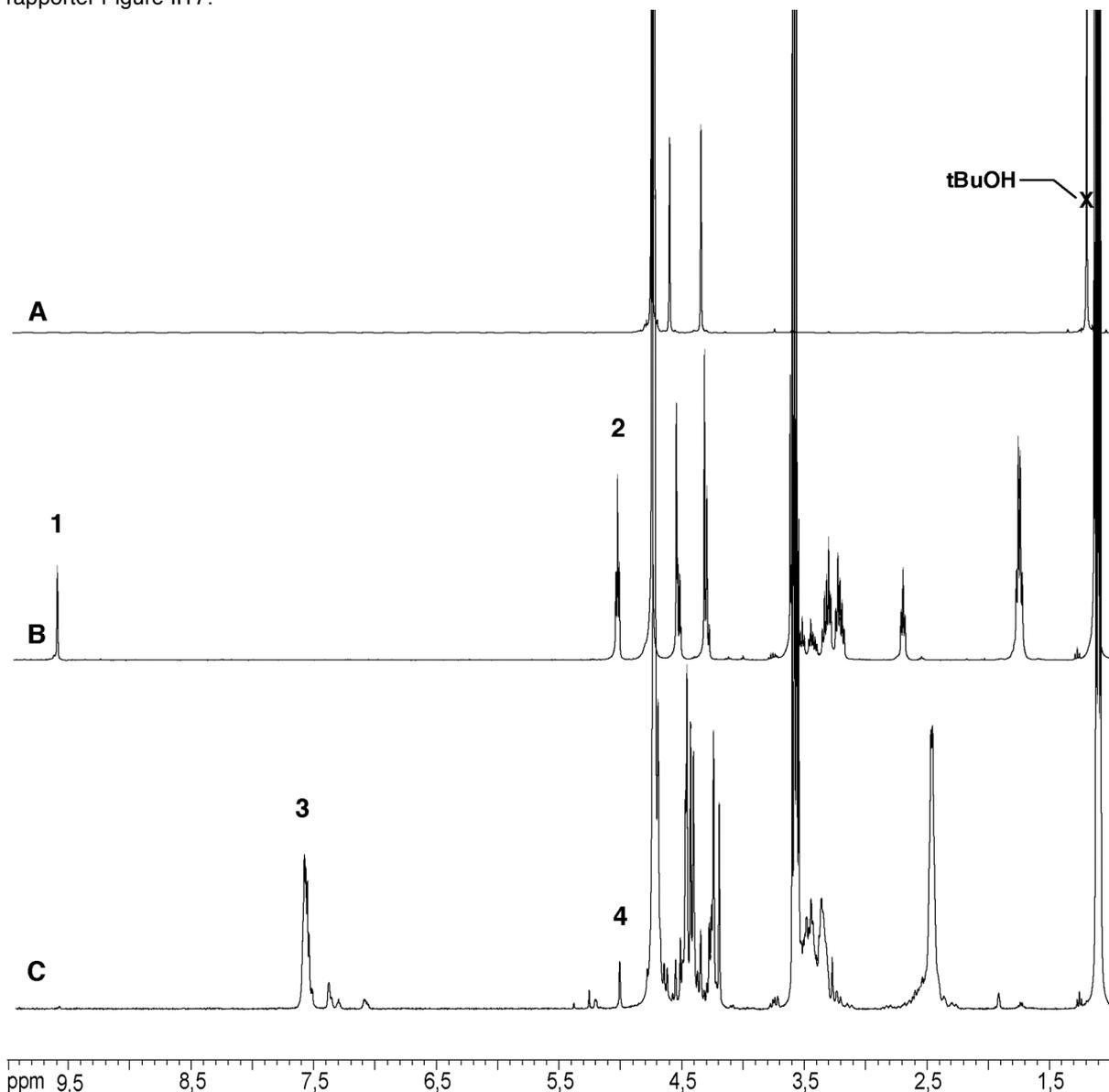


Figure II17: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du bis-hydrazide **25**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du dialdéhyde **26h**. **C** Spectre RMN ^1H du polymère dynamique obtenu après ajout d'un équivalent de **25** à une solution de **26h** à une concentration de 25 mM à pD= 5. Les références des signaux sont à rapporter dans le texte principal et Figure II16.

La polycondensation a donc bien lieu pour donner un mélange complexe d'oligomères d'unités dérivées du 2,5-anhydro-D-mannitol **21**, reliées entre elles par des jonctions acylhydrazones.

Ce mélange peut être considéré comme une bibliothèque d'analogues d'oligosaccharides du type α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides. (Schéma II3) Ces polysaccharides sont présents dans la paroi cellulaire de certaines mycobacteries comme *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*. Les α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides sont les unités de base des arabinogalactanes et des lipoarabinomannanes qui sont les principaux composants de la paroi des mycobacteries.¹⁸

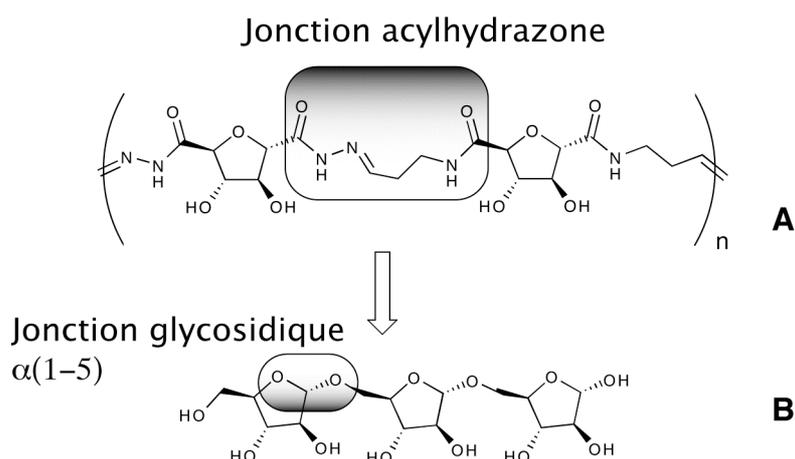


Schéma II3: **A** Analogue dynamique d' α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides obtenu après remplacement de la jonction glycosidique par une jonction acylhydrazone. **B** Motif monomérique des α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides.

Application à la préparation d'une bibliothèque constitutionnelle dynamique d'analogues d'oligosaccharides: découverte d'analogues dynamiques de cyclodextrines.

Nous avons dans un premier temps tenté d'analyser ce mélange par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) pour évaluer la taille des oligomères présents dans cette bibliothèque dynamique. Nous avons été en mesure de mettre en évidence la formation des macrocycles **35** et **36** à une concentration de 6.25 mM.(Schéma II4)

A une concentration de 200 mM, aucun signal n'a pu être observé dans les mêmes conditions, et la présence de macrocycles plus grands ou d'oligomères linéaires n'a pas pu être démontrée par cette méthode.¹⁹

Bien que la détermination de la composition exacte de la bibliothèque soit une question intéressante, elle n'est pas cruciale pour démontrer le phénomène qui nous intéresse, à savoir l'adaptation à un stimulus par un changement constitutionnel de la

¹⁸ Synthesis of Oligoarabinofuranosides from the Mycobacterial Cell Wall. K. Marott; S. Sanchez, T. Bamhaoud, J. Prandi. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3587-3598.

¹⁹ Le spectre de masse MALDI de la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h** à 6.25 mM est présenté en annexe 1.

bibliothèque dynamique. Autrement dit, l'amplification d'un ou de plusieurs membres de la bibliothèque à la suite d'une modification des conditions environnementales dans lesquelles le mélange se trouve. Cela peut être un changement de pH, de concentration, de solvant ou alors de température. Mais, même si les facteurs précédents auraient probablement un effet sur les proportions des différentes espèces à l'équilibre, nous avons préféré nous concentrer sur l'effet que pourrait avoir l'ajout d'une cible moléculaire sur la composition de la bibliothèque dynamique. (Schéma II4)

Une molécule cible faisant office de substrat pour des récepteurs potentiellement présent dans la bibliothèque pourrait alors induire la formation d'un complexe plus stable que les membres initiaux de la bibliothèque, et ainsi déplacer les équilibres vers la formation de celui-ci. Idéalement ces récepteurs seraient cycliques, ils pourraient alors être considérés comme des analogues de cyclodextrines.

Criblage et indentification d'une cible

N'ayant pas fixé au départ d'hypothèse précise sur le type de molécules pouvant se lier aux membres de la bibliothèque, nous avons effectué un petit criblage de substrats potentiels, en les mettant en présence de la bibliothèque et en contrôlant les modifications du spectre RMN du ¹H du mélange par rapport à celui de la bibliothèque de départ.

Cette démarche est l'inverse de celle utilisée en synthèse combinatoire classique²⁰ pour laquelle un criblage implique de tester séparément un grand nombre de substrats, des inhibiteurs par exemple, sur un seul récepteur, une enzyme en général. Ici nous tentons d'identifier un récepteur *a priori* inconnu en analysant la réponse d'une bibliothèque constitutionnelle dynamique à l'introduction de différents substrats (cibles moléculaires).

Le choix de ces cibles s'est fait en sélectionnant les substrats les plus communs des cyclodextrines ou des molécules aromatiques amphiphiles disponibles commercialement. Des ions métalliques ou organiques, et des anions halogènes ont également été testés. (Schéma II4)

²⁰ Introduction: Combinatorial Chemistry. J. W. Szostak. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 347-348 ainsi que tous les articles inclus dans ce numéro 2 volume 97.

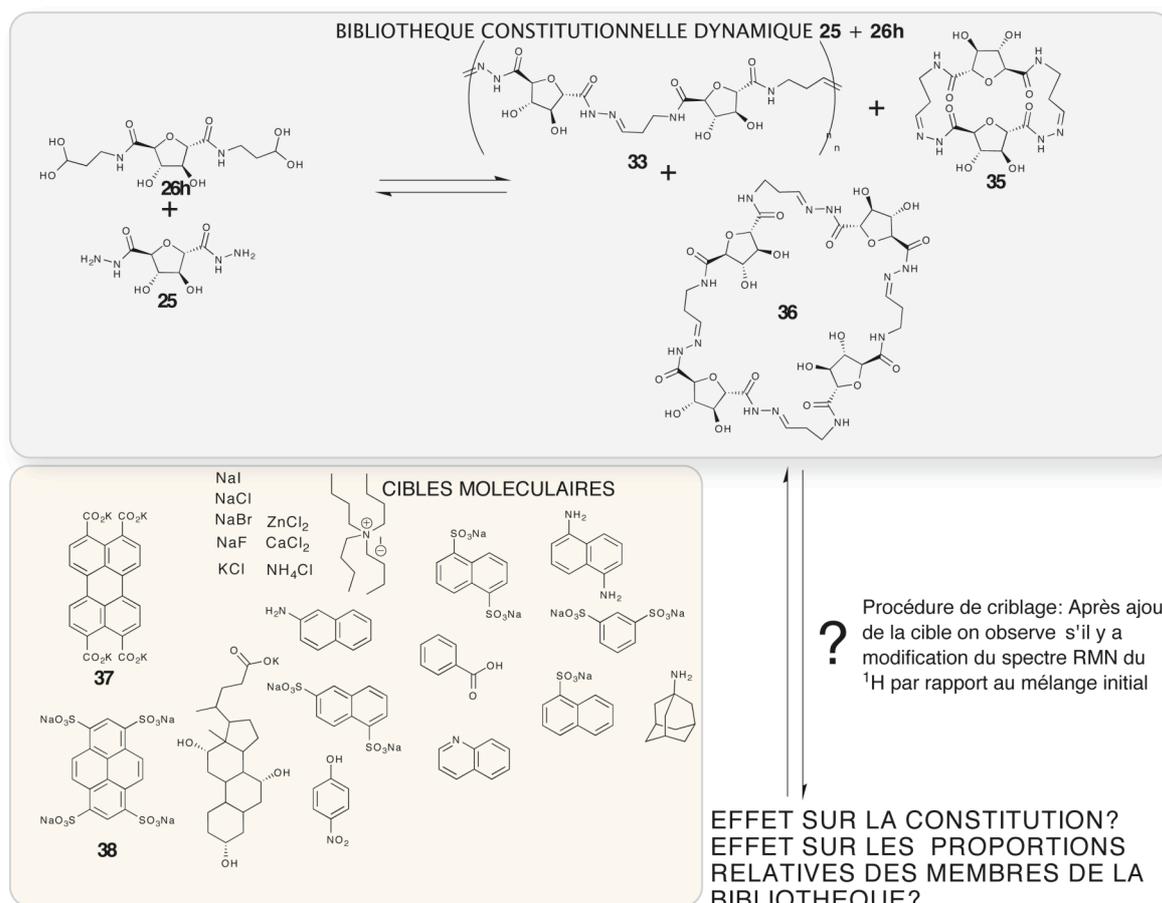


Schéma II4: Criblage de la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h** par introduction d'une molécule cible dans la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h**. Les espèces macrocycliques **35** et **36** ont été observées par spectrométrie de masse MALDI. Les cibles moléculaires ayant un effet majeur sur le spectre RMN du ¹H mélange sont les anions aromatiques **37** (PeTC) et **38** (PyTS).

Les effets les plus forts ont été observés pour le pyrene-1,3,6,8-tetrasulfonate de sodium 38 (PyTS), et pour le perylene tetracarboxylate de potassium 37 (PeTC).

Si on compare le spectre RMN de la bibliothèque de départ (Figure II18 **A**), avec celui de la bibliothèque équilibrée en présence du PyTS **38** (Figure II18 **B** signal 1), on constate un net blindage des signaux imine (Figure II18 **B** signal 2) ainsi qu'une simplification des signaux dans la région du spectre qui correspond aux protons des cycles furanoses. 4 singulets (dont 2 se chevauchent) deviennent majoritaires (Figure II18 **B** signaux 3), ce qui pourrait correspondre à un oligomère cyclique symétrique, étant donné que la signature de chaque unité monomérique dialdéhyde ou bis-hydrazide correspond à deux singulets en RMN du ¹H. Un composé cyclique symétrique devrait être observé comme 4 singulets quelle que soit sa taille, alors que, pour oligomère linéaire de même degré de polymérisation, on devrait obtenir un spectre plus complexe. En effet, même si un dimère linéaire pourrait apparaître en RMN du ¹H comme 4 singulets, un oligomère linéaire plus long donnera au moins 6 singulets non équivalents.

Après ajout du PeTC **37** (Figure II18 **C** signaux 5) à la bibliothèque, on observe des déplacements chimiques similaires (Figure II18 **C** signal 6), mais de moindre importance, c'est pourquoi nous nous sommes d'abord concentrés sur l'effet du PyTS **38** sur la bibliothèque **25+26h**.

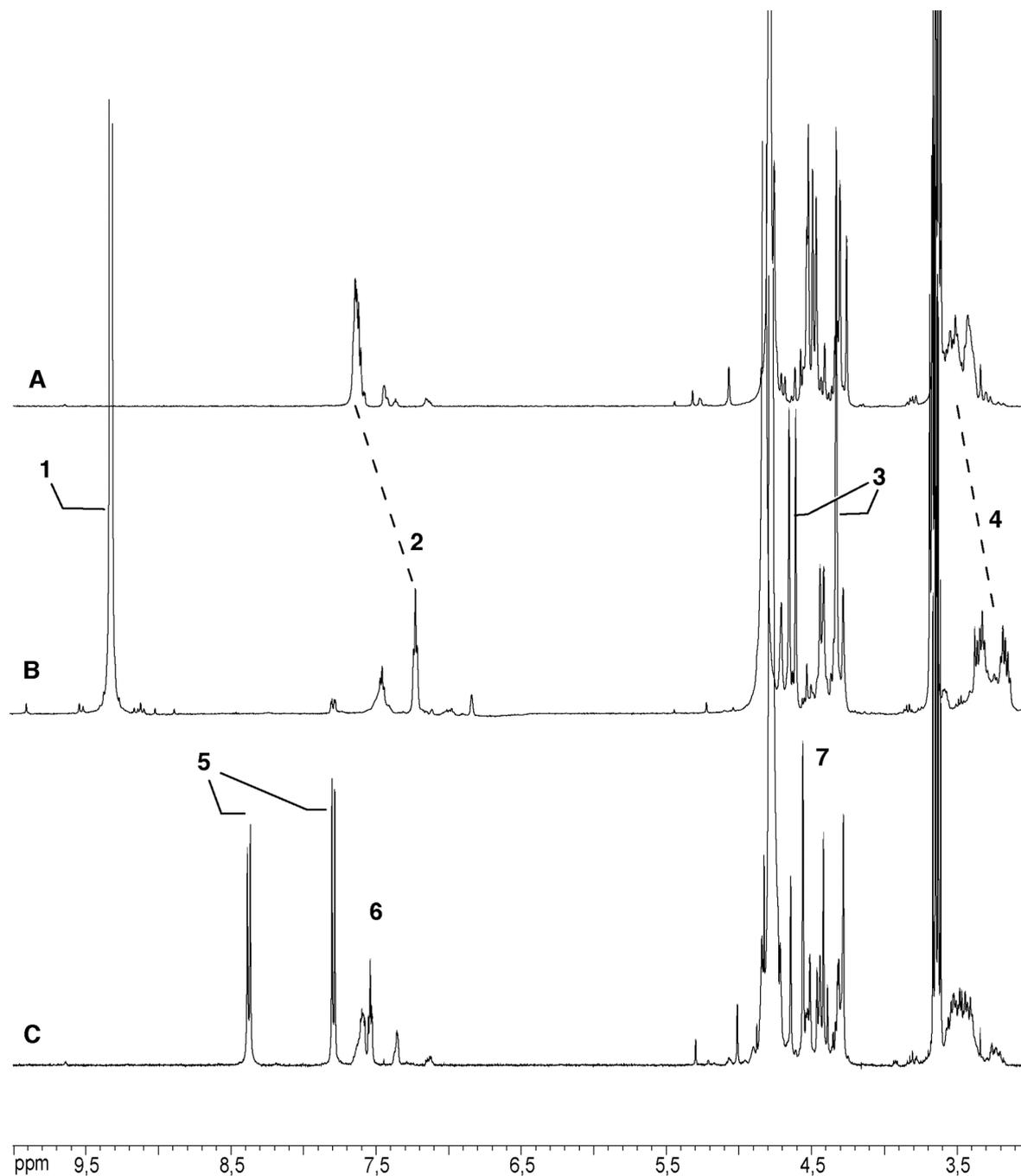


Figure II18: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque combinatoire dynamique seule à une concentration de 25 mM à pD= 5. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque en présence du PyTS **38** (50 mM, signal 2), temps d'équilibration 30 min. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque en présence du sel de sodium du PeTC **37** (50 mM, signaux 5), temps d'équilibration 72h.

Le blindage des signaux imines 2 et 6 Figure II18 suggère la proximité entre les cycles aromatiques du PyTS et du PeTC, et les fonctions imines de certains membres de la bibliothèque. En effet, il est connu que pour les composés aromatiques cycliques, comme le

[18]annulène par exemple, le courant de cycle induit par le champ magnétique du spectromètre RMN entraîne un déblindage des signaux des hydrogènes à l'extérieur du cycle et un blindage des protons se trouvant à l'intérieur du cycle, là où les lignes de force magnétique induites s'opposent au champ de l'aimant du spectromètre B_0 .²¹(Schéma II5)

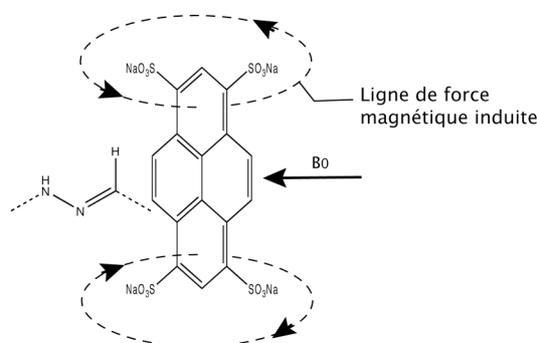


Schéma II5: Représentation schématique pour expliquer le blindage par effet de courant de cycle des signaux ^1H RMN des fonctions imines de certains membres de la bibliothèque **25+26h** en présence de PyTS.

Identification du composé amplifié

Il est donc clair qu'au moins un des membres de la bibliothèque **25+26h** interagit avec la molécule cible **38**. Comme l'introduction du PyTS entraîne des nombreux déplacements des signaux en RMN du ^1H , il est impossible de les assigner et de corrélérer leur intensité avec les proportions relatives des membres de la bibliothèque avec et sans cible. De plus, il n'a pas été possible d'isoler et de caractériser les différents oligomères, cycliques ou non, sous forme d'acylhydrazone. Ces composés ne portant pas de chromophores, leur analyse HPLC ("High Performance Liquid Chromatography") est problématique, et leur caractère réversible implique leur tendance à se dissocier et à se recombinaison si on tente de les isoler.

C'est pourquoi nous avons décidé de réduire les fonctions réversibles acylhydrazones en fonction acylhydrazines, qui elles ne sont plus hydrolysables. Le réactif qui a été utilisé est le borohydrure de sodium NaBH_4 , un agent réducteur utilisable en milieu aqueux à pH basique.

Nous avons réduit un échantillon de la bibliothèque **25+26h** équilibrée en présence de 2 équivalents de PyTS par rapport aux réactifs de départ **25** et **26h**. L'addition de l'agent réducteur NaBH_4 en excès (10.4 eq. par rapport à **25** et **26h**) entraîne une augmentation immédiate du pD de la solution à une valeur de 9, ce qui fige la constitution de la bibliothèque. La réduction est achevée en quelques minutes (25 min) et peut être suivie par la disparition des signaux attribués aux acylhydrazones.

²¹ Identification Spectrométrique de Composés Organiques. Silberstein, Basler et Morill. Editions *de Boeck* 1998.

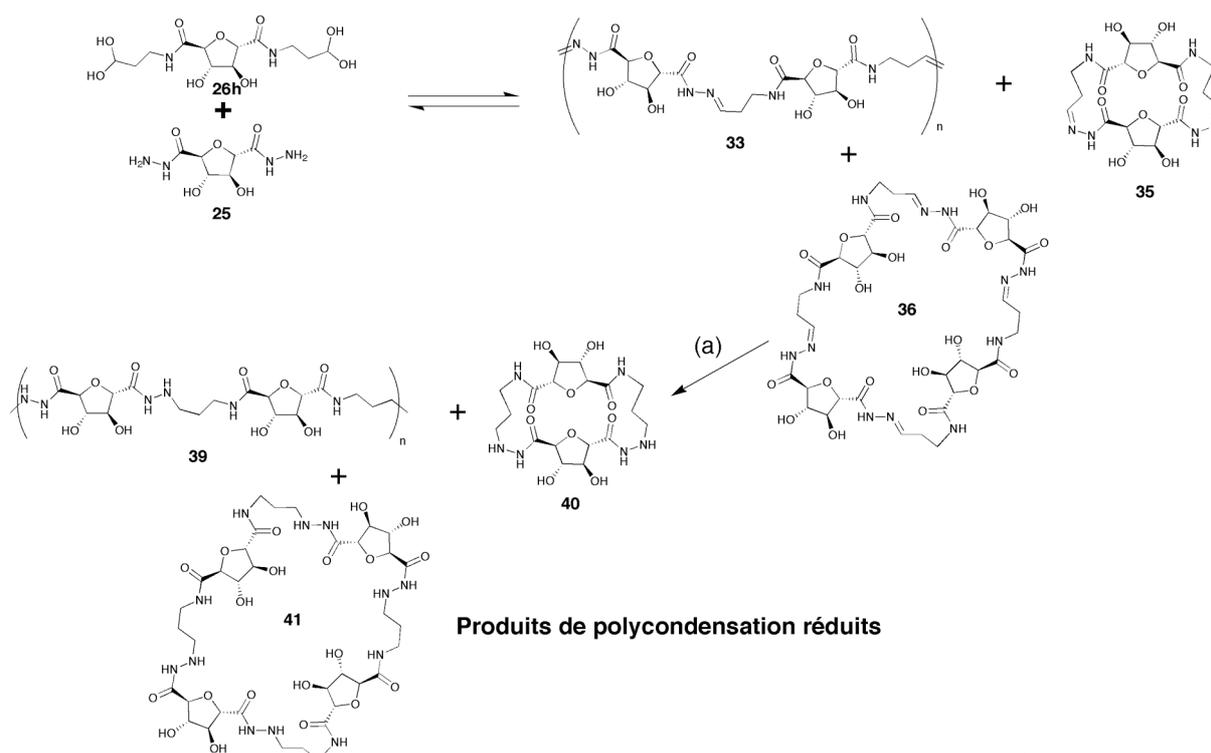


Figure II19: Suppression des équilibres entre acylhydrazones par réduction de la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h** avec NaBH_4 . Pour 1 ml de solution de **25+26h** à 25 mM dans D_2O : (a) i) NaBH_4 10 mg, 1 h; ii) d_4 -acetic acid, 30 μL , 1h.

Après destruction de l'agent réducteur en excès par acidification du milieu réactionnel avec de l'acide acétique deutéré on peut étudier le spectre RMN du ^1H de la bibliothèque réduite après équilibration avec la cible et tenter d'isoler le composé majoritaire. (Figure II20)

Purification du composé majoritaire sous forme réduite: Séparation du mélange par HPLC préparative.

Différentes techniques de séparations chromatographiques ont été testées pour isoler les différents composants de la bibliothèque réduite. La chromatographie sur gel de silice n'est pas adaptée à cause de la polarité très importante des composés à séparer. La "flash" chromatographie sur phase inverse type C18 n'a également pas donné de bons résultats. Les premiers résultats encourageants ont été obtenus par chromatographie d'exclusion stérique sur gel *Sephadex G25*, mais même après plusieurs colonnes successives, le produit amplifié majoritairement n'a pu être isolé sous forme pure. On réussit à enrichir le mélange en produit souhaité, mais une séparation complète n'a pas pu être obtenue par cette méthode.

Pour parvenir à une purification optimale du composé majoritaire du mélange réduit, une combinaison de purifications sur colonne échangeuse d'ion et d'HPLC préparative sur phase inverse C18 ont été nécessaires.

Les premiers essais de séparation par HPLC préparative de la bibliothèque réduite en présence de PyTS ont été rendus difficiles par le fait que le coefficient d'absorption UV de la cible est nettement supérieur à celui des produits de polycondensation ne portant pas de chromophores.

En présence du PyTS la réponse UV (260 nm) des produits de polycondensation est difficilement observable, et pour les détecter il a fallu retirer la cible du mélange. Le PyTS étant un tétra anion, le passage du mélange sur une colonne échangeuse d'anion de type *Dowex 21K Cl* permet de le séparer des produits de polycondensation de manière très efficace. En effet, l'affinité d'un ion pour une résine chargée étant directement liée à sa densité de charge, le tétraanion PyTS a une plus grande affinité pour la résine que les ions chlorure présents comme contre ions à l'origine sur la colonne. Après passage sur une colonne *Dowex 21K Cl* on obtient un mélange des produits de polycondensation réduits et de chlorure de sodium.

Ce mélange complexe est ensuite purifié par HPLC préparative (Gilson) à l'aide d'une colonne de type C18 (Eclipse XFB-C18 9,4 mm x 25 cm). La lecture de l'absorption UV à 260 nm permet de collecter différentes fractions qui sont ensuite analysées par spectrométrie de masse et RMN du ¹H. L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution nous a permis d'identifier avec certitude les fractions contenant les macrocycles **40** et **41**.(Figure II21) Celles-ci ont été isolées et comparées au spectre de la bibliothèque réduite en présence de PyTS.(Figure II20)

Pour pouvoir comparer le spectre de la bibliothèque **25+26h** réduite et celui de la bibliothèque **25+26h** réduite après avoir été équilibrée en présence de cible, il faut prendre en compte le fait que le PyTS interagit avec différents membres de la bibliothèque, ce qui entraîne des déplacements chimiques des signaux des espèces en question par rapport aux déplacements chimiques en solution sans cible. Ce phénomène est flagrant si on compare le spectre RMN du ¹H du composé **41** en présence de PyTS et celui du composé **41** seul en solution dans le D₂O.(Figure II20 C) Un déplacement important (blindage) des signaux 5, 6, 7 et 8 de **41** est observé après ajout de PyTS.(Figure II20 B)

Cette comparaison nous a permis d'identifier le composé majoritaire de la bibliothèque réduite comme étant le macrocyclique à deux unités monomériques 41. D'après l'intensité des signaux attribués à 41 dans la bibliothèque 25+26h réduite (signaux 1-8 Figure II20 A) on peut conclure que l'espèce majoritaire dans la bibliothèque non réduite 25+26h est le macrocycle 36.

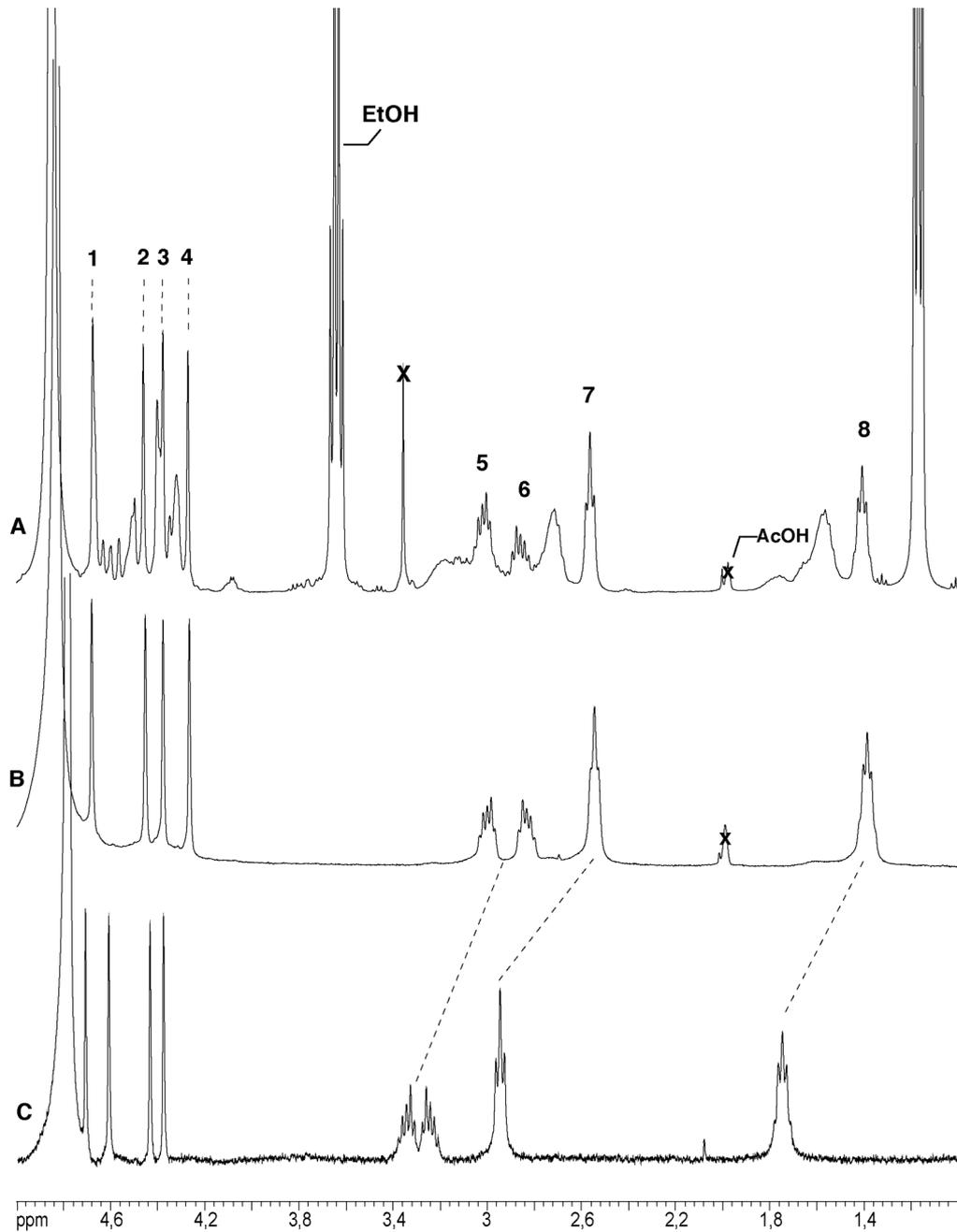


Figure II20: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O, 25 mM) de la bibliothèque **25+ 26h** réduite. Les signaux 1-8 sont attribués à **41** par comparaison avec le spectre **B**. **B** Spectre RMN ¹H (D₂O) du composé **41** en présence de PyTS (50 mM) à pD= 7. **C** Spectre RMN ¹H du composé macrocyclique **41** en solution dans D₂O.

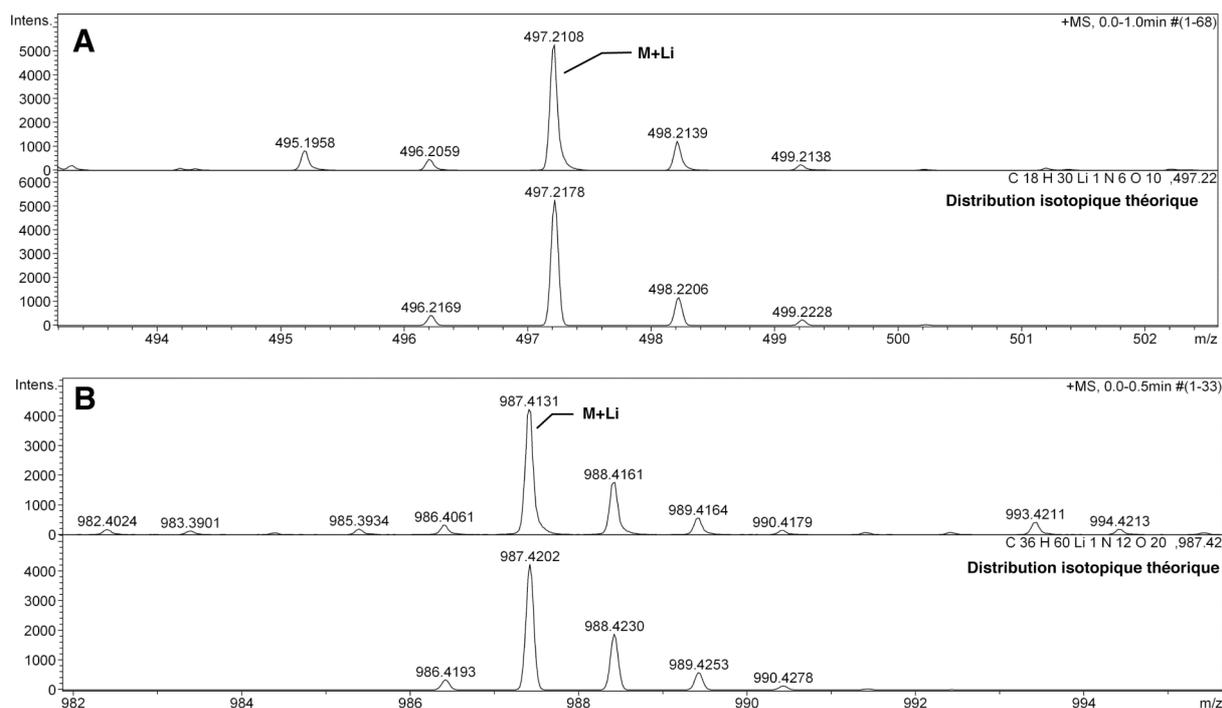


Figure II21: A Spectre de masse du composé **40** (Electrospray Haute Résolution). **B** Spectre de masse du composé **41** (Electrospray Haute Résolution). Le Li⁺ est présent à l'états de traces dans le verre contenant les échantillons et n'a pas été rajouté dans ceux -ci.

Experiences de RMN 2D sur la bibliothèque en présence de la cible.

L'espèce majoritaire dans la bibliothèque **25+26h** en présence de deux équivalents de PyTS étant identifiée comme étant le macrocycle **36** nous avons cherché à savoir si l'amplification observée résulte d'interactions entre le PyTS et **36**.

Il a tout d'abord fallu attribuer les signaux appartenant à **36** dans le spectre RMN du ¹H de la bibliothèque **25+26h** non réduite, et ensuite déterminer s'il y a formation d'un complexe entre **36** et le PyTS, la formation d'un complexe se traduisant par une proximité dans l'espace entre les protons du PyTS et ceux de **36**.

Une expérience ROESY sur le mélange précédent permet de répondre à ces questions. Cette expérience de RMN à 2 dimensions est basée sur l'observation de l'effet NOE entre protons. Cet effet s'opère à travers l'espace entre les protons non liés et décroît selon l'inverse de la sixième puissance de la distance qui sépare les noyaux dans l'espace. Il se traduit par une augmentation du signal d'un proton lorsqu'un proton voisin est irradié à sa fréquence de résonance. Cette augmentation apparaît alors comme une tache de corrélation sur le spectre ROESY en deux dimensions.(Figure II22) L'observation d'une corrélation entre deux protons implique que la distance qui les sépare est inférieure ou égale à 4 Å.²⁰

Une expérience de ROESY a été conduite sur un échantillon de la bibliothèque **25+26h** en présence de deux équivalents de PyTS. D'après les indications fournies par les études RMN ^1H et RMN ROESY on peut proposer que le PyTS se lie au composé macrocyclique **36** par la formation d'un complexe d'inclusion. (Schéma II6)

Le signal correspondant aux protons imines de l'espèce majoritaire est facilement identifiable. (Figure II22 signal B) Ce signal à 7,2 ppm nous a servi ensuite de point de départ pour l'attribution des autres signaux de **36**. La présence de corrélations entre les signaux imines de **36** et les protons aliphatiques (Figures II22 et II23 tache de corrélation [B,J] et [B,H]) et les 4 singulets majoritaires dans la zone des protons des cycles furanoses (Figures II22 et II23 taches de corrélation [B,D] et [B,F]) permet de confirmer que tous ces signaux peuvent être attribués à une seule et même espèce. Par contre il n'a pas été possible d'attribuer sans ambiguïté les signaux des cycles furanoses à l'une ou l'autre unité monomérique.

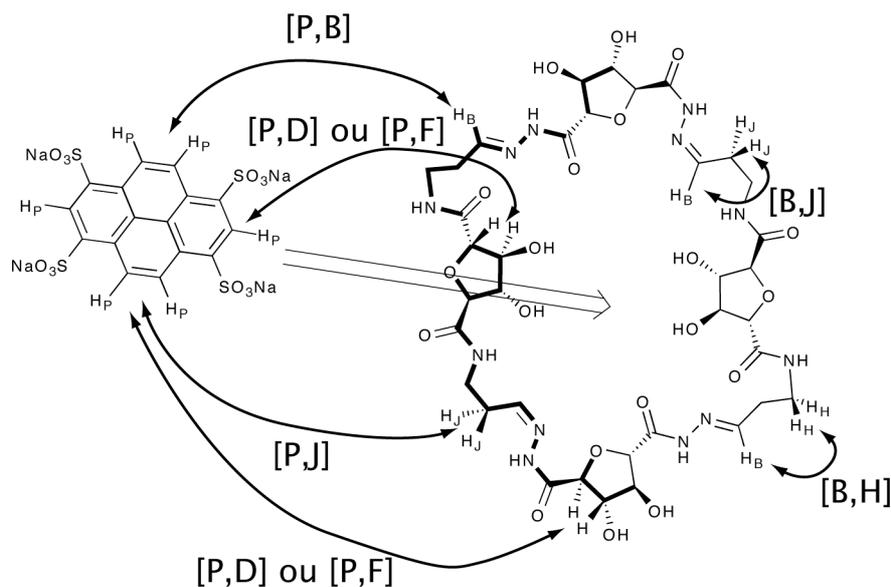


Schéma II6: Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion entre le PyTS et le composé **36**. Les corrélations ROESY sont indiquées par des flèches référencées par leur référence attribuée dans les figures II22 et II23. Les indices des protons sont également les mêmes que les références des signaux qui leurs sont attribués figures II22 et II23.

Les interactions entre **36** et la cible moléculaire PyTS sont révélées par les corrélations dans l'espace entre les protons du PyTs (H_P schéma II6) et les protons imines (H_B schéma II6, Figure II22 tache de corrélation [P,B]), les protons des cycles furanoses (Figure II22 signaux D et F, taches de corrélation [P,D] et [P,F]) et les protons des chaînes aliphatiques de **36** (Figure I22 signaux H_J schéma II6, tache de corrélation [P,J]).

Ces taches de corrélation permettent d'affirmer que les fonctions imines, les hydrogènes des cycles furanoses, et les chaînes aliphatiques de **36** se trouvent en moyenne à une distance inférieure ou égale à 4 Å de la molécule cible PyTS. Il s'agit là d'une preuve supplémentaire (qui s'ajoute à l'effet de blindage par courant de cycle énoncé plus haut page 87) en faveur de la formation d'un complexe d'inclusion entre **36** et le PyTS similaire à un complexe entre une cyclodextrine et une molécule organique amphiphile.²²

Cette expérience ROESY (Figures II22 et II23) montre également l'existence d'une deuxième espèce interagissant avec le PyTS. La tache de corrélation [P,A] (Figure II22) met en évidence que les fonctions imines (Figure II22 signal A) d'au moins un composé inconnu sont en contact avec les protons du PyTS. Les corrélations entre ce signal d'imine A et les 4 singulets les plus intenses à l'exception des signaux attribués à **36** permettent d'affirmer que cette espèce inconnue est la deuxième espèce majoritaire de la bibliothèque **25+26h**. (Figure II22 signaux C, E, G, taches de corrélations [A,C], [A,G] et [A,E]) On constate également des corrélations entre le signal A et des signaux aliphatiques correspondant aux protons en α de la fonction imine (Figure II22 tache de corrélation [A,I]) et en α de l'azote de la fonction amide de l'espèce inconnue. (Figure II22 tache de corrélation [A,H]) La complexité du spectre de la bibliothèque ne permet pas de quantifier le rapport de concentration entre **36** et cette espèce inconnue avec précision. Le signal A apparaît sous la forme d'un multiplet large, ce qui ne permet pas de l'attribuer à une seule espèce. Pour déterminer le ratio des concentrations entre **36** et l'espèce inconnue il faudrait pouvoir intégrer les signaux C et D ou E-G et F séparément, mais ceux-ci se recouvrent partiellement. Une expérience de RMN à Haut Champs (600-700 MHz) devrait permettre de répondre à ces questions. L'hypothèse selon laquelle cette deuxième espèce serait le macrocycle **35** ou un macrocycle plus grand n'a pas pu être vérifiée pour l'instant.

²² Cf. Chapitre I: Introduction pages 51 et 52.

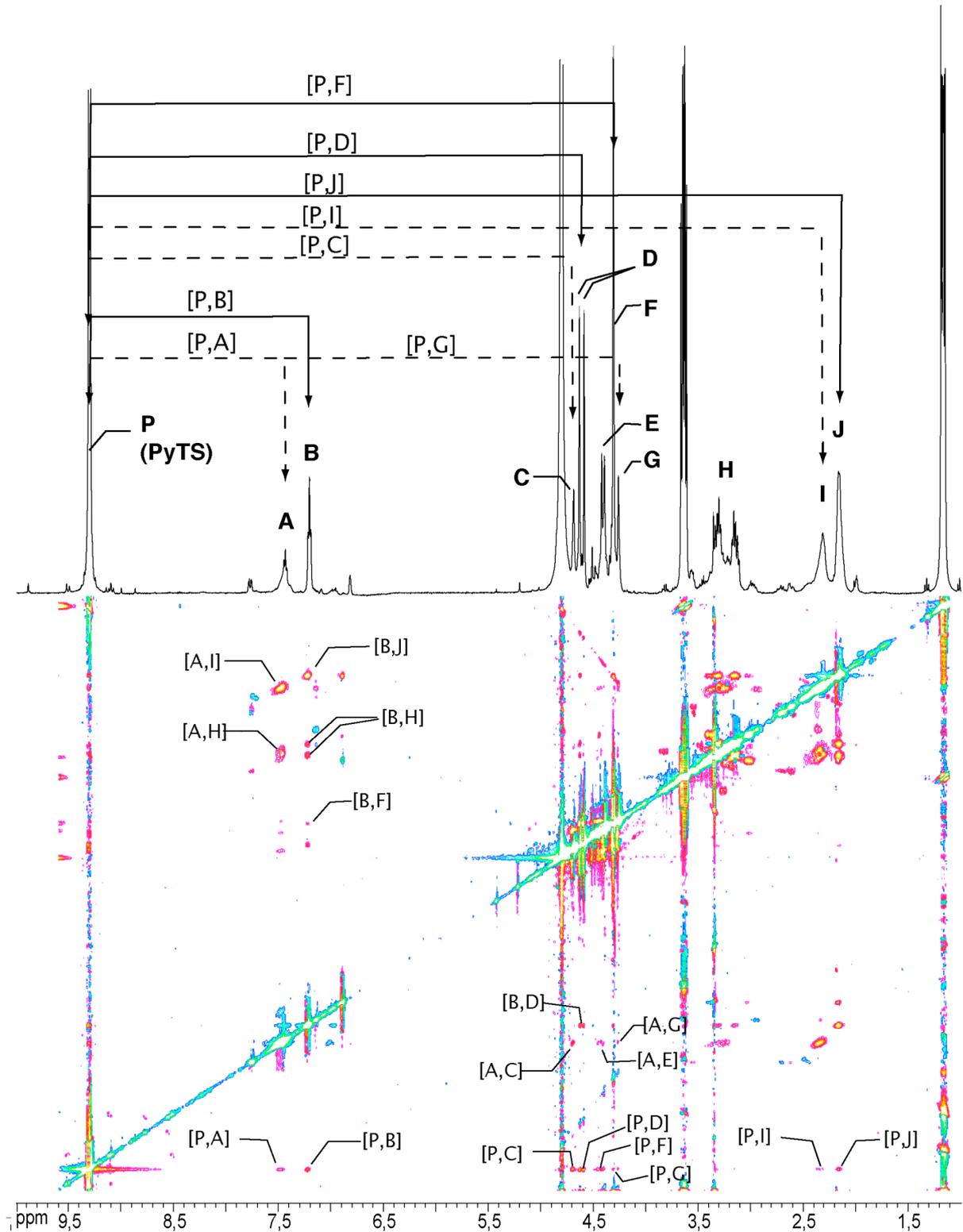


Figure II22: Spectre RMN 2D ROESY (D₂O) de la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h** (concentration en monomères 25mM) en présence de PyTS (50mM) à pD=5. Le spectre RMN du ¹H présenté en haut facilite la lecture du spectre ROESY et regroupe les attributions des corrélations [P,X] et des signaux correspondants, ces références étant utilisées dans le schéma II6 et le texte. Les corrélations [A,X] et [B,X] sont attribuées Figure II23 et Schéma II6.

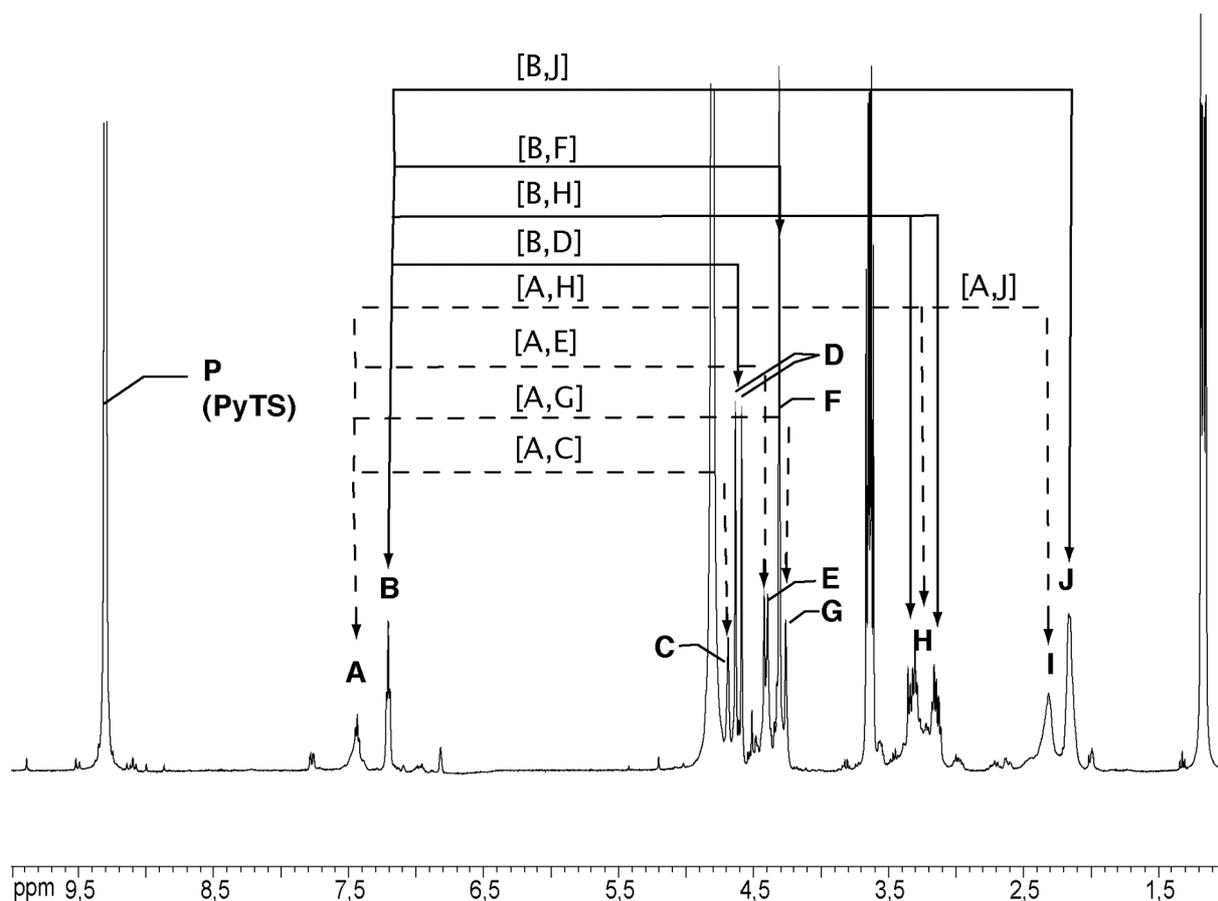


Figure I123: Attribution des signaux et des corrélations ROESY pour le spectre RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque **25+26h** (25 mM) en présence de 2 eq. de PyTS (50 mM) et pD= 5. Les corrélations ROESY indiquées par des flèches numérotées sont indiquées sur la figure I122.

Mise en évidence de l'adaptation constitutionnelle dans la bibliothèque après ajout de la cible PyTS.

La cible se lie donc préférentiellement au composé macrocyclique **36**. D'après les indications fournies par les études RMN ^1H et RMN ROESY on peut proposer que le PyTS se lie au composé macrocyclique **36** par la formation d'un complexe d'inclusion. Il reste à prouver que la formation de ce complexe entraîne bien une modification constitutionnelle de la bibliothèque **25+26h**, c'est-à-dire, une amplification du ou des meilleurs ligands. D'après les résultats précédents, tout laisse à croire que le macrocycle **36** est le meilleur ligand pour le PyTS.

Une manière simple de prouver ce phénomène serait de corrélérer l'intensité des signaux attribués à **36** dans la bibliothèque avec la concentration en PyTS. L'amplification, ou autrement dit la proportion de l'espèce **36** par rapport aux autres membres de la bibliothèque devrait suivre l'augmentation de la concentration en PyTS.

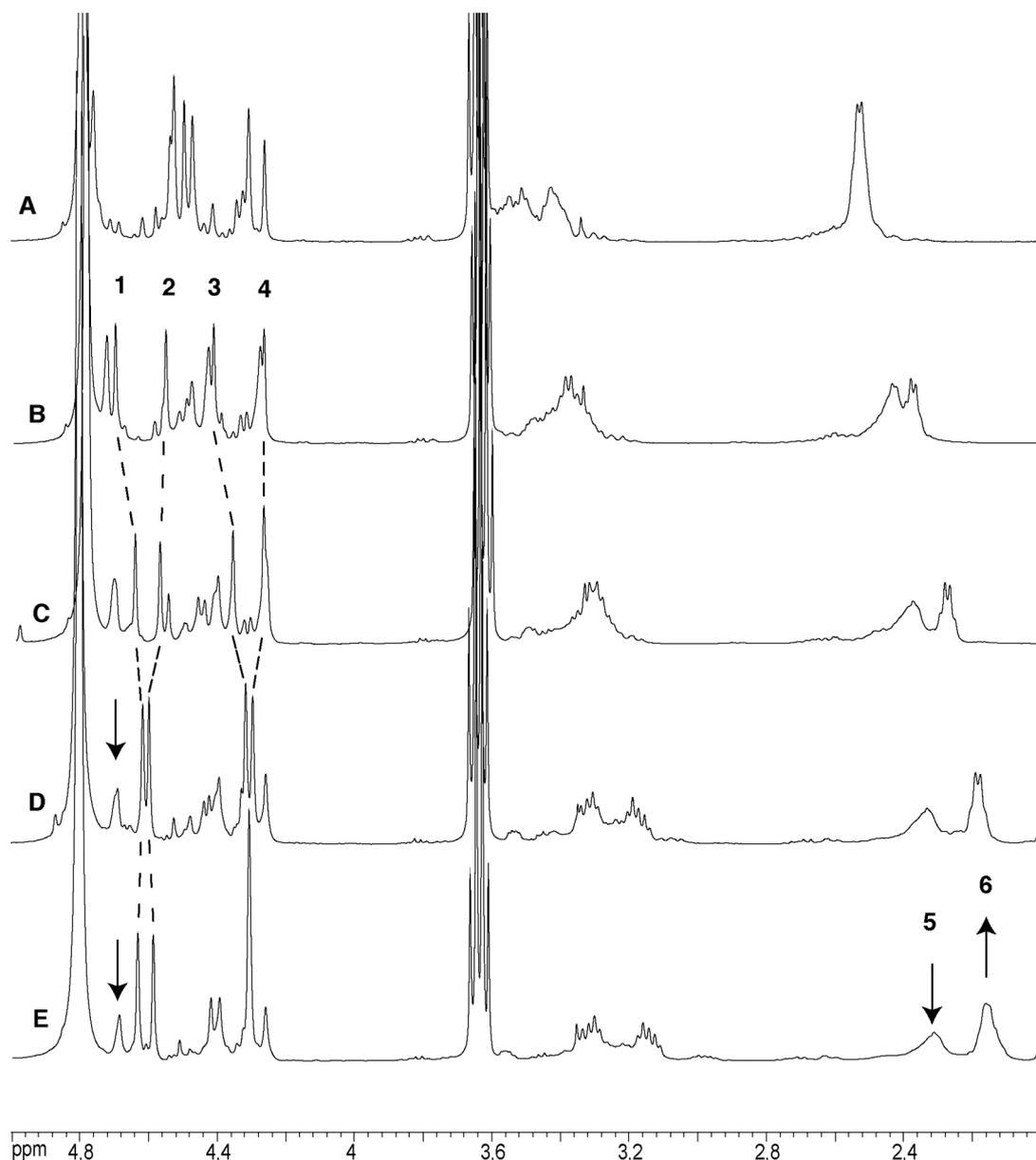


Figure II24: Titrage de la bibliothèque **25+26h** RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque **25+26h** par le PyTS à 25 mM et $\text{pD}=5$. Spectre **A**: **25+26h**; spectre **B**: **25+26h**+0,25 eq. PyTS; spectre **C**: **25+26h**+0,5 eq. PyTS; spectre **D**: **25+26h**+1 eq. PyTS; spectre **E**: **25+26h**+2 eq. PyTS.

Ayant attribué les signaux appartenant à **36** dans la bibliothèque **25+26h** en présence de PyTS (2 équivalents) nous avons fait varier la concentration en PyTS et tenté de suivre l'évolution de l'intensité de ces signaux.(Figure II24) Si on se concentre sur la région du spectre RMN du ^1H correspondant aux signaux des protons des cycles furanoses on constate que l'intensité des 4 singulets attribués à **36** (Figure II24 signaux 1, 2, 3, 4) augmente avec la concentration en PyTS. On constate également un net déplacement de ces signaux lors de l'accroissement de la concentration en PyTS. Mais la complexité du spectre de la bibliothèque rend difficile la quantification de la proportion en **36** par rapport aux autres membres de la bibliothèque en se basant sur l'intégration de ces signaux.

L'augmentation de l'intensité des signaux 6 (protons en α des imines de **36**) par rapport au signal 5 (protons en α des imines d'une partie des membres de la bibliothèque) est notable. (Figure II24) Mais, ces signaux étant larges, ils se chevauchent ce qui empêche de déterminer avec précision leurs intégrations relatives.

Par contre, dès l'ajout de PyTS, le blindage par effet de courant de cycle entraîne un déplacement net du pic des protons imines de **36** vers les champs forts (Figure II25 signal 1). Ce déplacement fait apparaître ce signal sous la forme d'un triplet bien défini et ne se chevauchant pas avec les autres pics d'imines des composants du mélange (Figure II25 signaux 2, 3, et 4). De ce fait on peut déterminer la proportion relative de **36** par rapport aux autres membres de la bibliothèque, en faisant le rapport de la somme des intégrations de leurs signaux imines et celui de **36**. (Tableau II1 et Figure II25)

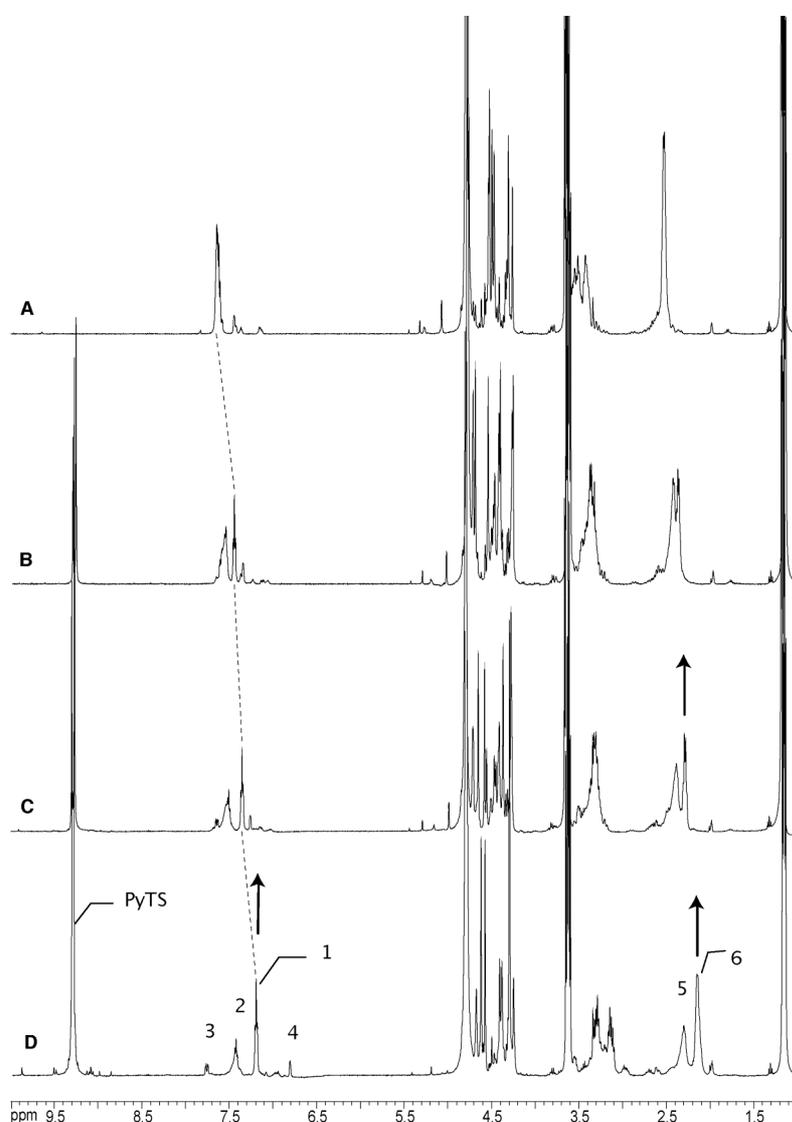


Figure II25: Titrage de la bibliothèque **25+26h** RMN du ^1H (D_2O) de la bibliothèque **25+26h** par le PyTS avec une concentration initiale en monomères de 25 mM et pD= 5. Spectre **A**: **25+26h**; spectre **B**: **25+26h**+0,25 eq. PyTS; spectre **C**: **25+26h**+0,5 eq. PyTS; spectre **D**: **25+26h**+1 eq. PyTS; spectre **E**: **25+26h**+2 eq. PyTS.

Tableau II1: Détermination de la proportion en macrocycle 36 en fonction de la quantité de PyTS dans la bibliothèque constitutionnelle dynamique 25+26h, à une concentration de 25 mM et pD= 5.

Quantité de PyTS	Somme des intégrations des signaux 2,3 et 4	Intégration du signal 1 (imines de 36)	Proportion relative de 1 par rapport à la somme des autres signaux	Concentration relative en macrocycle 36 par rapport à la bibliothèque 25+26h+0,25 eq. PyTS
0,25 eq.	1.00	0,40	29%	100%
0,5 eq.	1.00	0,52	34%	130%
1 eq.	1.00	0,74	43%	185%
2 eq.	1.00	0,81	45%	202%
4 eq.	1.00	0,89	47%	222%

Une autre preuve de ce changement constitutionnel peut être obtenue en déterminant la composition de la bibliothèque réduite après équilibration avec des quantités variables de PyTS. Cette méthode permet de remonter à la proportion de 36 après avoir déterminé celle de 41 dans le mélange réduit étant donné que 41 provient de la réduction de 36. Pour commencer nous avons réduit un échantillon de la bibliothèque 25+26h équilibrée seule ou en présence de différentes quantités de PyTS. Après destruction de l'agent réducteur en excès par acidification avec de l'acide acétique deutéré on peut étudier les spectres RMN du ¹H des bibliothèques réduites après équilibration avec ou sans cible.

Nous avons vu précédemment que pour pouvoir comparer les spectres de la bibliothèque après équilibration avec le PyTS et celle sans cible, il faut, après avoir gelé les équilibres par réduction des imines par NaBH₄, rajouter la même quantité de cible dans la bibliothèque 25+26h réduite.(Figure II20) Ainsi les déplacements chimiques associés aux interactions des membres de la bibliothèque avec la cible seront identiques dans les deux échantillons ce qui permet alors de corrélérer l'intensité et l'emplacement des signaux RMN du ¹H avec la concentration relative des constituants des deux mélanges.(Figure II26)

Comme nous l'avons observé précédemment pour 36 dans le cas de la bibliothèque 25+26h non réduite, après équilibration avec le PyTS, on constate bien une augmentation de l'intensité de 4 singulets dans la région des signaux correspondants aux cycles furanoses de 41(Figure II26 signaux 1, 2, 3, 4). Ces 4 singulets sont présents dans la bibliothèque initiale, ce qui veut dire que l'espèce amplifiée majoritairement 36 est déjà présente initialement dans la bibliothèque constitutionnelle dynamique. On constate également l'augmentation de l'intensité des signaux correspondant aux protons en α des fonctions hydrazines (Figure II26 signaux 5) et des fonctions amides (Figure II26 signaux 7) de 41.

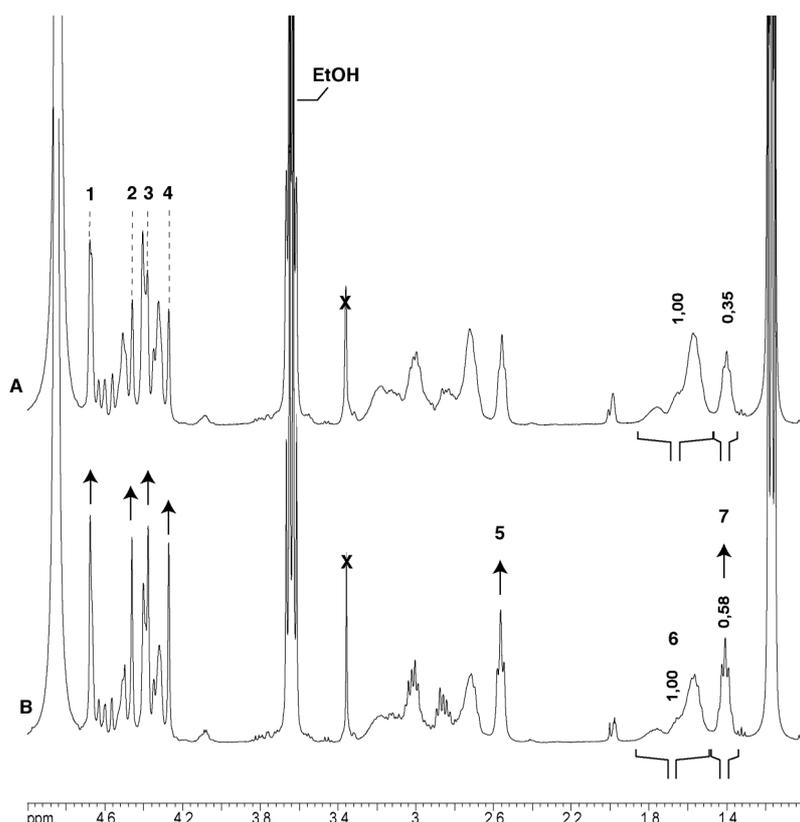


Figure II26: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O , 25 mM) de la bibliothèque **25+ 26h** réduite à laquelle on a rajouté le PyTS (50 mM). **B** Spectre RMN ^1H (D_2O , 25 mM) de la bibliothèque **25+26h** réduite après équilibre avec 2 eq. de PyTS à pD=5 (50 mM). Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans le texte.

Tableau II2: Dépendance de la quantité de 41 en fonction de la quantité de PyTS dans la bibliothèque constitutionnelle dynamique 25+26h réduite après équilibre à une concentration de 25 mM et pD=5.

Quantité de PyTS	Intégration des signaux 6	Intégration des signaux 7	Proportion de 41 par rapport aux autres membres de la bibliothèque	Concentration relative en macrocycle 41 par rapport à la bibliothèque initiale
Bibliothèque seule 25+26h (0 eq.)	1.00	0,35	26%	100%
0,25 eq. PyTS	1.00	0,36	26,5%	103%
0,5 eq. PyTS	1.00	0,42	30%	121%
1 eq. PyTS	1.00	0,55	35.5%	157%
2 eq. PyTS	1.00	0,59	37%	168%
4 eq. PyTS	1.00	0,58	37%	166%

En faisant le rapport des intégrations des signaux correspondants aux protons en α de la fonction hydrazine de l'espèce amplifiée **41** (Figure II26 signaux 7) et de ceux des autres membres de la bibliothèque (Figure II26 signaux 6) on peut chiffrer cette amplification à + 68% lorsque 2 équivalents de PyTS sont ajoutés à la bibliothèque.(Figure II26 Tableau II2) L'espèce possédant cette signature RMN devient majoritaire après ajout de deux équivalents de la cible PyTS.

Ce macrocycle 41 provenant de la réduction du composé macrocyclique 36 on peut en conclure que le composé amplifié majoritairement en présence de cible dans la bibliothèque 25+26h non réduite est le macrocycle 36.

Néanmoins, bien que les deux expériences conduites pour démontrer une amplification ont bel et bien démontré ce phénomène, il faut constater que les valeurs d'amplifications obtenues dans les deux cas ne sont pas en accord. L'amplification mesurée par intégration des signaux imines de **36** par rapport à tous les autres signaux imines des membres de la bibliothèque est plus élevée (jusqu'à +122% pour 4 eq. de PyTS) que celle mesurée par le rapport des intégrations des signaux aliphatiques de **41** par rapport à ceux des autres composants de la bibliothèque réduite (jusqu'à +66% pour 4 eq. de PyTS). On peut expliquer ce résultat par un biais résultant de la réduction des acylhydrazones en hydrazines qui fausserait les proportions des différentes espèces en équilibre, ou plus simplement par un manque de précision sur la mesure des intégrations sur des spectres RMN du ¹H complexes et dans lesquels les signaux se recouvrent partiellement. Pour régler définitivement cette question une expérience d'analyse HPLC de la bibliothèque non réduite est à envisager. En effet, même si les imines sont réversibles par hydrolyse, il a été montré que dans certaines conditions, pour des imines aromatiques, on peut ralentir les échanges de manière suffisante pour analyser directement, sans réduction, les proportions des membres d'une bibliothèque combinatoire dynamique par HPLC.²³ Dans notre cas cette technique demandera une optimisation car nous travaillons avec des acylhydrazones aliphatiques. Un inconvénient de notre système vient de l'absence de chromophore sur les monomères, mais on pourrait, par exemple, envisager une détection de type CAD ("Charge Aerosol Detector").²⁴ Ce type de détecteur est universel, ce qui faciliterait l'observation des pics correspondant aux membres de la bibliothèque.

Conclusions et perspectives:

La bibliothèque constitutionnelle dynamique d'analogues d'oligosaccharide **25+26h** donne accès à des analogues dynamiques d'oligosaccharides, dont certains étant cycliques, sont des analogues de cyclodextrines. Il a été montré que l'introduction d'une molécule organique amphiphile, le PyTS, capable de former un complexe d'inclusion avec un de ces

²³ Direct Composition Analysis of a Dynamic Library of Imines in an Aqueous Medium. S. Zameo, B. Vauzeilles, J.-M. Beau. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 24, 5441-5444.

²⁴ HPLC with charged aerosol detection for the measurement of natural product. K. Fukushima, Y. Kanedai, K. Hirose, T. Matsumoto, K. Hashiguchi, M. Senda, M. Senda, R. Mccarthy, D. Asa, H. P. Gamache, N. I. Acworth. *Chromatography* **2006**, 27, 83-86.

oligomères cycliques **36** peut entraîner l'amplification de ce dernier. Cette amplification a été observée et quantifiée par RMN du ^1H .

Le mode de liaison de cette cible avec le composé macrocyclique 36 a lui aussi été étudiée par RMN ROESY ce qui suggère la formation d'un complexe d'inclusion entre le macrocycle et la molécule organique amphiphile PyTS. On peut donc considérer que de par son mode de liaison, et de par son architecture basée sur des saccharides, le macrocycle 36 constitue un analogue dynamique de cyclodextrine.

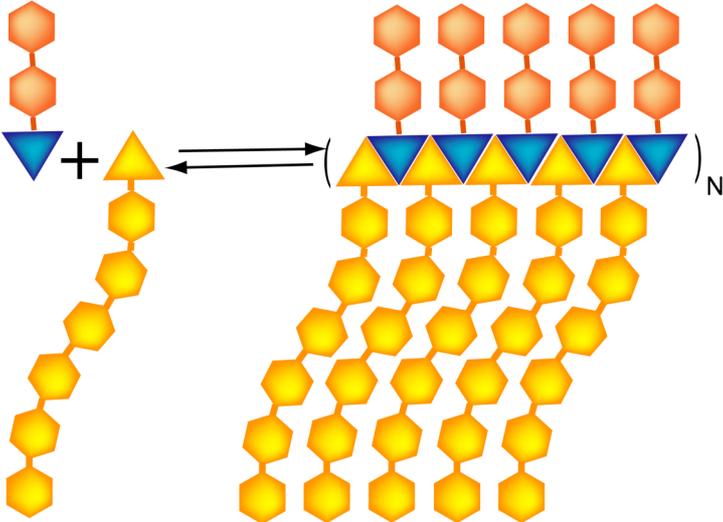
Bien que modeste, l'amplification observée reste néanmoins une preuve de principe, et est prometteuse pour le développement de futures bibliothèques constitutionnelles ou combinatoires dynamiques.

Etant donné l'importance des cyclodextrines dans le développement de récepteurs et de catalyseurs synthétiques²⁵ on peut espérer que notre approche pourra être appliquée à la découverte de nouveaux types d'analogues de cyclodextrines sélectionnés et amplifiés par la cible organique elle-même. On peut par exemple envisager de rendre la bibliothèque constitutionnelle dynamique **25+26h** combinatoire en y rajoutant d'autres monomères décorés avec d'autres groupements fonctionnels ayant des propriétés catalytiques par exemple (amines, acides aminés,...). La bibliothèque combinatoire dynamique ainsi obtenue pourra ensuite être testée par la même technique de criblage par RMN ^1H pour identifier si certains membres de cette bibliothèque sont capables de se lier aux cibles organiques choisies, ou de catalyser une réaction donnée comme l'hydrolyse d'un ester aromatique par exemple (l'hydrolyse du *p*-nitro benzoate de méthyle est par exemple fréquemment rencontré dans la chimie des cyclodextrines pour quantifier leur activité catalytique).

Il serait également intéressant de corréliser la taille des macrocycles amplifiés avec la taille des molécules cibles. Si notre hypothèse sur la formation d'un complexe d'inclusion est bonne, l'amplification d'un macrocycle plus grand ou plus petit devrait dépendre de l'utilisation d'une cible organique de taille et de forme différente.

²⁵ cf. Chapitre I: Introduction page 52.

CHAPITRE III GLYCOPOLYMÈRES DYNAMIQUES



Chapitre 3: Glycopolymères dynamiques

Les glycopolymères conventionnels

Les oligo- et polysaccharides sont impliqués dans un grand nombre de phénomènes biologiques et de pathologies.¹

Ces processus impliquent en particulier des interactions sucres-protéines (lectines). Ce type d'interaction étant en général faible, la nature utilise la multivalence pour en augmenter l'efficacité.² Les oligosaccharides impliqués dans des phénomènes de reconnaissance sont en général exposés à la surface de cellules ou de bactéries sous la forme d'agrégats ("clusters") multivalents.³ Le développement d'analogues synthétiques de ce type d'assemblage multivalent afin de mimer, voire d'accroître leur affinité pour leurs récepteurs naturels est donc du plus grand intérêt.⁴

Une des approches proposées est de greffer des résidus saccharides sur des unités polymérisables ou polymériques.⁵ (Schéma III1, Figure III1) On peut également mentionner le greffage de sucres sur des cyclodextrines⁶, des calixarènes⁷, et des assemblages supramoléculaires.⁸ D'autres approches ont également été présentées dans l'introduction (page 59).

¹ cf. Chapitre I: Introduction page 48.

² Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. M. Mammen, S.K. Choi, G. M. Whitesides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.

³ The Cluster Glycoside Effect. J. J. Lundquist, E. J. Toone. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555-578. b) Clusters, Bundles, Arrays and Lattices: Novel Mechanisms for Lectin-saccharide-mediated Cellular Interactions. C. F. Brewer, M. C. Miceli, L. G. Baum. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 616-622.

⁴ Model Systems for Studying Polyvalent Carbohydrate Binding Interactions. B. T. Houseman, M. Mrksich. *Top. Curr. Chem.* **2002**, 218, 1-44.

⁵ Synthetic Glycopolymers: An Overview. V. Ladmiral, E. Melia, D. M. Haddleton. *Eur. Pol. J.* **2004**, 40, 431-449.

⁶ a) Oligosaccharide Tagged β cyclodextrins: Synthesis and Biological Affinity toward Concanavalin A. N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J.-M. G. Fernandez, F. Djedaini-Pilard, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 57, 9-14. b) An Efficient Synthesis of Cyclodextrin-based Carbohydrate Cluster Compound. D. A. Fulton, J. F. Stoddart. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1113-1116

⁷ Macrocyclic Glycocusters: From Amphiphiles through Nanoparticles to glycoviruses. Y. Aoyama. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 588-593.

⁸ Self-assembled Multivalent Carbohydrate Ligands. Y.-B. Lim, M. Lee. *Org. Biol. Chem.* **2007**, 5, 401-405.

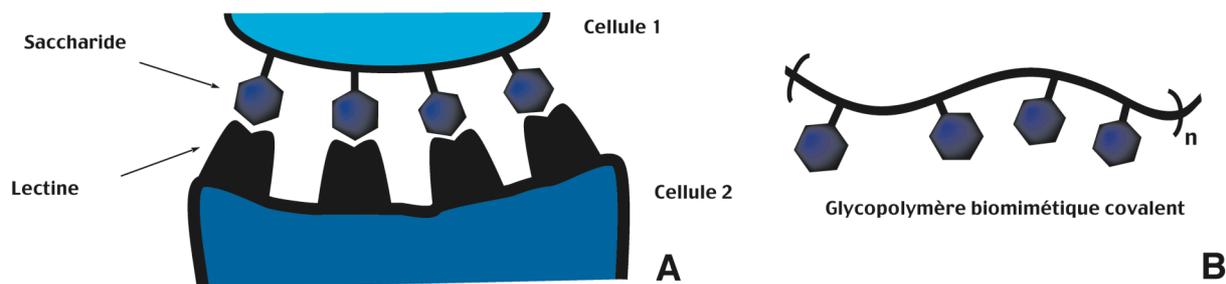


Schéma III1 : **A** Représentation schématique des interactions de type saccharides-protéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion entre deux cellules. L'adhésion résulte de la multiplication de ce type de contacts. **B** Principe des polymères biomimétiques portant des analogues de saccharides.

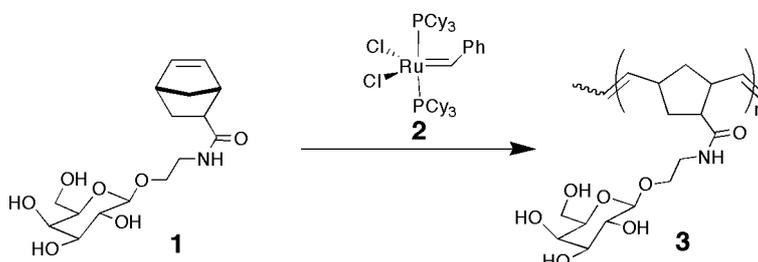


Figure III1 : Exemple de glycopolymère conventionnel **3** préparé par polymérisation par ouverture de cycle de **1** par métathèse d'oléfine à l'aide du catalyseur de Grubbs **2**. **3** a été utilisé pour induire l'agrégation de récepteurs chargés de la transduction du signal de déplacement cellulaire chez des bactéries.⁹

Description du projet et intérêt

Ce projet porte sur la préparation d'analogues dynamiques des glycopolymères conventionnels, non dynamiques. Il nous a semblé qu'un polymère à l'équilibre de ce type pourrait combiner les propriétés de biorecognition des glycopolymères avec les facultés d'adaptation des polymères dynamiques. Ce caractère adaptatif pourrait par exemple se traduire par la possibilité d'induire une réorganisation de la séquence ou de la constitution d'un glycopolymère en fonction de la présence d'une cible biologique donnée, ou en réponse à des stimulus physiques ou chimiques (température, pH, etc.). (Schéma III2)

⁹ Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2348-2368.

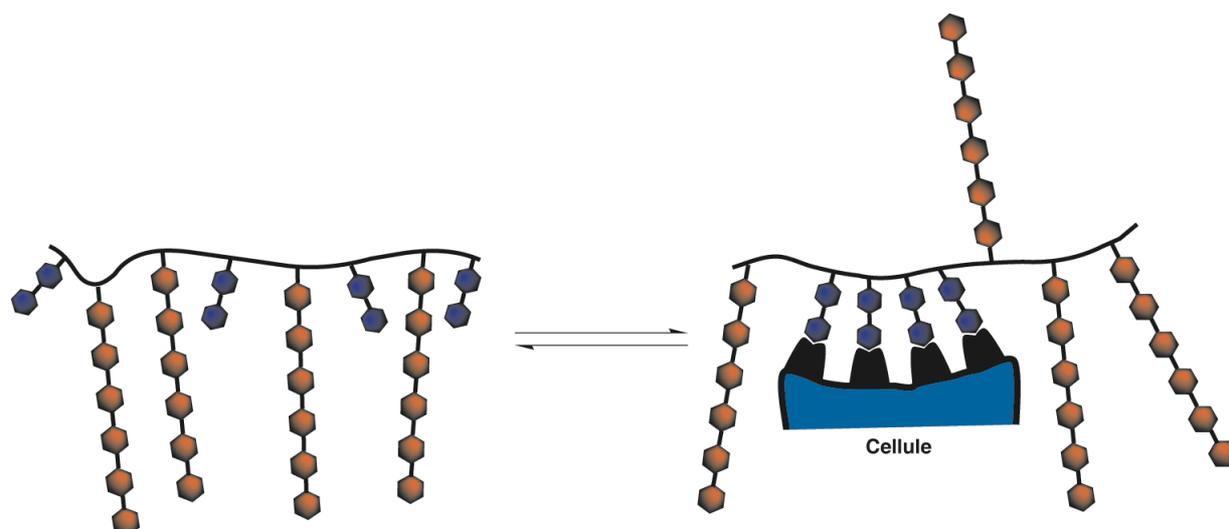


Schéma III2: Représentation schématique de la réorganisation de la séquence d'un glycopolymère dynamique en réponse à la présence d'une cible biologique favorisant localement des interactions multivalentes avec l'unité bio-active (en bleu).

Conception et synthèse

Conception des monomères

Nous avons tout d'abord défini les caractéristiques structurales les plus communes des glycopolymères classiques, puis nous les avons intégrées dans la conception d'un polymère dynamique avec les contraintes que cela implique, *i.e.* la nécessité de pouvoir étudier la composition des polymères par RMN du ^1H ou d'autres méthodes, la solubilité dans l'eau, et des conditions d'établissement des équilibres relativement douces en milieu aqueux.

Comme dans le chapitre précédent nous avons choisi de se baser sur la formation réversible d'acylhydrazone pour générer des polymères dynamiques par polycondensation d'acylhydrazides sur des aldéhydes en solution aqueuse.

Les glycopolymères conventionnels sont généralement obtenus après polymérisation de monomères fonctionnalisés par des oligosaccharides biologiquement actifs. Les chaînes de sucres jouent donc le rôle de chaînes latérales et n'interviennent pas dans la réaction de polymérisation en elle-même. Nous avons donc suivi la même approche dans la conception de nos monomères.

Les premiers monomères que nous avons préparés consistent tous en une unité aromatique dialdéhyde ou bis-hydrazide fonctionnalisée par une chaîne oligosaccharide. (Figure III2)

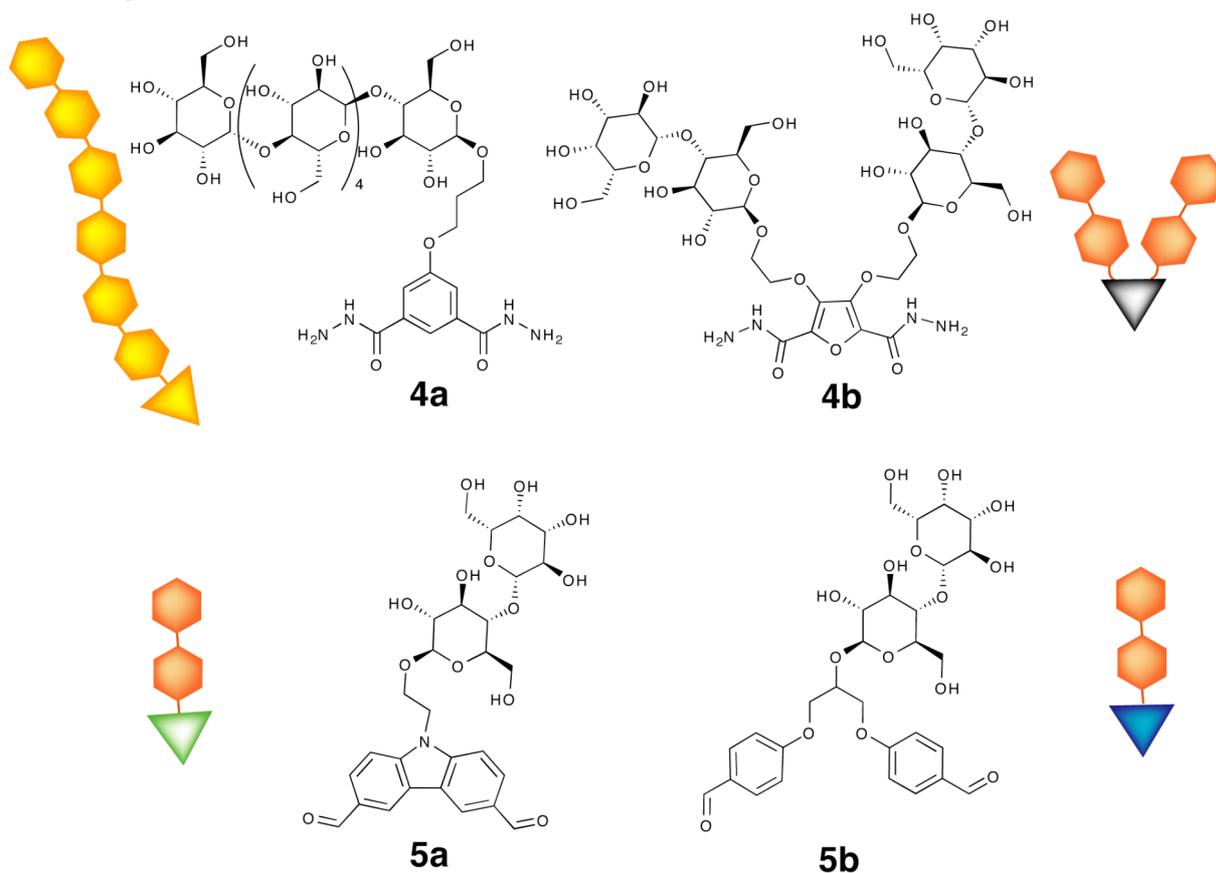


Figure III2: Structure moléculaire et représentation symbolique des monomères **4a**, **4b**, **5a**, **5b** utilisés pour la préparation de glycopolymères dynamiques de type polyacylhydrazone.

On s'attend à ce que la polycondensation des monomères bishydrazides, **4a** et **4b**, et dialdéhydes **5a** et **5b** conduite à la formation d'un polymère ayant une chaîne principale aromatique hydrophobe, solubilisée et décorée par des chaînes latérales oligosaccharides hydrophiles.

Les structures des noyaux aromatiques ont été choisies les plus différentes possibles les unes des autres afin de pouvoir suivre plus aisément la constitution du polymère par RMN du ^1H . La méthode la plus commode pour contrôler la composition d'un polymère polyacylhydrazone ou pour suivre une réaction d'échange est de se baser sur l'observation des signaux imines. En effet, ceux-ci se trouvent dans une région du spectre éloignée des signaux des protons aromatiques et aliphatiques des sucres. De plus, le déplacement chimique de ces signaux étant relativement sensible aux modifications structurales, on peut espérer que chacune des 4 combinaisons de monomères (**4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, **4b5b**) aura un signal d'imine ayant un déplacement chimique caractéristique. Ainsi les échanges pourront être suivis par exemple par l'apparition d'un nouveau signal d'imine propre à la combinaison de monomères nouvellement formée.

Le choix des chaînes latérales oligosaccharides s'est ensuite fait en fonction de leurs propriétés biologiques ou des propriétés structurales qu'elles pourraient conférer aux polymères.

Les monomères **4b**, **5a** et **5b** portent un ou deux groupements lactosyl qui est un des ligands naturels des galectines. Cette catégorie de récepteur protéique est impliquée dans un grand nombre de processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, le développement, l'apoptose, l'épissage des ARN (Acide RiboNucléique), et le développement des tumeurs et métastases dans certains cancers.¹⁰ En effet, il a été montré que le niveau d'expression de ces protéines est modifié dans les cellules tumorales. Par exemple la concentration en galectine-1 est anormalement élevée dans les cellules cancéreuses de la thyroïde ou de la prostate. D'autres lectines peuvent voir leur concentration diminuer dans d'autres types de cancers. Ces différents niveaux d'expression ont été corrélés avec le caractère invasif des métastases.

L'affinité des résidus lactose ou galactose pour leurs récepteurs biologiques a également été utilisée pour la synthèse de glycopolymères ayant des affinités particulières pour certaines toxines¹¹, cibles biologiques¹² ou des applications prometteuses comme vecteurs artificiels de gènes¹³ et de drogues.¹⁴

Le développement de nouveaux ligands pour les lectines est donc d'un intérêt crucial pour comprendre et réguler leur fonction cellulaire.

L'hexasaccharide, dérivé de l' α -cyclodextrine, porté par un dihydrazide **4a** est également connu pour interagir avec différentes lectines. Il aura pour fonction d'augmenter la solubilité du polymère en solution aqueuse tout en donnant un caractère biomimétique

¹⁰ a) Galectins as Modulators of Cell Adhesion. R. Colin Hughes. *Biochimie*, **2001**, 83, 667-676. b) Galectins and Cancer. A. Danguy, I. Camby, R. Kiss. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2002**, 1572, 285-293. c)

¹¹ Inhibitory Effects of Glycopolymer having Globotriose and/or Lactose on Cytotoxicity of Shiga Toxin 1. A. Miyagawa, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka. *Carbohydr. Polym.* **2007**, 67, 260-264.

¹² Synthesis and Properties of Biomimetic Poly(L-glutamate)-*b*-Poly(2-acryloyloxyethyl lactoside)-*b*-Poly(L-glutamate) Triblock Copolymers. Chang-Ming Dnong, Keith M. Faucher, Elliot L. Chaikof. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 5754-5765,

¹³ a) Lactose-Poly(ethylene Glycol)-Grafted Poly-L-Lysine as Hepatoma Cell-Targeted Gene Carrier. Y. H. Choi, F. Liu, J. S. Park, S. W. Kim. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 708-718. b) Lactose-appended Schizophyllan is a Potential Candidate as a Hepatocyte-targeted Antisense Carrier. T. Hasegawa, M. Umeda, T. Matsumoto, M. Numata, M. Mizu, K. Koumoto, K. Sakurai, S. Shinkai. *Chem. Commun.* **2004**, 382-383. c) Lactosylated Polyethylenimine for Gene Transfer into Airway Epithelial Cells: Role of the Sugar Moiety in Cell Delivery and Intracellular Trafficking of the Complexes. S. Grosse, Y. Aron, I. Honoré, G. Thévenot, C. Danel, A.-C. Roche, M. Monsigny, I. Fajac. *J. Gene Med.* **2004**, 6, 345-356.

¹⁴ A Carbohydrate-antioxidant Hybrid Polymer Reduces Oxidative Damage in Spermatozoa and Enhances Fertility. C. Flemming, A. Maldjian, D. Da Costa, A. K. Rullay, D. M. Haddleton, J. St. John, P. Penny, R. C. Noble, N. R. Cameron, B. G. Davis. *Nat. Rev. Chem. Biol.* **2005**, 1, 270-274.

supplémentaire aux polymères dynamiques qui l'incorporent. En effet, l'amylopectine est un polysaccharide naturel portant des chaînes latérales constituées de chaînes de résidus glucose liés par des liaisons de type $\alpha(1\rightarrow4)$.

Différents glycopolymères possédant des chaînes latérales similaires à celle gréffée sur **4a** ont été décrits dans la littérature. Ces glycopolymères sont basés sur la structure du polystyrène et possèdent des propriétés intéressantes notamment comme milieu de culture cellulaire¹⁵ ou comme agent de fixation de substances organiques ou inorganiques (iode).¹⁶ Il a été montré que ces glycopolymères adoptent une structure de type "goupillon" en solution dans l'eau.¹⁷ La conformation de ces polymères ressemble à celle d'une micelle cylindrique qui serait stabilisée par des liaisons covalentes, avec un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile. (Figure III3)

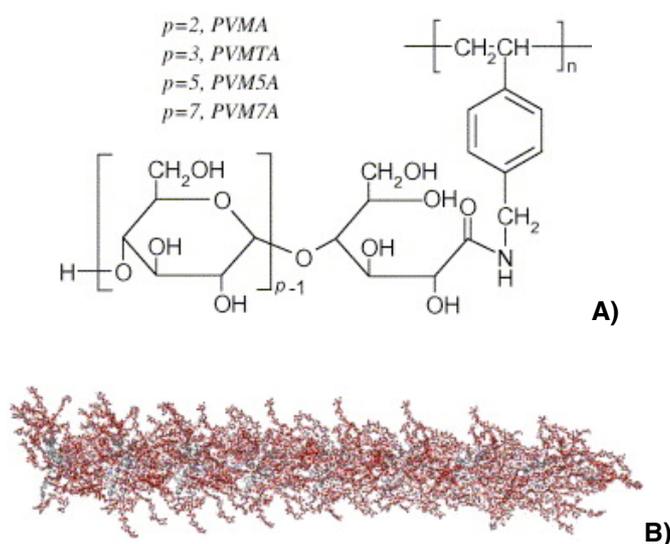


Figure III3: A) Exemples glycopolystyrènes portant des chaînes oligosaccharides. **B)** Modèle moléculaire de ce glycopolymère pour $p=7$. Cette structure a été confirmée par des analyses de "small-angle X-ray scattering".

La polycondensation des monomères **4a** et **4b** avec les dialdéhydes **5a** et **5b** pourrait donner lieu à la formation d'un polymère ayant une conformation semblable à celle représentée Figure III3. Dans cette conformation la chaîne principale hydrophobe serait complètement masquée par les chaînes latérales oligosaccharides. Cela serait une solution aux problèmes de solubilité des polyacylhydrazones rencontrés dans le chapitre précédent, car si la chaîne polyacylhydrazone est entourée d'une couronne de longues chaînes d'oligosaccharides, elle aura moins tendance à former des liaisons hydrogènes intermoléculaires responsables de la précipitation des polymères.

¹⁵ Enhanced Adhesion and Survival Efficiency of Liver Cells in Culture Dishes Coated with a Lactose-carrying Styrene Homopolymer. A. Kobayashi, H. M. Sumitomo. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1986**, 7, 645.

¹⁶ Synthesis and Functions of Polystyrene Derivatives Having Pendant Oligosaccharides. K. Kobayashi, H. Sumitomo, Y. Ina. *Polym. J.* **1985**, 17, 567-575.

¹⁷ Effect of the Carbohydrate Side-chain on the Conformation of a Glycoconjugate Polystyrene in Aqueous Solution. I. Wataoka, K. Kobayashi, K. Kajiwara. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 989-995.

Synthèse des monomères

La synthèse du monomère **4a** débute par une coupure par acétolyse¹⁸ de l' α -cyclodextrine protégée¹⁹ par des groupements acétates. Après une déprotection sélective de l'alcool anomérique donnant **7**²⁰, on prépare le dérivé trichloroacétimide donneur de glycosyl **8**.²¹ Celui-ci est ensuite soumis à une glycosylation dans des conditions douces selon la méthode de Schmidt²² avec l'alcool accepteur **12** obtenu lui par une réaction de Mitsunobu entre **11** et le 1,3-propanediol. Une suite de déprotection et de traitement par l'hydrazine fournit le monomère **4a**. (Figure III4)

¹⁸ Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 22) Synthesis of Cyclodextrin Analogues Containing a Buta-1,3-diyl or a Butane-1,4- diyl Unit. B. Hoffmann, D. Zanini, I. Ripoche, R. Bürli, A. Vasella. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1862-1887.

¹⁹ On Ring Compounds.XXI. The Optical Rotary Dispersion of Complexes of Cyclodextrin and Amylose with some Azo Dyes in Aqueous Solution. F.Cramer, G. Mackensen, K. Sensse, *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 494.

²⁰ Glycoconjugated Polymer. 3. Synthesis and Amphiphilic Property of Core-Glycoconjugated Star-Shaped Polystyrene. A. Namuri, T. Satoh, H. Kaga, T. Kakuchi. *Macromolecules* **2002**, *35*, 699-705.

²¹ a) Excitation Relaxation Dynamics and Molecular Dispersion of Maltohexaose-linked Tetraphenylporphyrins in Aqueous Solution. Y. Arima, S. Akimoto, T. Yamazaki, M. Shibata, S. Hirohara, S. Yano, T. Kakuchi, I. Yamazaki. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *361*, 152-158. b) Preparation of (maltohexaoyloxypropoxy) tetraphenylporphyrin Derivatives as Photosensitizers and Compositions comprising the same. Y. Shigenobu, K. Toyoji, K. Isamu. *PCT Int. Appl.* **2002**, WO 2002020621.c) *meso*-Tetraphenylporphyrin Having Hexa-maltosyl and Decyl Chain as an Amphiphilic Photosensitizer toward Photodynamic Therapy. A. Hamazawa, I. Kinoshita, B. Breedlove, K. Isobe, M. Shibata, Y. Baba, T. Kakuchi, S. Hirohara, M. Obata, Y. Mikata, S. Yano. *Chem. Lett.* **2002**, 388-389.

²² New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides. Are there Alternative to the Koenigs-Knorr Method. R. Schmidt. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235.

CHAPITRE III: Glycopolymères Dynamiques

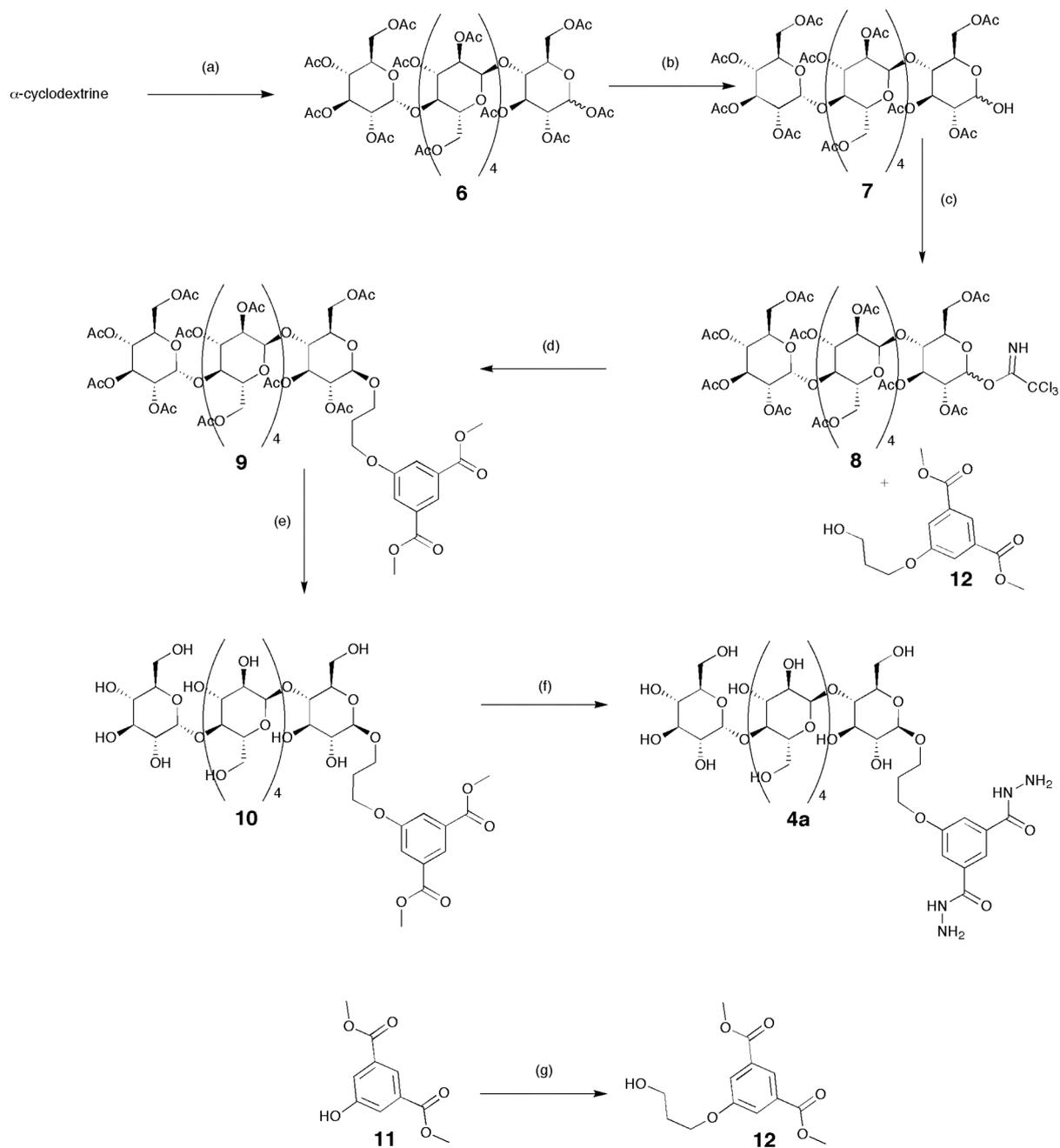


Figure III4: Synthèse du monomère **4a**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) (i) I_2 , Ac_2O (ii) HClO_4 , Ac_2O , quant.; (b) Piperidine, THF, 70% ; (c) Trichloroacétonitrile, DBU cat., CH_2Cl_2 , 64% ; (d) BF_3OEt_2 , CH_2Cl_2 , -20°C , 39%; (e) KCN, MeOH, 67% ; (f) NH_2NH_2 monohydrate, MeOH, 68% ; (g) 1,3 propanediol, PPh_3 , DIAD, THF, 67%.

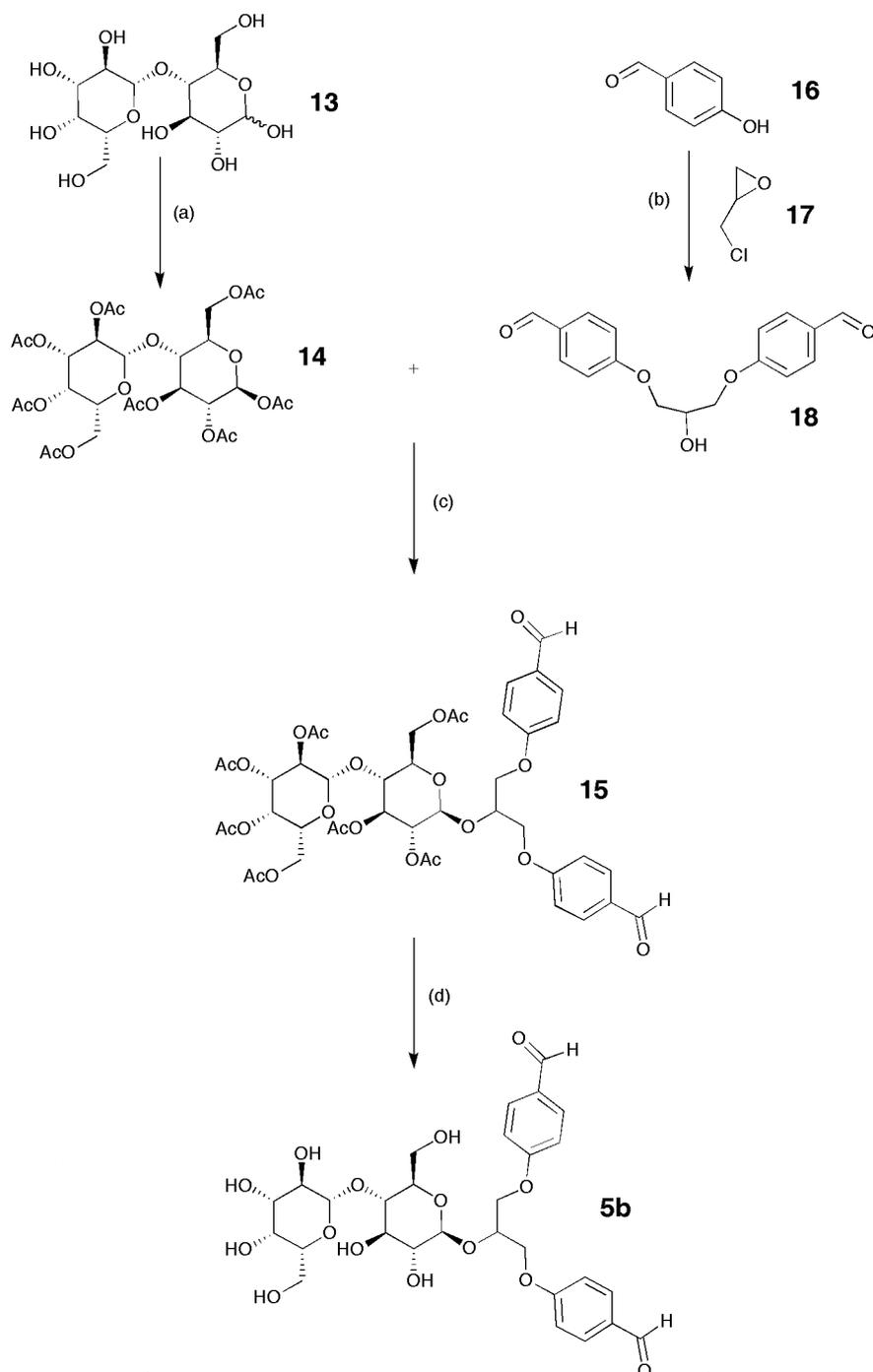


Figure III5: Synthèse du monomère **5b**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) NaOAc, Ac₂O, reflux, quant., on obtient un mélange des anomères α/β 1/9 inséparables par chromatographie ou cristallisation ;(b) NaOH, H₂O, 60°C, 70% ;(c) BF₃OEt₂, CH₂Cl₂, reflux, produit directement utilisé pour l'étape suivante ;(d) NEt₃/MeOH/H₂O 8/58/24, 13% sur deux étapes.

La synthèse du dialdéhyde **5b** fait elle aussi intervenir une glycosylation, mais dans des conditions plus rudes. Cette fois c'est le composé **14** qui fait office de donneur de groupement glycosyl pour l'accepteur dialdéhyde **18** décrit dans la littérature.²³(Figure III5)

²³Regio-Reactive Resin: A Platform for Orthogonal Loading Using the Polymer Backbone and Cross-Linker. T. J. Dickerson, N. N. Reed, K. D. Janda. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1507-1509.

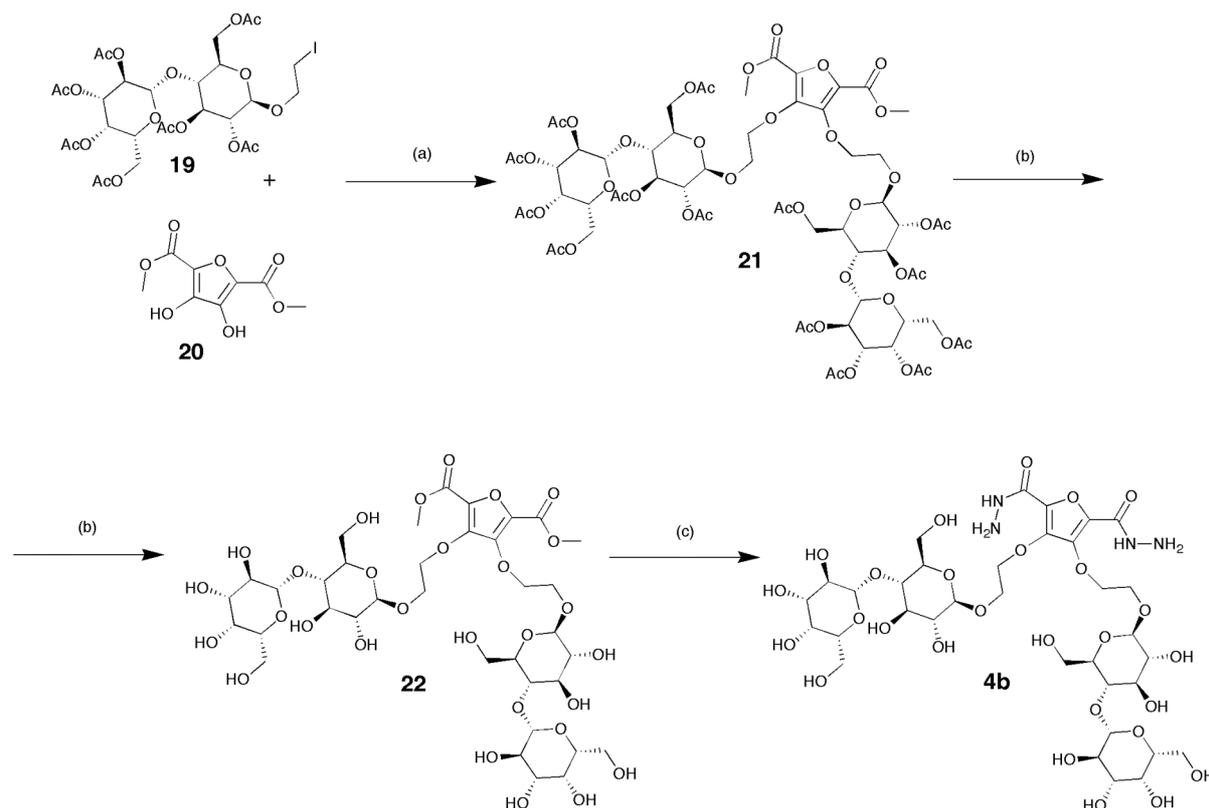


Figure III6: Synthèse du monomère **5b**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) K_2CO_3 , 18-Crown-6, DMF, $40^\circ C$, 48H, 79% ;(b) KCN cat., MeOH, 77% ;(c) NH_2NH_2 monohydrate, MeOH, 74%.

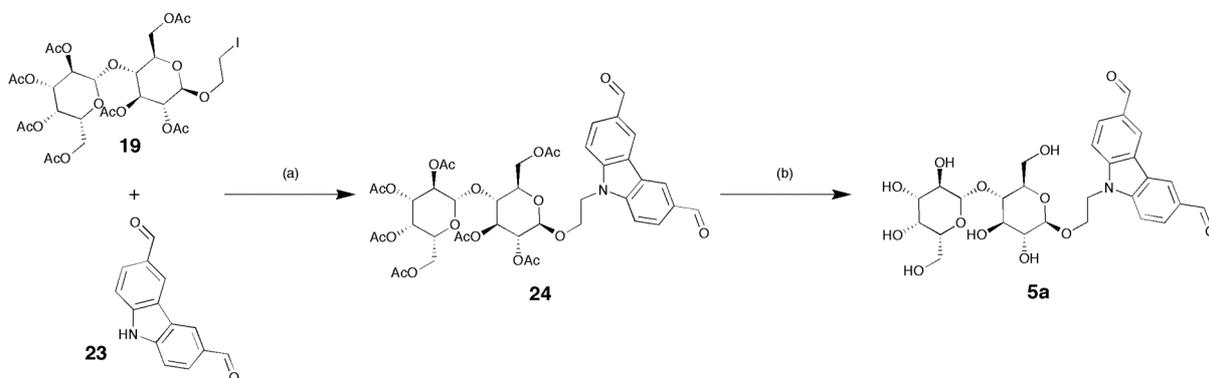


Figure III7: Synthèse du monomère **5a**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) K_2CO_3 , 18-Crown-6, DMF, $45^\circ C$, 20H, 60% (b) $NEt_3/MeOH/H_2O$ 8/58/24, 76%.

La synthèse des monomères **4b** et **5a** fait intervenir un agent alkylant glycosylé **19**²⁴ qui permet d'introduire un groupement lactosyl en une seule étape sur les unités aromatiques **20**²⁵ et **23**²⁶.(Figure III6 et III7)

²⁴ Synthèse décrite en partie expérimentale, page 264.

²⁵ A Rational Synthesis of 4-Hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanon, a Flavor Component of Pineapple. D. W. Henry, R. M. Silverstein. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 2391-2394.

²⁶ Anti-Pneumocystis carinii Pneumonia Activity of Dicationic Carbazoles. D. A. Patrick, D. W. Boykin, W. D. Wilson, F. A. Tanius, J. Spychala, B. C. Bender, J. E. Hall, C. C. Dykstra, K. A. Ohemeng, R. R. Tidwell. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 781-793.

Polymérisation :

Les quatre monomères **4a**, **4b**, **5a** et **5b** donnent accès à quatre glycopolymères différents par polycondensation. (Figures III9, III11, III13, et III15)

Chaque polymérisation s'effectue par simple mélange d'un dérivé bis-hydrazide avec un dérivé dialdéhyde en milieu aqueux légèrement acide (pD= 4 ou 5) à une concentration de 5 à 10 mM. A un pH plus élevé (7 ou supérieur) la réaction de polycondensation est trop lente pour être observée.

Dans le cas du dialdéhyde **5a** un chauffage et une sonication préalables au mélange avec les monomères bishydrasides sont nécessaires du fait de la faible solubilité de **5a** en milieu aqueux. Une fois la réaction de polymérisation effectuée (une à deux minutes avec un léger chauffage à 80°C) on n'observe plus la précipitation de **5a** sous forme libre.

La réaction de polymérisation a été suivie par RMN du ¹H, et les spectres obtenus ont donné les premières indications sur les propriétés conformationnelles des ces glycopolymères. (Figures III8, III10, III12, et III14)

Dans tous les cas on observe un net élargissement, jusqu'à une disparition *quasi* complète, des signaux correspondant aux signaux aromatiques des monomères. A l'inverse, les signaux correspondant aux chaînes latérales oligosaccharides sont eux toujours visibles. Ce phénomène peut s'expliquer par une plus grande mobilité rotationnelle des chaînes latérales alors que la chaîne principale aromatique se trouve dans une conformation rigide. En RMN du ¹H, les temps de relaxation "spin-réseau" (T_1) et "spin-spin" (T_2) d'un proton sont sensibles à la mobilité de la chaîne sur laquelle il est lié. D'après la théorie de la relaxation de Bloembergen-Purcell-Pound, pour des chaînes ayant un temps de corrélation court (grande mobilité), le T_1 est égal au T_2 . Pour des temps de corrélations plus longs (mobilité réduite) le T_1 diffère du T_2 et atteint une valeur minimum, alors que le T_2 décroît progressivement avec le temps de corrélation des chaînes. Il a été montré que pour les polymères ayant une conformation en "goupillon", le T_2 des protons situés au cœur du goupillon, c'est-à-dire ceux de la chaîne principale, décroît au fur et à mesure que la densité et la longueur des chaînes latérales augmentent. Cela va dans le sens d'une réduction de la mobilité de la chaîne principale au fur et à mesure que la congestion par effet stérique dû aux chaînes latérale augmente.²⁷ Cette diminution du T_2 se traduit par une dispersion de l'énergie absorbée par les spins des ¹H (déphasage) et donc une perte d'intensité et un net élargissement des signaux, la largeur des raies à mi-hauteur $\nu_{1/2}$ étant directement reliée au T_2 par la relation $\nu_{1/2}=1/(\pi T_2)$. L'analyse des spectres RMN du ¹H suggèrent que les

²⁷ Structural Mobility of Molecular Bottle-brushes investigated by NMR Relaxation Dynamics. J. Pietrasik, B. S. Sumerlin, H.-i. Lee, R. R. Gil, K. Matyjaszewski. *Polymer* **2007**, 48, 496-501.

polymères **4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, et **4b5b** adoptent une conformation particulière dans laquelle les noyaux aromatiques de la chaîne principale ont une mobilité réduite.

Ces observations montrent bien que les monomères ont réagi, mais posent le problème de la caractérisation des polymères et des éventuelles réactions d'échanges, étant donné qu'aucun signal de protons imines d'acylhydrazones (intégrés dans la chaîne principale) ne peut être détecté en RMN du ^1H . Si on considère que ce profil particulier résulte d'une conformation de type micellaire où la chaîne principale se trouve dans une conformation rigide du fait d'une combinaison de l'effet hydrophobe et d'une répulsion stérique due aux chaînes latérales, on devrait pouvoir observer à nouveau les signaux de la chaîne principale en dénaturant cette structure. On peut envisager cette dénaturation de différentes manières (ajout d'urée, de détergent, ou chauffage) mais celle qui nous est apparue la plus efficace est la dilution de la solution aqueuse des glycopolymères dans du DMSO. Ce solvant aprotique polaire est capable de solubiliser à la fois les chaînes latérales polaires et la chaîne principale, qui de ce fait gagne en mobilité. On devrait donc pouvoir observer les protons de la chaîne principale en solubilisant les glycopolymères dans le DMSO- d_6 . Et c'est bien ce que l'on observe. Après dilution d'un prélèvement (100 μL) des solutions des glycopolymères **4a5b** et **4b5b** dans du DMSO- d_6 (500 μL) on peut observer et attribuer tous les signaux aromatiques de la chaîne principale. (Figures III8, III9, III14, et III15) Cette technique de dilution nous a été très utile dans l'étude des cinétiques d'échanges comme nous le verrons plus loin. Pour les polymères **4a5a** et **4b5a** même après dilution dans le DMSO- d_6 les spectres restent trop larges pour être exploitables.

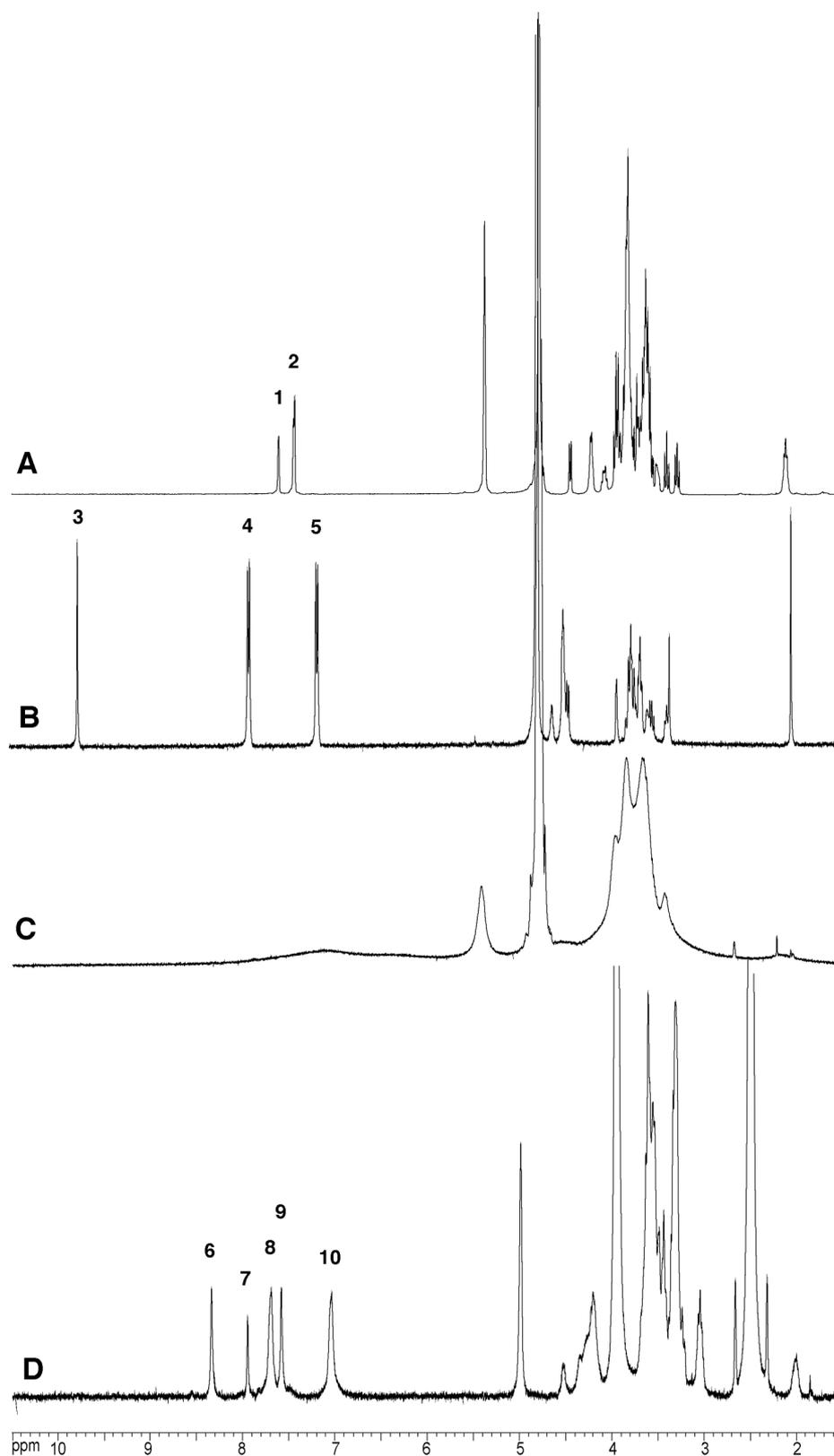


Figure III8: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **4a**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **5b**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère **4a5b** à une concentration en monomère de 10 mM, et à $\text{pD}=4$. **D** Spectre RMN du ^1H ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 5/1) obtenu après dilution de 100 μL de la solution précédente du polymère **4a5b** dans 500 μL de $\text{DMSO}-d_6$. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III9.

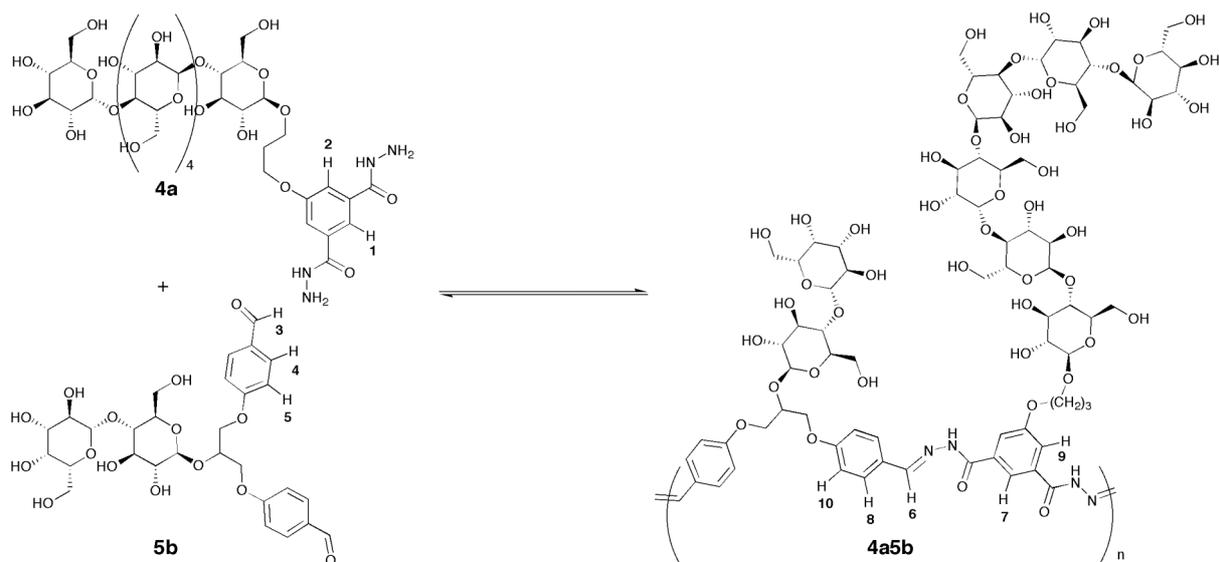


Figure III9: Préparation du glycopolymère dynamique **4a5b** par polycondensation des monomères **4a** et **5b**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III8.²⁸

²⁸ Un schéma permettant d'assigner ces signaux est présenté en annexe 2 page 301.

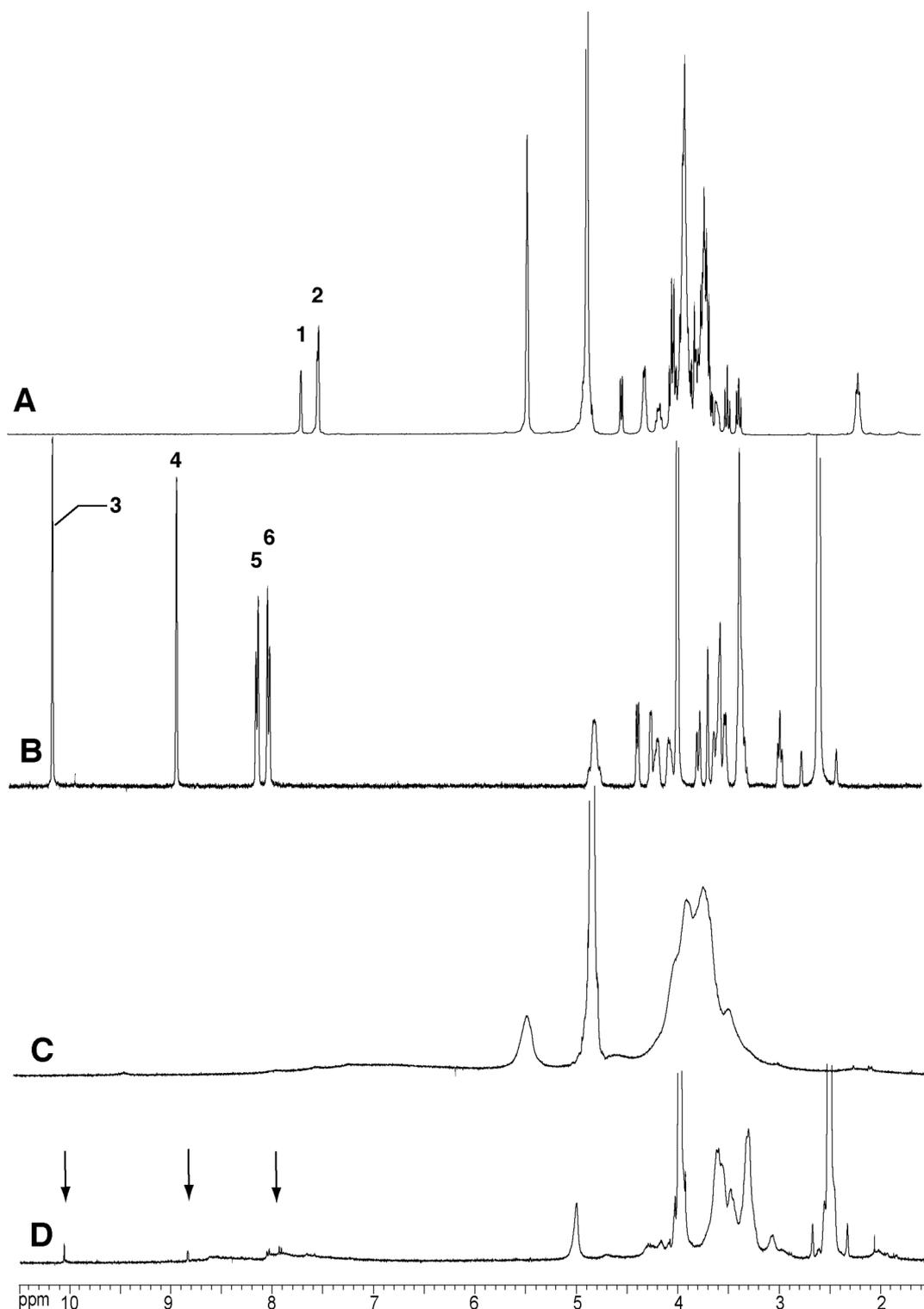


Figure III10: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **4a**. **B** Spectre RMN du ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) du monomère **5a**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère **4a5a** à une concentration en monomère de 10 mM, et à $\text{pD}=4$. **D** Spectre RMN du ^1H ($\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 4/1) obtenu après dilution de 100 μL de la solution précédente du polymère **4a5a** dans 400 μL de $\text{DMSO-}d_6$. Même après dilution, le spectre est toujours trop large pour être interprété. On peut noter la présence d'une quantité résiduelle de dialdéhyde **5a** indiqué par des flèches. Les références pour l'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III11.

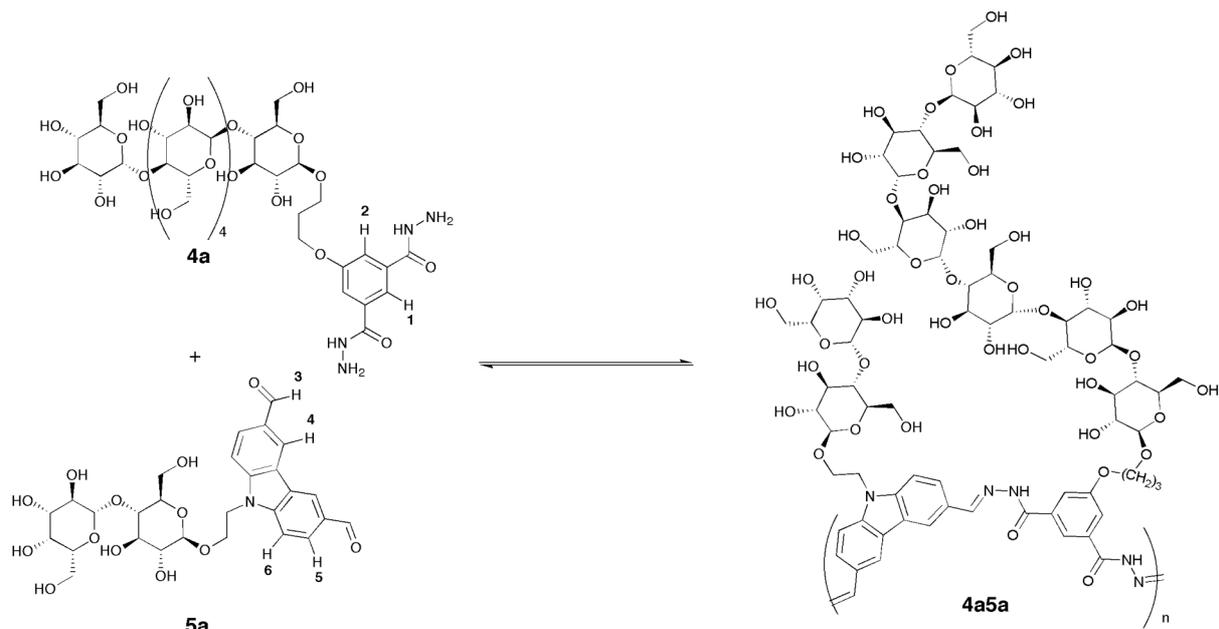


Figure III11: Préparation du glycopolymère dynamique **4a5a** par polycondensation des monomères **4a** et **5a**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III10.

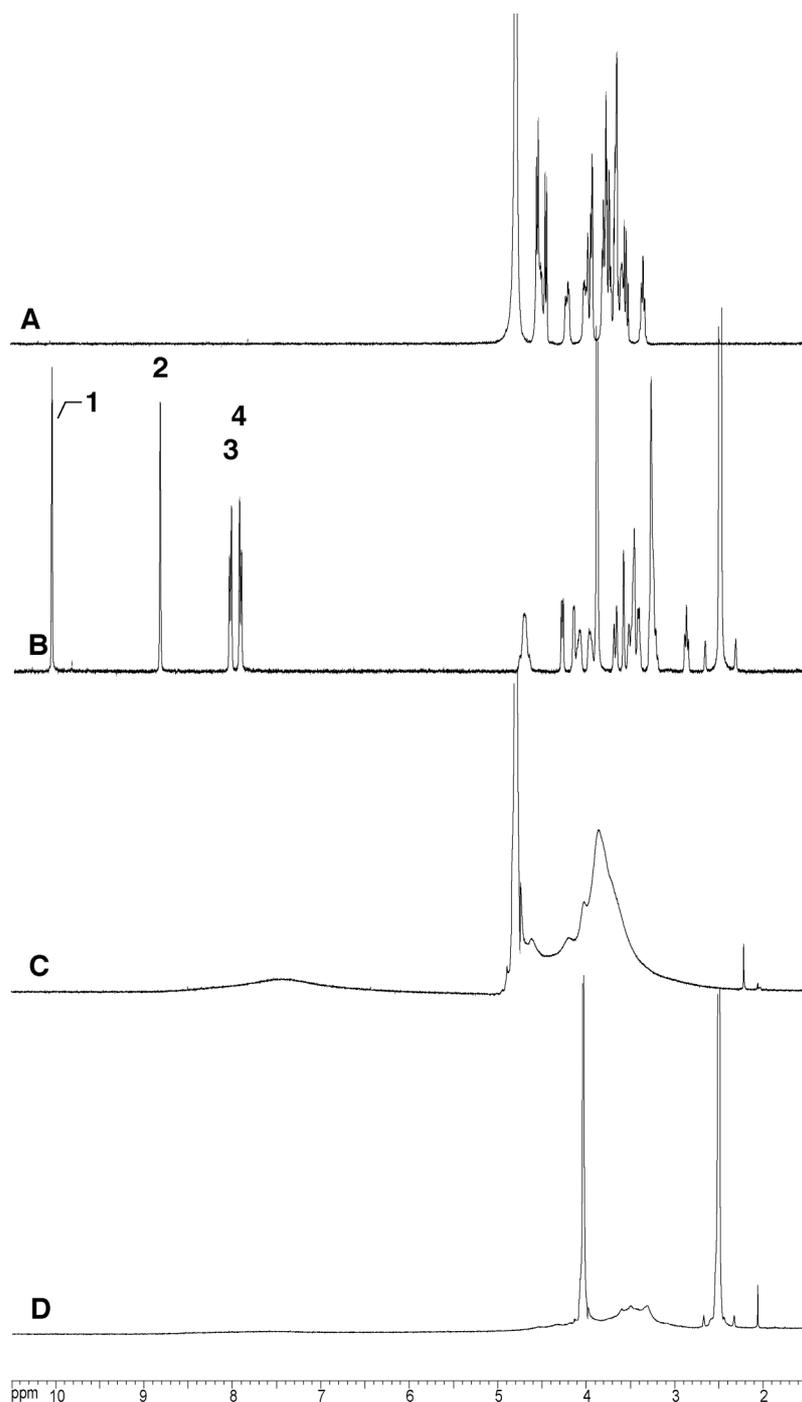


Figure III12: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **4b**. **B** Spectre RMN du ¹H (DMSO-*d*₆) du monomère **5a**. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère **4a5a** à une concentration en monomère de 10 mM, et à pD=4. **D** Spectre RMN du ¹H (DMSO-*d*₆/D₂O 4/1) obtenu après dilution de 100 μL de la solution précédente du polymère **4a5b** dans 400 μL de *d*-DMSO. Même après dilution, le spectre reste trop large pour être interprétable. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III13.

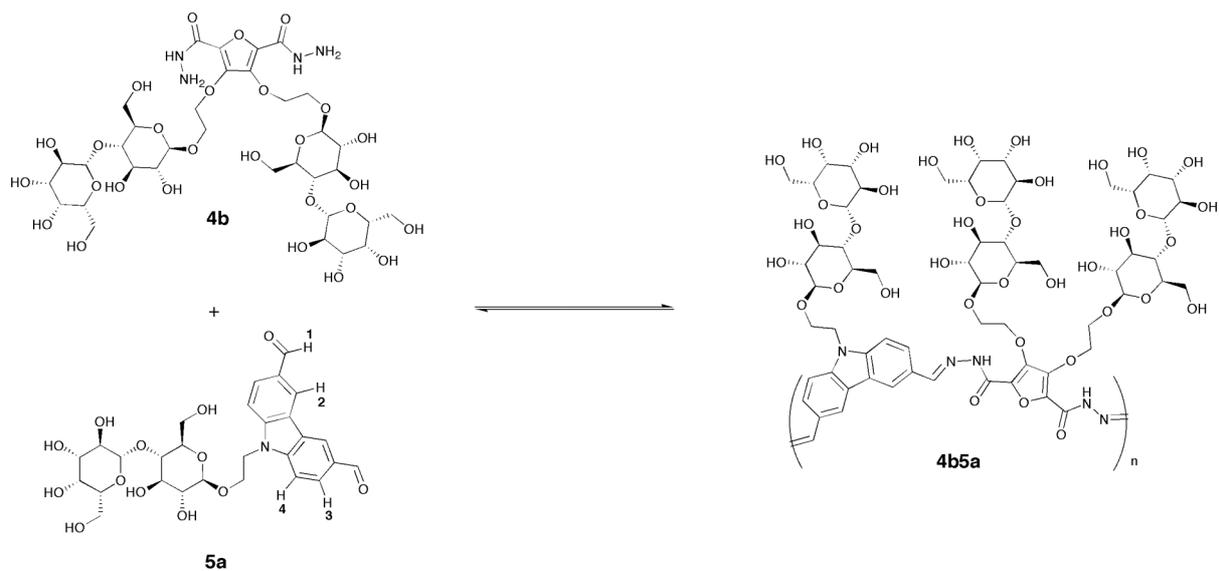


Figure III13: Préparation du glycopolymère dynamique **4a5a** par polycondensation des monomères **4a** et **5a**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III12.

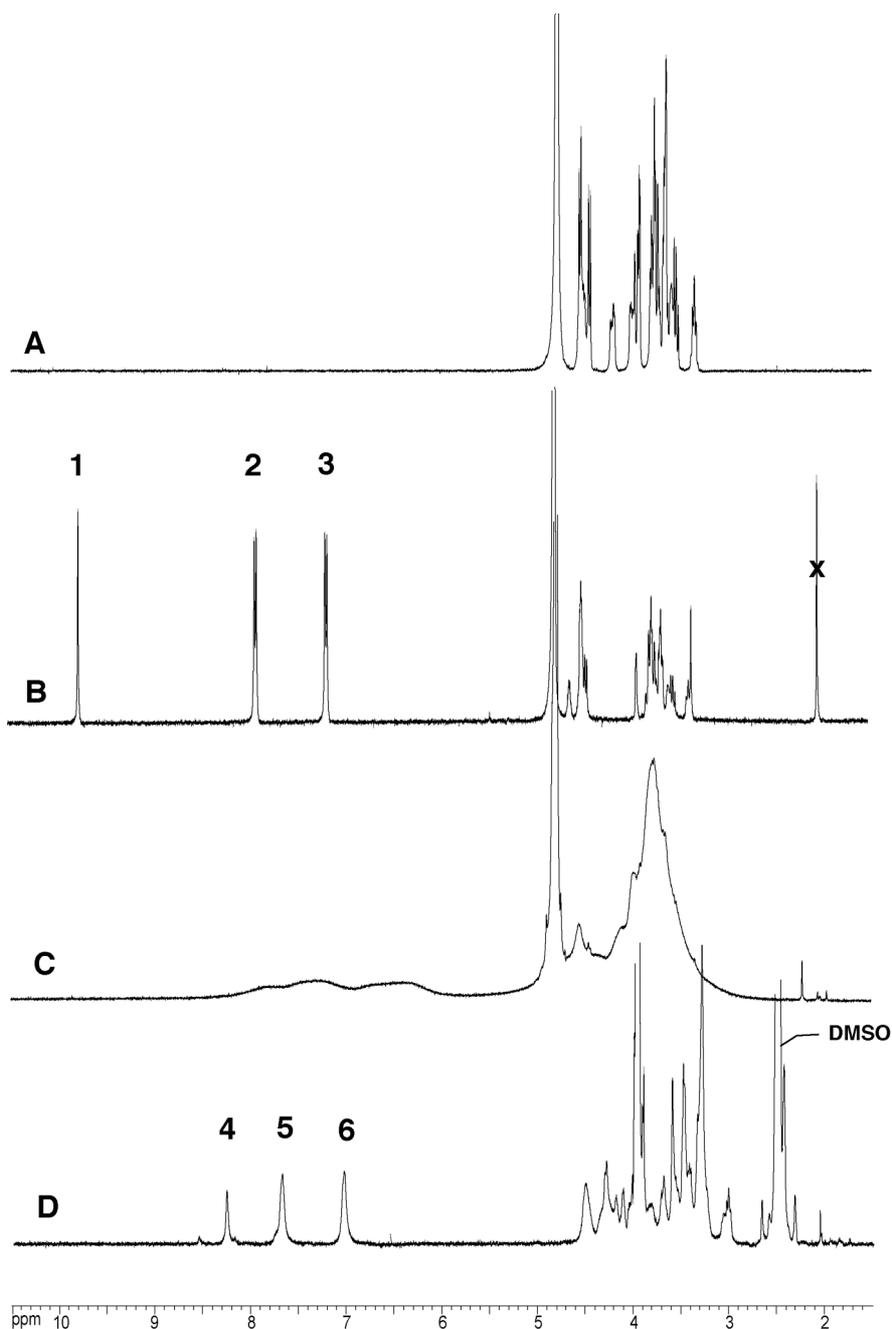


Figure III14: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **4b**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **5b**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère **4a5b** à une concentration en monomère de 10 mM, et à $\text{pD}=4$. **D** Spectre RMN du ^1H ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 4/1) obtenu après dilution de 100 μL de la solution précédente du polymère **4b5b** dans 400 μL de d -DMSO. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III15.

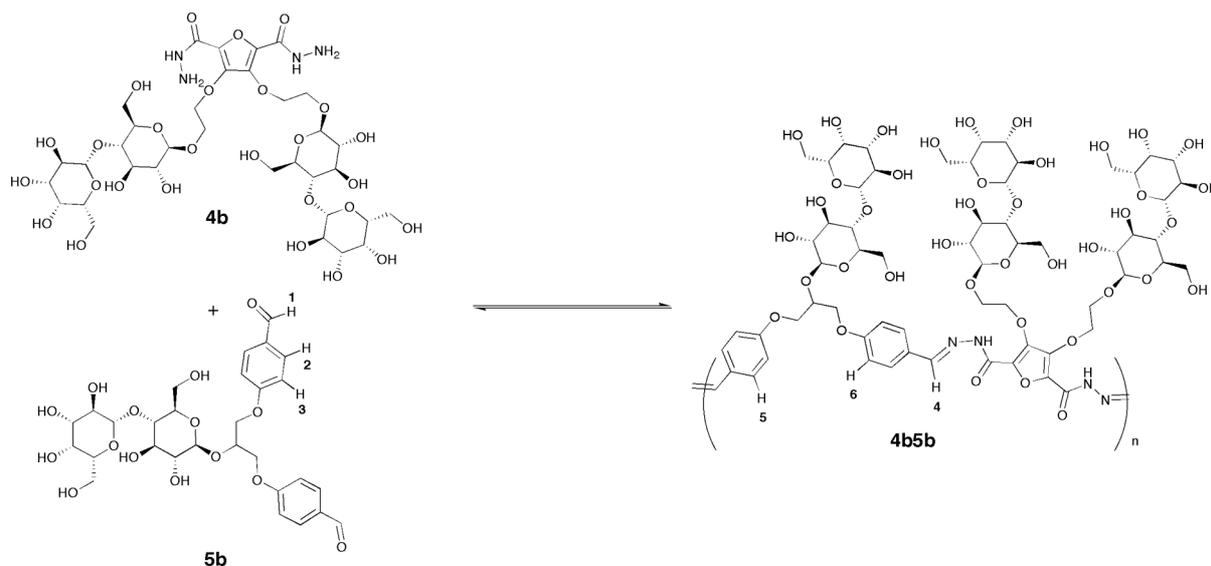


Figure III15: Préparation du glycopolymère dynamique **4b5b** par polycondensation des monomères **4b** et **5b**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III14.

Etude de fluorescence

Fluorescence des glycopolymères **4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, **4b5b**

Au cours de la synthèse de **5b** nous avons observé que le composé **15** est fluorescent en présence d'acides de Lewis (BF_3OEt_2). Cette observation nous a poussé à retrouver cette propriété dans le monomère final **5b**, ce qui n'a pas été le cas.

Par contre, nous avons très vite remarqué que les glycopolymères préparés précédemment ont des propriétés d'émissions de fluorescence remarquables comme le montre la Figure III16. Alors que parmi les monomères, seul **5a** a des propriétés d'émission de fluorescence significatives, les quatre combinaisons de monomères montrent toutes des émissions intenses de fluorescence avec des maximums d'émission allant du bleu pour **4a5b** ($\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$) au vert pour **4a5a** ($\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$), **4b5b** ($\lambda_{\text{max}} = 499 \text{ nm}$) et au rouge pour **4b5a** ($\lambda_{\text{max}} = 567 \text{ nm}$). (Figure III16 et Tableau III1)

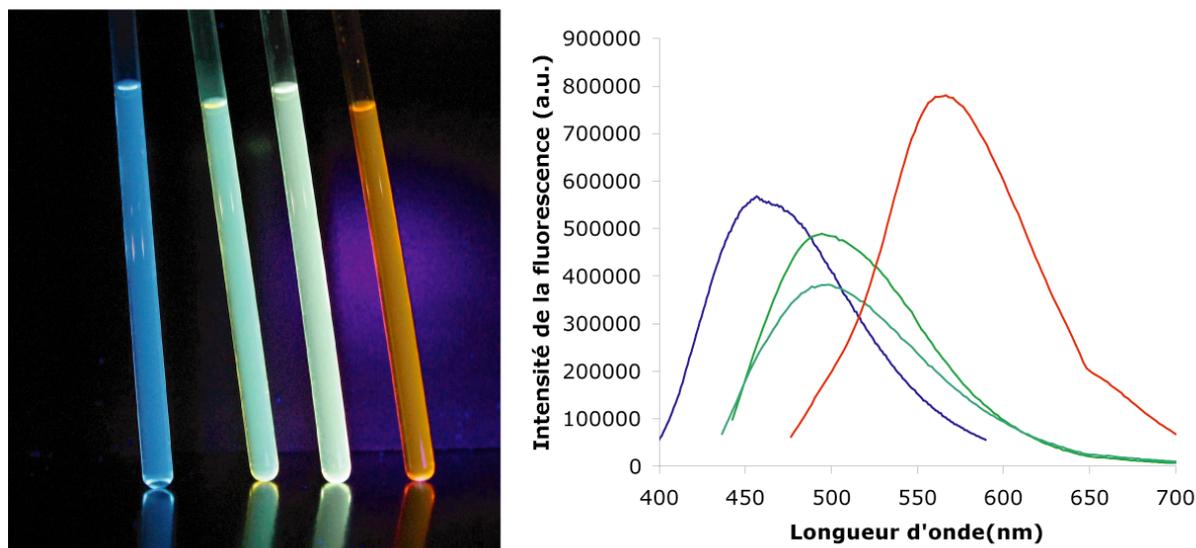


Figure III16: *gauche*: photographie d'échantillons des polymères **4a5b**, **4a5a**, **4b5b**, **4b5a** sous irradiation UV (365 nm) dans D₂O à pH=4 avec une concentration initiale en monomères de 5 mM; *droite*: Spectres d'émissions des mêmes échantillons de polymères.(pour le polymère **4b5a** une ouverture de 3 nm à l'entrée du photomultiplicateur a été utilisée au lieu de 1 nm pour tous les autres).

Tableau III1: Longueurs d'ondes maximums pour l'émission de fluorescence et l'excitation pour les glycopolymères **4a5a**, **4b5a**, **4a5b**, et **4b5b**.

	4a5a	4b5a	4a5b	4b5b
Longueur d'onde maximum pour l'excitation (nm)	433	467	389	427
Longueur d'onde maximum pour l'émission (nm)	495	567	457	499

Fluorescence des monomères **4a**, **4b**, **5a**, **5b**

Contrairement au monomère **5a** qui est construit à partir d'une unité fluorescente carbazole, la fluorescence des monomères **4a**, **4b** et **5b** est difficilement observable. La Figure III17 montre les spectres d'émission des monomères en solution aqueuse dans les mêmes conditions de concentration et de pH que celles utilisées dans les réactions de polycondensation. On constate que l'intensité de l'émission de fluorescence est très faible, et est de l'ordre de grandeur de l'émission Raman du solvant (on observe 2 bandes d'absorption correspondant probablement aux émissions Raman de H₂O et HDO présents dans le D₂O tamponné utilisé).(Figure III17)

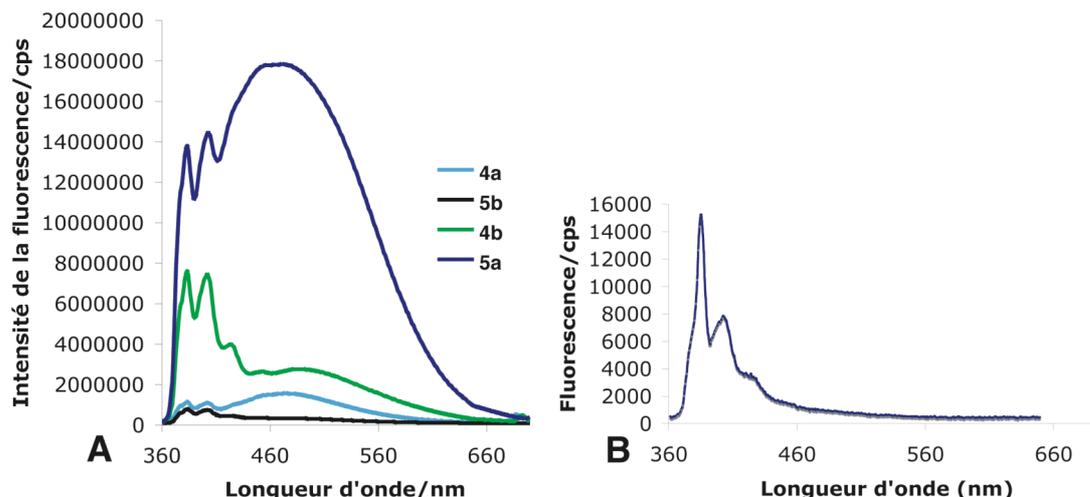


Figure III17: A Spectres d'émission des monomères **4a**(bleu clair, $\lambda_{\text{max}} \text{ émission}=477 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ excitation}=344 \text{ nm}$), **4b**(vert, $\lambda_{\text{max}} \text{ émission}=491 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ excitation}=347 \text{ nm}$), **5a**(bleu foncé, $\lambda_{\text{max}} \text{ émission}=474 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ excitation}=300 \text{ nm}$), et **5b**(noir, $\lambda_{\text{max}} \text{ émission}=\text{non déterminé}$ (intensité trop faible), $\lambda_{\text{max}} \text{ excitation}=354 \text{ nm}$) dans D_2O , à $\text{pD}=4$ et à une concentration de 5 mM , à l'exception de **5a** qui n'est pas soluble dans ces conditions. Pour **5a** une solution saturée à été utilisée après sonication et filtration. Une ouverture de 3 nm a été utilisée à l'entrée du photomultiplicateur. **B** Spectre d'émission du tampon Acide acétique- d_3 /Acétate de sodium- d_3 à $\text{pD}=4$. L'intensité est mesurée en coups par seconde "cps".

Il est probable que ces propriétés d'émission résultent d'une conformation particulière de type micellaire dans laquelle les noyaux aromatiques de la chaîne principale des glycopolymères **4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, et **4b5a** se trouvent dans un environnement hydrophobe. Les spectres caractéristiques en RMN du ^1H de ces polymères sont déjà des premiers indices en faveur de cette hypothèse.(cf. paragraphe précédent) Dans une telle conformation, dite en "goupillon" les chromophores aromatiques sont figés dans une conformation rigide, ce qui augmente l'intensité de l'émission de fluorescence par diminution des phénomènes de relaxation non radiatifs (comme l'agitation thermique, ou rotationnelle).

Si on suit l'évolution de la fluorescence du mélange des monomères **4a** et **5b** au cours du temps, on constate une très nette augmentation de l'intensité de la fluorescence émise par l'échantillon. L'intensité maximum de fluorescence pour $t=130 \text{ min}$ est 17 fois supérieure à celle enregistrée pour $t=0$. Cette augmentation est accompagnée d'un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximum vers le bleu. On passe d'un maximum d'émission $\lambda_1=495 \text{ nm}$ pour $t=0 \text{ min}$, à un maximum d'émission $\lambda_2=457 \text{ nm}$ pour $t=130 \text{ min}$. (Figure III18) Ce déplacement est celui qu'on attend si les chromophores se trouvent dans un environnement de moins en moins polaire, autrement dit, de plus en plus hydrophobe. En effet, il est connu que la constante dipolaire du milieu influence notablement l'intensité de l'émission de fluorescence.²⁹ La fluorescence est due au passage d'électron d'une molécule d'un état excité S_1 au niveau d'énergie initial. La molécule dans l'état S_1 ,

²⁹ Principles of Fluorescence Spectroscopy. J. R. Lakowicz *Kluwer Academic/Plenum Publishers* 1999.

possède un moment dipolaire μ_E plus élevé que le moment dipolaire initial μ_i . Un solvant polaire contribuera donc à la stabilisation de l'état excité S_1 par le biais de phénomènes de relaxation et d'alignement des moments dipolaires du solvant et du moment dipolaire μ_E . Plus la polarité du milieu augmente plus cet effet sera prononcé, et plus l'émission du chromophore sera déplacé vers les longueurs d'ondes plus grandes et de moindre énergie. L'effet sera l'inverse si on diminue la polarité du milieu.

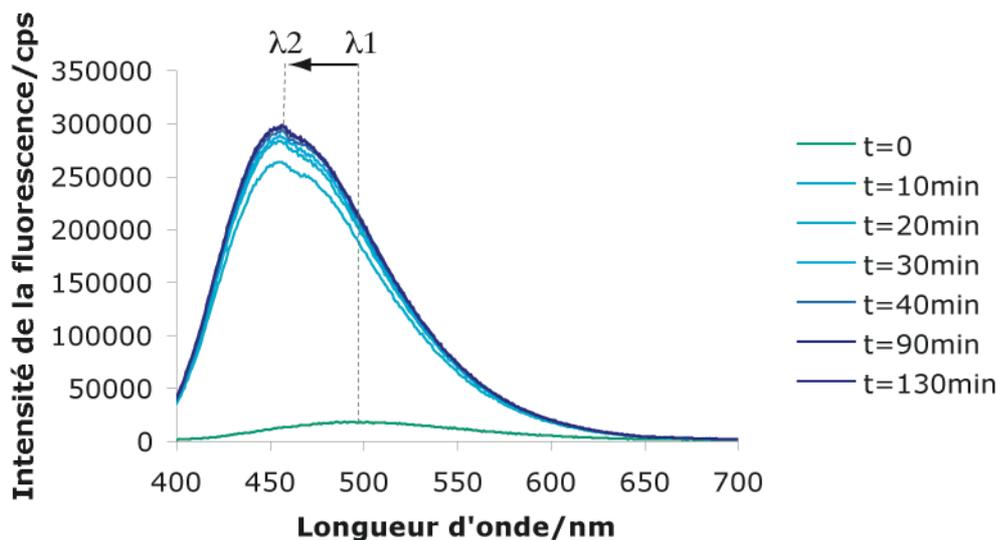


Figure III18: Evolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence émise lors de la polycondensation des monomères **4a** et **5b** à une concentration initiale de 5mM et pD=4 (longueur d'onde d'excitation: 389 nm). L'intensité est mesurée en coups par seconde cps.

Par contre, ce déplacement vers le bleu n'est pas observé si on compare les maximums d'émission des monomères **4b**(491 nm) et **5a**(300 nm) avec ceux des polymères **4b5a**(567 nm), **4b5b**(499 nm), et **4a5a** (495nm) qui les contiennent. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur la conformation de tous les glycopolymères décrits ici en suivant cette analyse.

Un autre argument en faveur d'une conformation de type micellaire vient de l'effet de la température sur l'intensité d'émission de la fluorescence du glycopolymère **4a5b**. Une augmentation de la température d'une solution aqueuse du glycopolymère **4a5b** entraîne une forte baisse de l'intensité de la fluorescence émise. (Figure III19 **A**) Cet effet est probablement dû à une déstabilisation de la structure micellaire où les noyaux aromatiques seraient empilés les uns sur les autres. Un phénomène similaire a été observé lors de la dilution d'une solution du polymère **4a5b** dans le DMSO- d_6 , ce qui d'après les études RMN permet de solubiliser la chaîne principale de ce polymère. (Figure III19 **B**) En quelque sorte la température et le DMSO entraîneraient une dénaturation de la conformation du polymère **4a5b**.

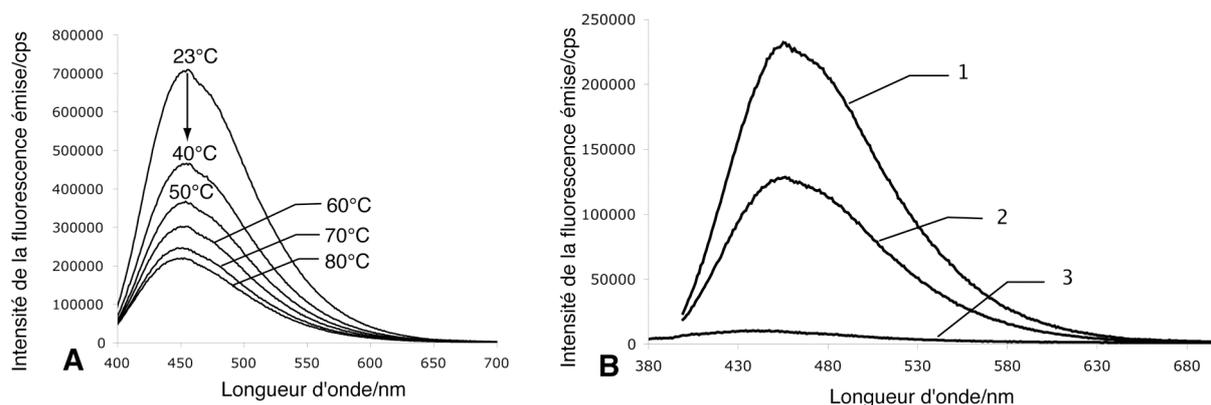


Figure III19: **A** Effet de la température sur l'intensité de la fluorescence émise par un échantillon de glycopolymère **4a5b** en solution dans D₂O, à pD=4 et avec une concentration initiale en monomère de 5 mM. **B** Effet de l'ajout de DMSO sur l'intensité de la fluorescence émise par un échantillon de glycopolymère **4a5b** (1) en solution dans D₂O, à pD=4 et avec une concentration initiale en monomère de 5 mM; (2) après dilution de cette solution (100 µl) dans du D₂O (500 µl); (3) après dilution de cette solution (100 µl) dans du DMSO-*d*₆ (500 µl). L'intensité est mesurée en coups par seconde cps.

Caractérisation du polymère 4a5b par cryo-TEM

Plusieurs indices sont donc en faveur d'un repliement du glycopolymère **4a5b** dans une conformation de type micellaire similaire à celle observée pour des dérivés glycosylés de polystyrène (Figure III3). Une structure de ce type devrait être observable par microscopie électronique, son diamètre étant de l'ordre de 50 Å d'après les précédents décrits dans la littérature.

Nous avons donc soumis un échantillon du polymère **4a5b** à une analyse de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM). Cette technique est basée sur la vitrification de fines couches d'échantillon sous forme liquide. Une goutte de la solution du composé à étudier est placée sur une grille de cuivre recouverte par une fine couche de carbone. Après aspiration de la solution en excès, une fine couche de solution (épaisseur < 300 nm) reste suspendue entre les mailles de la grille par capillarité. L'échantillon est alors plongé dans de l'éthane liquide (-170°C), ce qui vitrifie instantanément la solution. On place ensuite cette préparation dans un microscope électronique réfrigéré pour l'analyse. Cette technique est particulièrement efficace pour déterminer des structures d'assemblages supramoléculaires en solution, comme des micelles, ou des échantillons biologiques sensibles. L'intérêt principal pour notre étude est le fait qu'il s'agit d'une technique d'analyse de l'échantillon en solution. La vitrification empêche tout artefact dû à un dépôt par évaporation comme ce serait le cas pour une analyse de microscopie électronique standard. En effet, un dépôt dans ces conditions pourrait perturber les équilibres du fait de l'augmentation progressive de la concentration de l'échantillon lors de l'évaporation.

Une structure secondaire originale

Les résultats obtenus confirment bien l'hypothèse selon laquelle le polymère **4a5b** adopte une conformation en goupillon. (Figure III20) Sur les clichés réalisés à partir d'une solution des monomères **4a** et **5b** à une concentration initiale de 5 mM en présence d'une quantité catalytique de TFA on peut observer le glycopolymère **4a5b** sous la forme de filaments d'un diamètre compris entre 40 et 50 Å. Bien que la technique de cryo-TEM donne une bonne approximation du diamètre des filaments, leur longueur ne peut pas être déterminée par cette technique, du fait de l'épaisseur du film observé. On constate également la présence d'agrégats sphériques d'un diamètre similaire à celui du polymère **4a5b**. Ces agrégats pourraient correspondre à des monomères libres compactés en micelles, ou à des oligomères cycliques formés à partir de **4a5b**. Certaines de ces taches sombres apparaissent à l'extrémité de certains filaments et correspondraient en fait à des filaments du polymère **4a5b** dont l'axe longitudinal est orienté perpendiculairement à la surface de l'échantillon. (Figure III20 flèche 3)

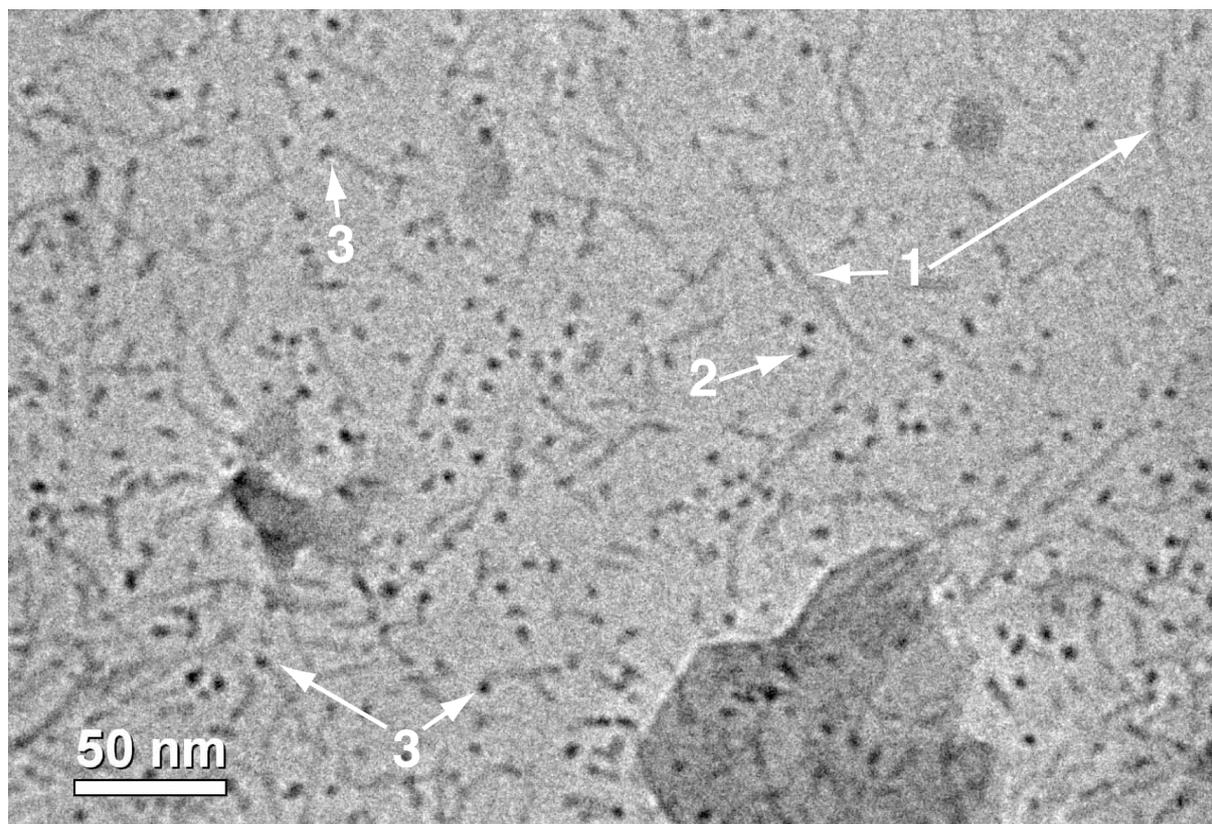


Figure III20: Image de cryo-TEM réalisée à partir d'un échantillon du polymère **4a5b** dans D₂O à une concentration initiale en monomère de 5 mM, et en présence d'une quantité catalytique de *d*-TFA (5 mol%). **1** Filaments polymériques individuels **4a5b**; **2** Agrégats sphériques; **3** Taches sombres correspondant à la section d'un filament polymérique observé dans la direction de son axe longitudinal, on peut voir le filament dans l'extension de ces taches sombres. Barre d'échelle 50 nm.

Fonctionnalisation supramoléculaire de surfaces carbonées

L'analyse cryo-TEM des échantillons du glycopolymère **4a5b** a révélé un autre comportement intéressant de ce polymère amphiphile. Ils s'organisent à la surface de la grille qui porte l'échantillon, perpendiculairement à leur axe longitudinal, pour former une couche dense de filaments polymériques alignés.(Figure III21) Comme mentionné précédemment la surface de cette grille est recouverte de carbone. Il s'agit donc d'une surface hydrophobe, ce qui suggère que cette auto-organisation résulte d'interactions hydrophobes avec le cœur des filaments polymériques constitué de noyaux aromatiques hydrophobes. Cette décoration supramoléculaire est très originale et pourrait être étendue à d'autres surfaces carbonées comme celle des nanotubes ou des fullerènes. Des précédents dans la littérature ont montré l'intérêt de ce type de fonctionnalisation pour le recouvrement et la solubilisation de nanotubes par des détergents polymériques glycosylés³⁰, et pour la solubilisation de fullerite par des dérivés glycosylés du polystyrène.³¹(Figure III22 A et B) **Mais à notre connaissance il s'agit de la première observation directe de ce type d'interaction entre une surface et un glycopolymère amphiphile ayant une structure secondaire bien définie.**

³⁰ Interfacing Carbon Nanotubes with Living Cells. X. Chen, U. C. Tam, J. L. Czapinsky, G. S. Lee, D. Rabuka, A. Zettl, C. R. Bertozzi. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6292-6293.

³¹ Polystyrene Microgel Amphiphiles with Maltohexaose. Synthesis, Characterization, and Potential Applications. A. Narumi, H. Kaga, Y. Miura, I. Otsuka, T. Satoh, N. Kaneko, T. Kakuchi. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1496-1501.

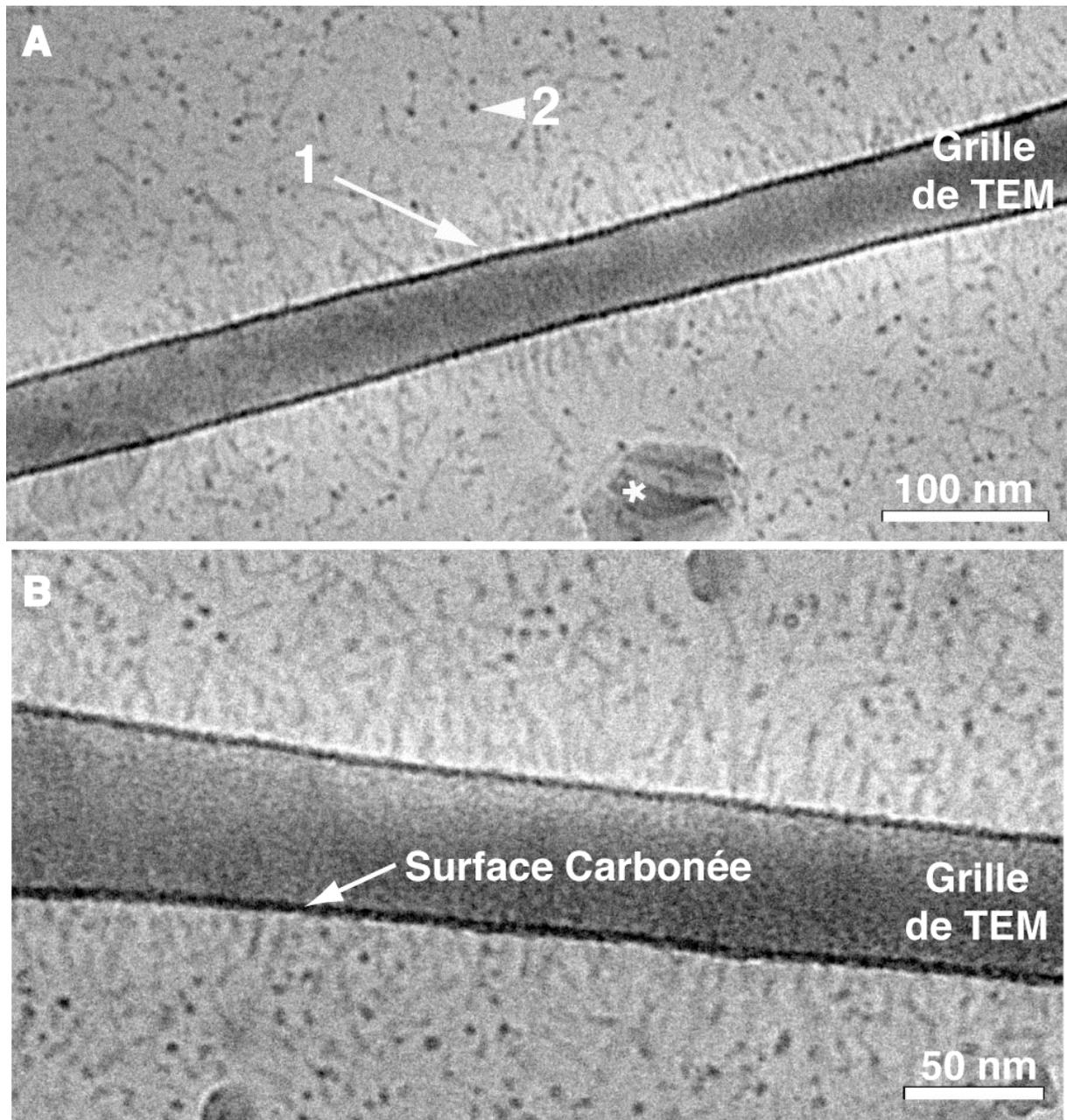


Figure III21: **A** Image de cryo-TEM réalisée à partir d'un échantillon de glycopolymère **4a5b** dans D_2O , à $pD=4$ avec une concentration initiale en monomère de 5 mM. **1** On peut voir l'alignement des filaments de polymères à la surface de la grille de TEM. **2** On constate toujours la présence d'agrégats sphériques. **B** Cliché de cryo-TEM réalisé sur le même échantillon mais à plus fort grossissement.

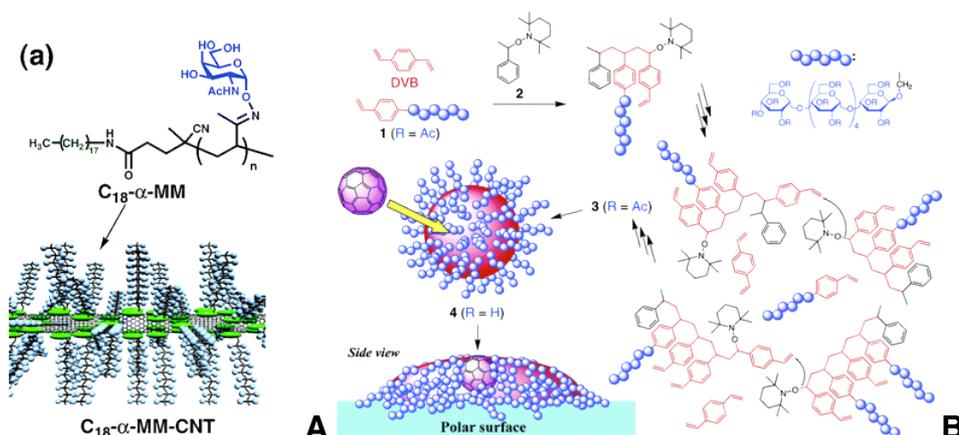


Figure III22: A Décoration de la surface hydrophobe de nanotubes de carbone par des polymères amphiphiles glycosylés. Ces assemblages sont des analogues de mucines (protéines glycosylées présentes à la surface de certaines cellules). **B** Solubilisation de fullerènes par des polymères glycosylés amphiphiles dérivés du polystyrène et portant comme chaîne latérale du maltohexaose comme notre monomère **4a**. Les particules de polymères ainsi obtenues **4** sont des "microgels" capables de solubiliser des fullerites.

Phénomènes d'agréations sur 4a5b

Lors de la préparation des échantillons pour l'analyse cryo-TEM nous avons décidé de tester l'influence de la présence d'urée dans la solution du glycopolymère **4a5b** sur d'éventuels phénomènes d'agréations. En effet, Kobayashi *et al.* mentionnent clairement l'utilisation d'urée pour prévenir l'agréation de ces glycopolymères¹⁷ dans leur article à propos de l'influence de la longueur des chaînes latérales oligosaccharides sur la conformation de dérivés du polystyrène. Nous pensons donc que l'ajout d'urée devrait permettre d'observer plus facilement des chaînes polymériques individuelles. Une concentration de 100 mM d'urée a donc été choisie par analogie avec les précédents de la littérature.

L'effet observé a été à l'opposé de celui attendu. Alors que le premier échantillon, sans urée, avait permis d'identifier clairement un grand nombre de chaînes polymériques individuelles, sans observer leur agrégation, l'échantillon contenant l'urée a montré différentes structures résultant de l'association des chaînes polymériques. (Figure III23) Il a été intéressant de voir que dans ces conditions certains filaments sont plus larges que les autres. Cela pourrait signifier que ces filaments, en présence d'urée se déplient en ruban, qui apparaissent alors plus ou moins larges selon l'angle d'observation. On peut également imaginer qu'il s'agit de deux voir trois filaments associés, ce qui constituerait alors un premier stade d'agréation. D'autres structures de tailles variables, correspondant certainement à différents stades d'agréations, sont visibles. On peut observer des agrégats de quelques chaînes associées, à des structures plus importantes toujours linéaires (plus de 300 nm de

longueur). Ces structures en s'associant forment des amas globulaires de chaînes polymériques d'un diamètre de l'ordre de 0,5 μ M.

On peut en conclure que l'urée a pour effet de promouvoir l'agrégation du glycopolymère **4a5b** au lieu de la prévenir. Cela peut s'expliquer par le fait que la conformation en goupillon de **4a5b** est maintenue par des interactions hydrophobes, l'ajout d'urée a pour effet de la déstabiliser étant donné qu'elle est connue pour son action dénaturante sur les protéines en réduisant la force des interactions hydrophobes.³² Cette dénaturation est observable sur certains filaments qui apparaissent dépliés "en ruban".

³² The Molecular Basis for the Chemical Denaturation of Proteins by Urea. B. J. Bennion, V. Daggett. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 5142-5147.

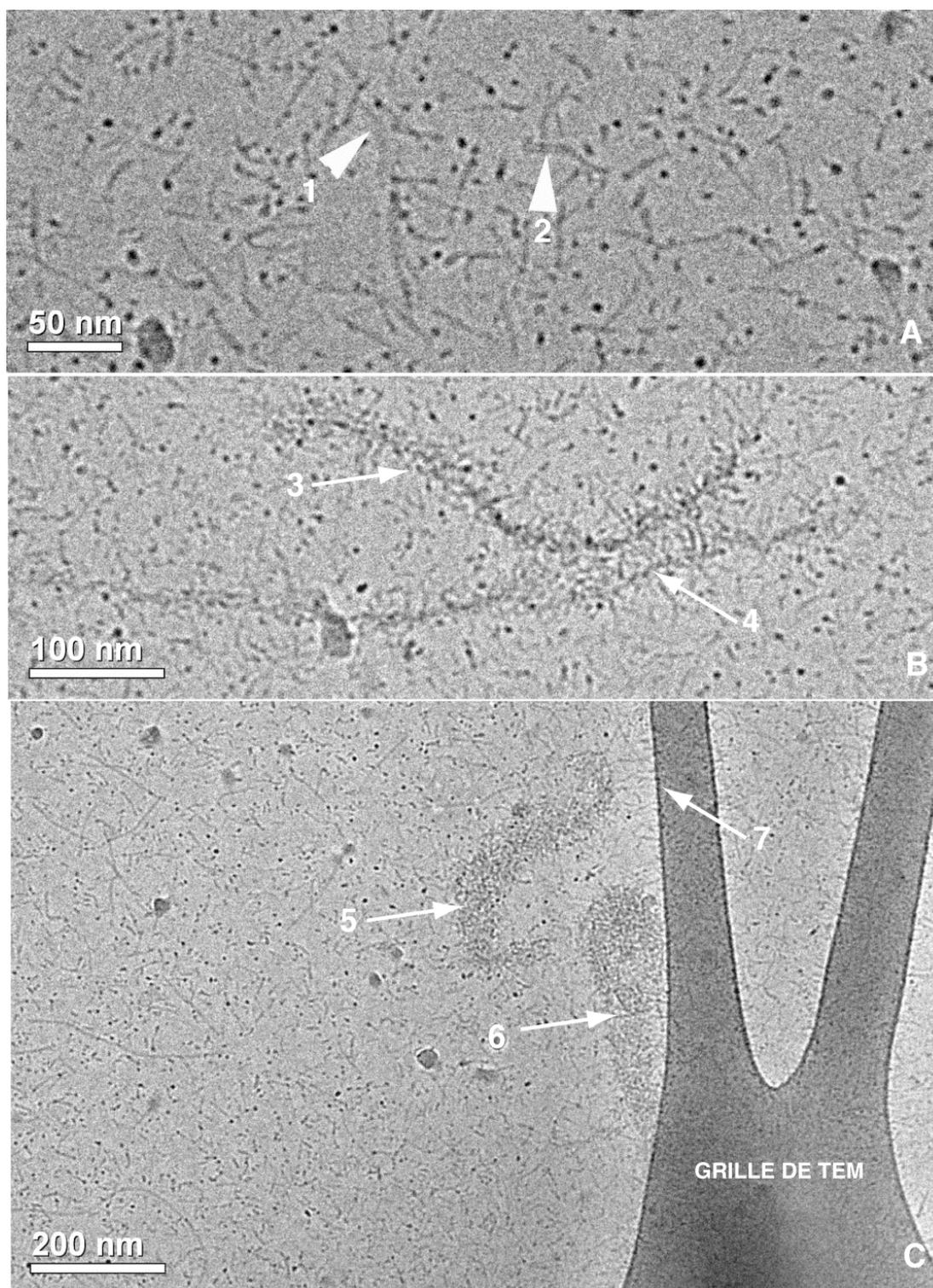


Figure III23: Les différents stades d'agrégation du glycopolymère **4a5b** en solution dans D₂O, en présence d'urée (100 mM) et d'une quantité catalytique de *d*-TFA (5 mol%). **A** Premier stade d'agrégation, on peut voir deux chaînes polymériques dépliées en ruban (1 et 2) **B** Deuxième stade d'agrégation, agrégats de chaînes polymériques gardant toujours une forme linéaire (3 et 4) **C** Dernier stade d'agrégation, formation d'agrégats globulaires plus ou moins allongés de dimensions de l'ordre de 300 nm (5 et 6). On peut encore noter l'auto-organisation des chaînes polymériques à l'interface entre la surface carbonée de la grille de TEM et de la solution aqueuse (7).

Ces observations vont dans le même sens que celles qui ont été réalisées lors de l'étude des cinétiques d'échanges qui seront détaillées plus loin. Lors de ces expériences,

les solutions de polymères ont été chauffées à des températures de 70 à 80 °C pour accélérer les cinétiques d'échanges. Et bien que les solutions de polymères soient stables pour une durée de plusieurs mois à température ambiante, dans certains échantillons, la formation d'un précipité blanc a été observée après quelques heures de chauffage. Dans un premier temps nous avons été surpris de ce phénomène étant donné que plusieurs expériences avaient déjà été réalisées à des températures de 80°C sur de longues périodes (plusieurs jours) sans observer le moindre précipité. Ces expériences préliminaires avaient été réalisées dans des tubes RMN sans agitation. Le facteur décisif pour l'apparition du précipité a été identifié comme la présence de l'agitateur magnétique recouvert de *Téflon*. La même solution de polymère **4a5b** a été répartie dans 2 tubes RMN identiques, l'un sans agitateur en *Téflon*, l'une avec. Après 2 heures à 50 °C, un précipité blanc est déjà présent dans le tube contenant l'agitateur en *Téflon*, alors que l'autre tube sans agitateur reste limpide même après 12 heures de chauffage à 50°C.

Il semble donc que le *Téflon* joue le rôle de catalyseur pour la formation du précipité. Le *Téflon* étant un matériel particulièrement hydrophobe, on peut très bien imaginer que les chaînes polymériques de **4a5b** s'organisent sur sa surface, comme cela a été observé pour des surfaces de carbone. La concentration des chaînes polymériques, alignées en réseau dense à la surface du *Téflon*, augmenterait alors localement et celles-ci seraient plus à même de s'agréger dans des conditions dénaturantes. Le chauffage à une certaine température est également nécessaire. La formation du précipité résulte donc d'une combinaison de conditions dénaturantes (le chauffage) et d'un catalyseur (la surface hydrophobe du *Téflon*). Des exemples dans la littérature discutent justement de l'effet du *Téflon* sur la dénaturation de certaines protéines.³³ Il a été montré qu'une surface hydrophobe comme le *Teflon* est capable d'induire un changement de conformation sur une protéine, le fragment β de l'amyloïde. Ce peptide passe d'une conformation en feuillet β à une conformation en hélice α en présence de *Teflon*. Les auteurs expliquent ce phénomène par l'adsorption des parties hydrophobes de la protéine à la surface du *Teflon*, ce qui induit une dénaturation de la conformation initiale de la protéine.

Notre hypothèse est que le *Teflon* initierait l'agrégation en induisant un dépliement en rubans des filaments polymériques de **4a5b** adsorbés à sa surface. Ce dépliement a déjà été observé en présence d'urée (voir plus haut), et on peut penser que la surface hydrophobe de *Teflon* pourrait avoir un effet dénaturant similaire à celui de l'urée, en favorisant l'exposition de la chaîne principale hydrophobe à sa surface.

³³ Influence of Hydrophobic Teflon Particles on the Structure of Amyloid β -peptide. C. E. Giacomelli, W. Norde. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1719-1729.

Ces résultats sont encore préliminaires, et demandent à être vérifiés par des analyses par GPC("Gel Permeation Chromatography") des différents mélanges avec ou sans agitateur en *Téflon* et avec ou sans chauffage. L'imagerie par cryo-TEM dans ces différentes conditions serait également très informative. On peut également envisager d'étudier la possibilité de fonctionnaliser des surfaces de *Téflon* ou d'autres matériaux hydrophobes (billes de polystyrène, lysosomes, etc.) avec le glycopolymère **4a5b**. **Il est intéressant d'ajouter que ce polymère est fluorescent, et que sa détection à la surface des matériaux serait possible par microscopie de fluorescence.**

Caractérisation par chromatographie d'exclusion sur gel (GPC)

Les résultats obtenus par GPC (en utilisant l'eau comme solvant) sont résumés dans le tableau III2. Ces résultats montrent que les glycopolymères **4a5a**, et **4a5b** ont des poids moléculaires très élevés (supérieur à 500 000 D) ce qui en fait des objets polymériques intéressants, déjà de par leur taille. Les masses moléculaires obtenues pour **4b5a** et **4b5b** montrent également le caractère polymérique de ces glycopolymères. Les profils d'éluion des analyses GPC sur ces polymères sont présentés en annexe 3.

Tableau III2: Poids moléculaires des glycopolymères **4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, et **4b5b** déterminés par GPC sur des échantillons préparés dans D₂O à pD=4 et avec une concentration initiale en monomères de 5 mM.

	4a5a	4a5b	4b5b	4b5a
M _w (g.mol ⁻¹)	1.45*10 ⁶	1,86*10 ⁶	4.99*10 ⁴	3.28*10 ⁴
M _n (g.mol ⁻¹)	6.83*10 ⁵	6.28*10 ⁵	5.31*10 ⁴	3.52*10 ⁴
Polydispersité	2.12	2.96	1.07	1.07
M _w /M _n				

Ces mesures de GPC ont été effectuées sur des échantillons de polymères préparés 4 mois avant leur analyse. Nous avons préparé un échantillon de polymère **4a5b** dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment (5 mM en monomères, pD= 4) et effectué des mesures de poids moléculaires après des temps d'équilibration plus ou moins long.

Nous avons constaté que l'équilibration du polymère **4a5b** est lente à température ambiante. Le poids moléculaire M_w de **4a5b** passe de 8.95*10⁵ g.mol⁻¹, après 72 h d'équilibration à pD= 4, à un M_w de 1.35*10⁶ g.mol⁻¹ après 672 h (28 jours) d'équilibration à pD= 4. Cette dernière valeur est à comparer au M_w de 1.86*10⁶ g.mol⁻¹ mesuré après 4 mois d'équilibration à pD= 4.

La masse des polymères, donc leur longueur a augmenté au fil du temps. L'explication que nous pouvons proposer, se repose sur le fait que le polymère **4a5b** est ce

qu'on appelle un polymère vivant ("living polymer"). La réaction de polymérisation peut se poursuivre dans les conditions d'équilibration du polymère. De ce fait, même si il n'y a plus de monomère libre, les bouts de chaînes sont eux toujours réactifs, et peuvent continuer à polymériser, ce qui contribue à augmenter la masse des polymères. Mais la cinétique de ces réactions étant comme toute réaction chimique, fonction de la concentration, plus le degré de polymérisation est élevé, plus la concentration en chaînes individuelles baisse, ce qui entraîne un ralentissement progressif de la cinétique de polymérisation.

Caractérisation des polymères par diffusion des neutrons aux petits angles

Ces caractérisations ont été conduites au Laboratoire Léon Brillouin au CEA de Saclay en collaboration avec les physiciens Eric BUHLER et Jean CANDAU.

Introduction à la diffusion des neutrons

La diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA, en anglais: "SANS : Small Angle Neutron Scattering") est une méthode de caractérisation très puissante des macromolécules en solution car elle permet d'obtenir des infos structurales à des échelles d'observation comprises entre 10 et 300 Å. Lors d'une expérience de diffusion, un faisceau de neutrons incident de longueur d'onde λ est dirigé sur l'échantillon en solution.

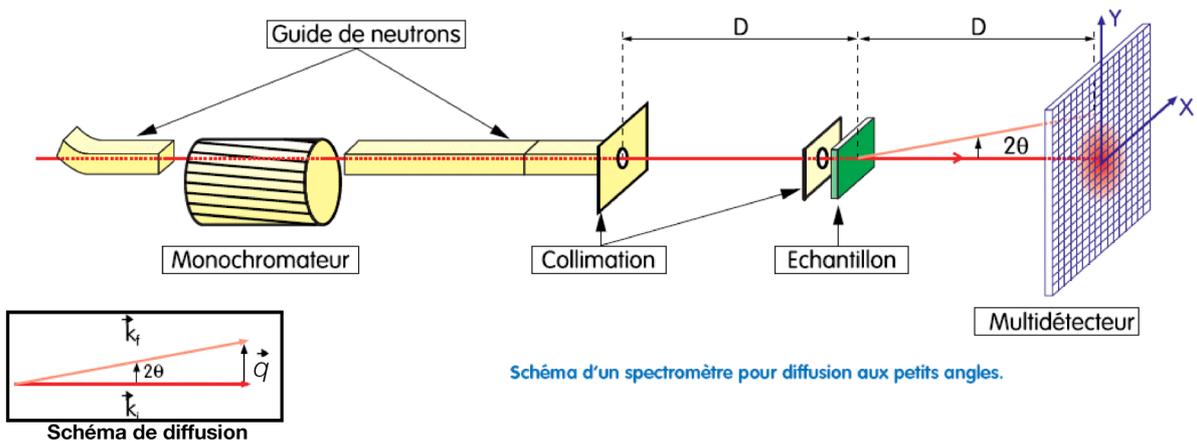


Schéma III3: Principe d'une expérience de diffusion de neutrons et du spectromètre de diffusion de neutrons aux petits angles. Le vecteur de diffusion Q est noté q dans le texte.

Lors d'une expérience de DNPA on mesure l'intensité du rayonnement diffusée par l'échantillon dans les différentes directions de l'espace $I(q)$ (le nombre de neutrons) en fonction du vecteur de diffusion q (Schéma III3) proportionnel à l'angle de diffusion θ . (équation 1) Les valeurs de D et de λ sont fixées par l'expérimentateur et permettent de faire varier q entre $3.2 \cdot 10^{-3}$ et $4.35 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. (Schéma III3)

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{équation 1})$$

L'expression habituelle de l'intensité absolue combine une fonction de diffusion de l'objet $S_1(q)$ qui prend en compte sa forme, et un terme d'interaction interparticulaires $S_2(q)$. L'expression du facteur de forme intraparticulaire $S_1(q)$ peut être écrite comme suit (équation 2):

$$S_1(q) = V_{\text{chaîne}} \phi P(q) \quad (\text{équation 2})$$

où $P(q)$ est le facteur de forme caractéristique de la conformation de la macromolécule dans notre cas et qui peut dépendre de la rigidité de la chaîne (rigide, flexible, semi-flexible, etc.) et ϕ est la fraction volumique du monomère, c'est-à-dire la concentration divisée par la densité.

L'expression de l'intensité absolue diffusée s'écrit alors (équation 3):

$$I(q)(\text{cm}^{-1}) = (\Delta\rho)^2(S_1(q)+S_2(q)) = (\Delta\rho)^2(V_{\text{chaîne}}\phi P(q) + S_2(q)) \quad (\text{équation 3})$$

où $(\Delta\rho)^2 = (\rho_{\text{monomère}} - \rho_{\text{solvant}})^2$ est le contraste par unité de volume entre le polymère et le solvant (D_2O dans notre cas). Il est déterminé en fonction de la composition chimique du monomère et du solvant. Les noyaux atomiques de tous les éléments sont de taille comparable avec celle des neutrons et capables d'interagir avec les neutrons selon une intensité tabulée, ce qui permet de calculer un facteur de contraste en connaissant la composition chimique élémentaire des espèces observées. La longueur diffractée par unité de volume ρ vaut: (équation 4)

$$\rho = \frac{\sum_i n_i b_i}{\sum_i n_i m_i v / N_A} \quad (\text{équation 4})$$

où N_A est le nombre d'Avogadro, n_i correspond au nombre d'atomes de l'élément i dans l'espèce (déterminé à partir de la formule brute), b_i représente la longueur de diffusion de l'espèce i (tabulée pour chaque élément), m_i la masse de l'espèce i et v le volume spécifique du monomère ou du solvant. Le volume des chaînes $V_{\text{chaîne}} = Nvm/N_A$ est le volume de N monomères de masse m . En régime dilué, à une fraction volumique inférieure à la fraction

volumique de recouvrement des chaînes ϕ^* , le signal diffusé peut être considéré comme provenant uniquement des chaînes isolées. Aux valeurs élevées de q , on peut considérer que $S_2(q)=0$ et donc que l'intensité diffusée est directement proportionnelle au facteur de forme des macromolécules: (équation 5)

$$I(q) = (\Delta\rho)^2 V_{\text{chaîne}} \phi P(q) \quad (\text{équation 5})$$

Analyse du glycopolymère 4a5b par DNPA

Nous avons soumis un échantillon du glycopolymère **4a5b** à une expérience de diffusion de neutrons. Le profil obtenu est représenté Figure III24:

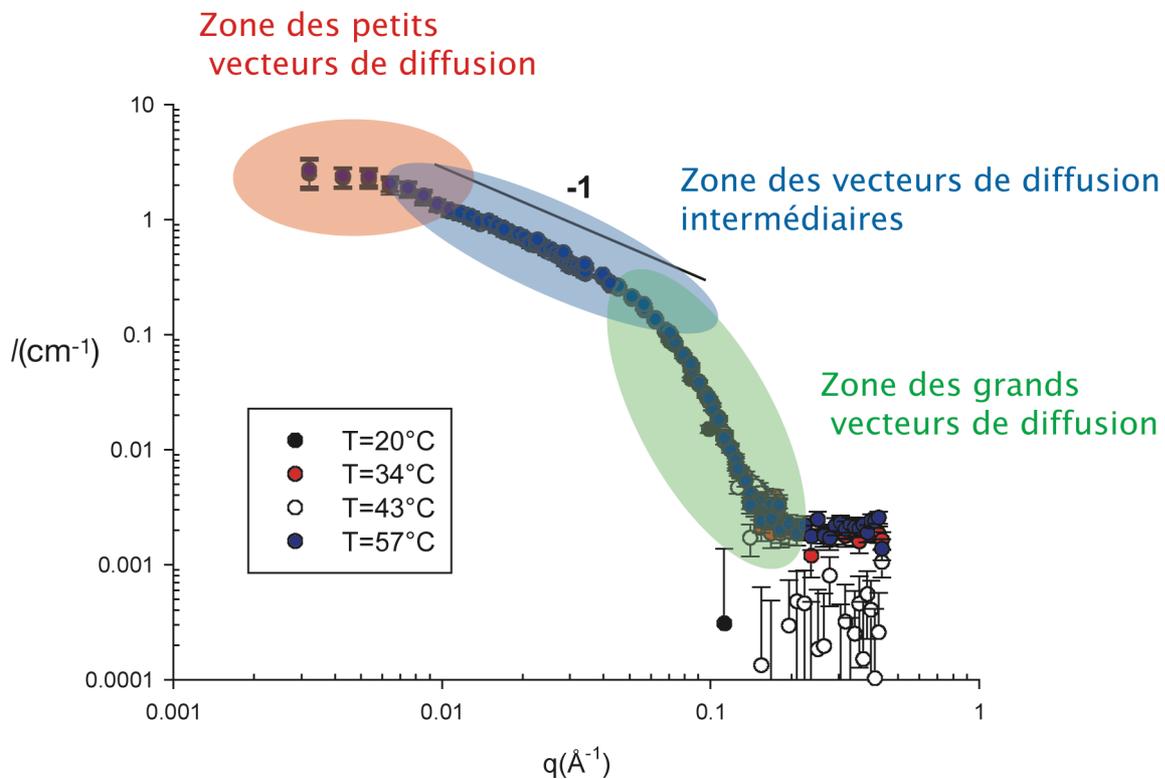


Figure III24: Profil de diffusion des neutrons (D_2O) d'un échantillon de **4a5b** à différentes températures, avec une concentration initiale en monomères de 5 mM à $pD=4$. Les différentes zones indiquées sont à rapporter dans le texte.

L'échelle d'observation est le module du vecteur de diffusion q qui a pour dimension l'inverse d'une distance. Plus q est petit plus l'échelle d'observation est grande, plus q est grand plus elle est petite. La figure III24 permet de distinguer 3 régimes caractéristiques distincts dans le profil de diffusion:

1. **Un régime de Guinier** dans la zone où $qR_g \ll 1$: Pour des vecteurs d'onde q plus petits, l'inverse de q est de l'ordre de grandeur du rayon de giration des particules de **4a5b**.

Cette zone de la courbe (en rouge Figure III24) nous permet de déterminer le rayon de gyration R_g ainsi que la masse des chaînes de polymères **4a5b**.

L'approximation de Guinier³⁴ permet de déterminer le rayon de gyration des chaînes polymériques R_g après avoir effectué une régression linéaire entre $I(q)^{-1}$ et q^2 . En effet pour les petites valeurs de q ($qR_g < 1$) on peut faire l'approximation suivante (équation 6):

$$\ln I(q) = \ln I(0) - R_g^2 q^2 / 3 \quad \text{ou}$$

$$I(q)^{-1} = I(q=0)^{-1} (1 + q^2 R_g^2 / 3) \quad (\text{équation 6})$$

La corrélation linéaire effectuée (Figure III25) on en retire une valeur de $R_g = 187 \text{ \AA}$ quelque soit la température de l'échantillon.

D'après l'équation de Benoit-Doty³⁵ pour les chaînes vermiformes de longueur de contour moyenne L et de longueur de persistance L_p on a la relation suivante (équation 7):

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{LL_p}{3} - L_p^2 + \frac{2L_p^3}{L} - \frac{2L_p^4}{L^2} \left(1 - \exp\left(\frac{-L}{L_p}\right) \right) \quad (\text{équation 7})$$

L'analyse du régime intermédiaire (voir page suivante) a montré que les chaînes de polymères **4a5b** adoptent une conformation en bâtonnet rigide ($L \ll L_p$), ce qui nous simplifier l'équation 7 et d'utiliser la relation suivante pour calculer L (équation 8): $L^2 = 12R_g^2$ ou

$$L = \sqrt{R_g^2 \times 12} \quad (\text{équation 8})$$

Cela nous donne une longueur de contour moyenne de 65 nm pour les bâtonnets du glycopolymère 4a5b.

³⁴ Small-Angle Scattering of X-Rays. A. Guinier, G. Fournet. Edition Wiley, New York 1955.

³⁵ Light Scattering from Non-gaussian Chains. H. Benoit, P. Doty. *J. Phys. Chem.* **1953**, 57, 958-963.

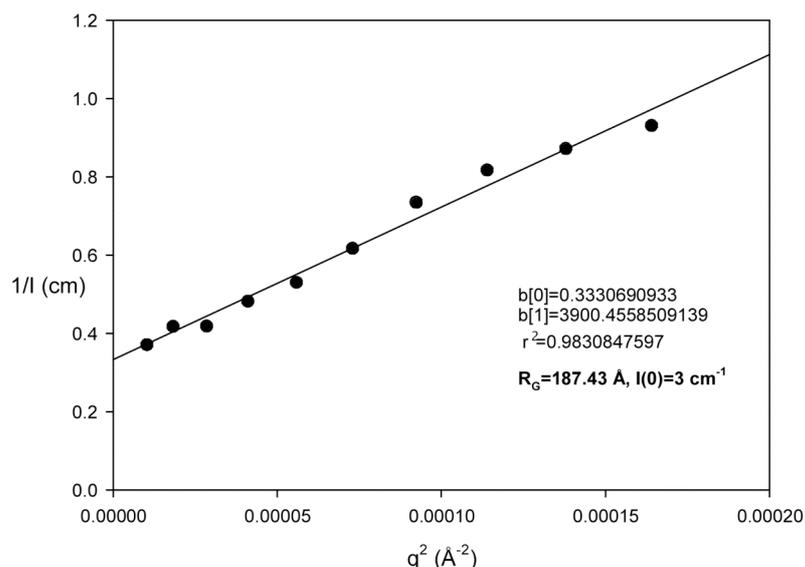


Figure III25: Corrélation linéaire entre $I(q)^{-1}$ et q^2 pour une mesure sur un échantillon de **4a5b** à pD=4, dans D_2O , avec une concentration initiale en monomères de 5 mM, à 57 °C. Les spectres sont indépendants de la température dans ces conditions, et dans le domaine étudié (25-57°C).

L'extrapolation l'intensité à $q=0$ dans le régime de Guinier nous permet également de déterminer la masse moléculaire M_w des polymères en utilisant la relation $M_w = [I(q=0)N_A] / [(\Delta\rho)^2 \phi v]$ où $(\Delta\rho)^2$ est le contraste par unité de volume (voir plus haut), et qui est déterminé à partir de la composition chimique (équation 4). ϕ est la fraction volumique du monomère, c'est-à-dire la concentration divisée par la densité et v le volume spécifique de l'unité monomérique, qui a été mesurée comme étant de $0.662 \text{ cm}^3/\text{g}$ à partir des densités des monomères **4a** ($d = 1.592$) et **5b** ($d = 1.43$) déterminées sur un pycomètre à hélium. **Le poids moléculaire moyen du polymère 4a5b calculé est de $511000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ce qui correspond à environ 275 unités monomériques avec une concentration initiale en monomères de 5mM à pD=4.**

2. Le régime intermédiaire dans la zone où $q^1 < R_g$: Cette zone du profil de diffusion nous renseigne sur la conformation locale du polymère. Pour des valeurs de q intermédiaires (zone en bleu Figure III24), l'intensité varie en loi de puissance q^{-1} , ce qui est caractéristique des polymères ayant une conformation en bâtonnet rigide. Si cet exposant avait été $5/3$ par exemple, cela aurait été la signature d'une chaîne polymérique en bon solvant. **Le polymère 4a5b a donc une conformation rigide, ce qui est une caractéristique habituelle des polymères ayant une conformation en goupillon.**³⁶

³⁶ a) On the Shape of Bottle-brush Macromolecules: Systematic Variation of Architectural Parameters. S. Rathgeber, T. Pakual, A. Wilk, K. Matyjaszewski, K. L. Beers. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 124904-124913. b) Bottle-brush Macromolecules in Solution: Comparaison Between Results Obtained from Scattering Experiments

3. **Le régime de Guinier de la section du polymère** correspond à la zone où $qR_c < 1$ si on note R_c le rayon de giration de la section du polymère. Pour les objets ayant une conformation en bâtonnet rigide, l'analyse de Guinier peut être effectuée pour déterminer le rayon de giration de la section R_c du bâton en utilisation la relation suivante: (équation 9)

$V_{chaîne}P(q) = I(q) = (a/q)\exp(-q^2b/2)$ avec $a = \pi S$ et $b = R_c^2$, S étant la section du polymère. (équation 9)

Après ajustement des données expérimentales (Figure III26) avec l'équation 9 pour les grands vecteurs d'ondes, pour lesquels $qR_c < 1$, (en vert Figure III24) on obtient une valeur de 17,3 Å pour le rayon de giration de la section du polymère cylindrique **4a5b**.

Cette donnée nous donne accès au diamètre d des chaînes polymériques sachant que pour un cylindre $d = \sqrt{8R_c}$. La valeur obtenue, $d = 48.9$ Å, est en accord avec les observations de cryo-TEM.

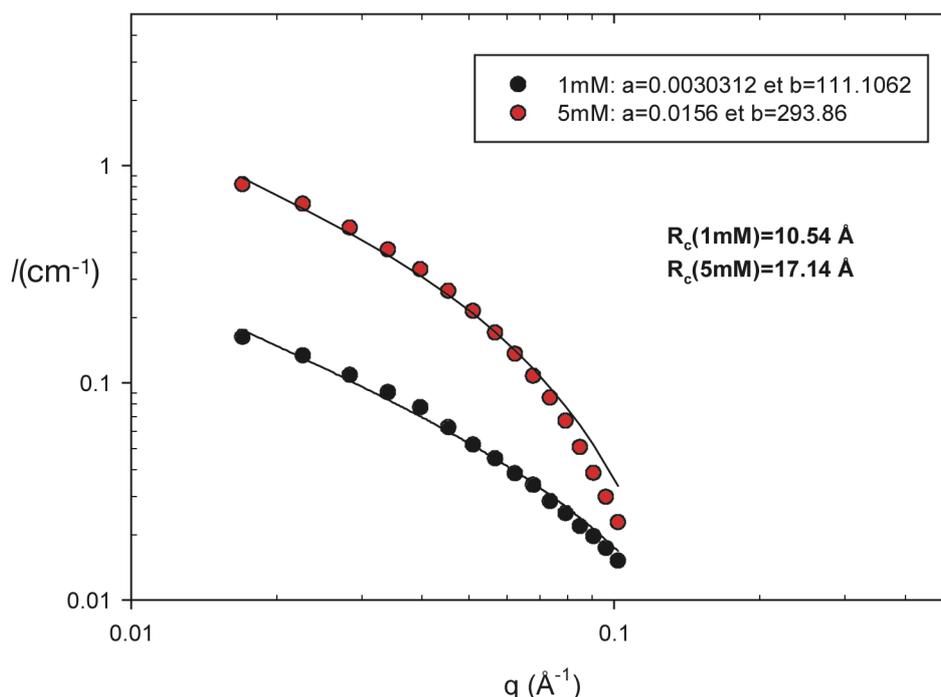


Figure III26: Corrélation exponentielle basée sur l'équation entre $I(q)$ et q pour une mesure sur un échantillon de **4a5b** à $pD=4$, dans D_2O , avec une concentration initiale en monomères de 5 mM ou 1 mM, à 57 °C. Les spectres sont indépendants de la température dans ces conditions, et dans le domaine étudié (25-57°C).

A faible concentration (1 mM) on constate une réduction de la valeur du R_c . Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de petits d'agrégats sphériques (Figure III20) qui pourraient tronquer la valeur calculée pour les polymères.

L'analyse du polymère **4a5b** par diffusion des neutrons aux petits angles nous a donc permis de déterminer avec précision la conformation, la longueur et la masse moléculaire de ce glycopolymère. Par contre, comme le montre la Figure III24, **l'effet de la température sur la longueur de 4a5b est négligeable dans le domaine de température étudié (25-57°C)**. Ce comportement n'est pas celui attendu pour un polymère réversible dont le poids moléculaire devrait varier avec la température en parallèle avec la variation de la constante d'association entre les monomères.³⁷ Ces variations devraient se traduire par une modification du profil de diffusion et de la valeur de $I(0)$ qui est une mesure directe du poids moléculaire. Nous n'avons pas observé de déplacement du plateau pour les petits vecteurs de diffusions pour l'échantillon de **4a5b** avec la température. Ces expériences ne permettent pas de conclure qu'il s'agit d'un polymère dynamique.

Démonstration du caractère dynamique

Comme les études par diffusion de neutrons aux petits angles n'ont pas donné la preuve que le polymère **4a5b** est réversible nous avons choisi d'effectuer des expériences d'échanges sur ce glycopolymère et de les suivre par RMN du ^1H .

Par expérience d'échange, nous entendons une modification de la composition du polymère **4a5b** après polymérisation, par l'introduction d'un ou de plusieurs monomères dans la chaîne polymérique initialement constituée de l'enchaînement de **4a** et **5b** par exemple. Si **4a5b** est dynamique, et si la formation d'acylhydrazone entre **4a** et **5b** est réversible, alors l'introduction dans le milieu réactionnel d'un deuxième monomère bis-hydrazide comme **4b**, devrait entraîner la formation d'acylhydrazone entre **4b** et **5b**, et donc générer un copolymère hybride **4a4b5b** contenant les trois monomères **4a**, **4b**, et **5b**. La formation de la nouvelle jonction acylhydrazone entre **4b** et **5b** devrait alors être observable par RMN du ^1H .

Les spectres des glycopolymères étudiés étant très larges en solution aqueuse, il n'a pas été possible de suivre l'apparition d'une nouvelle fonction acylhydrazone en suivant la réaction après l'ajout d'un équivalent de **4b** à une solution de **4a5b** dans le D_2O à $\text{pD}=4$. Par contre, on constate le relargage de **4a** sous forme libre. (Figure III27 signaux 1, 2 et 3) Cela veut donc dire que l'incorporation de **4b** dans le glycopolymère **4a5b** induit le remplacement

³⁷ Fibrillar Structure of Self-Assemblies Formed from Heterocomplementary Monomers Linked through Sextuple Hydrogen-Bonding Arrays. E. Buhler, S. J. Candau, J. Schmidt, Y. Talmon, E. Kolomiets, J.-M. Lehn. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2007**, 45, 103-115.

d'une partie des monomères **4a** par des monomères **4b** au sein de la structure polymérique. Les molécules de **4a** éjectées de la structure micellaire se retrouvent alors en solution, gagnent en mobilité, et sont alors à nouveau observables par RMN du ^1H . Après addition de **4b** à une solution de **4a5b** on observe bien l'apparition des signaux fins et bien définis 1, 2, et 3 qui correspondent respectivement aux signaux aromatiques et anomériques de **4a**. (Figure III27)

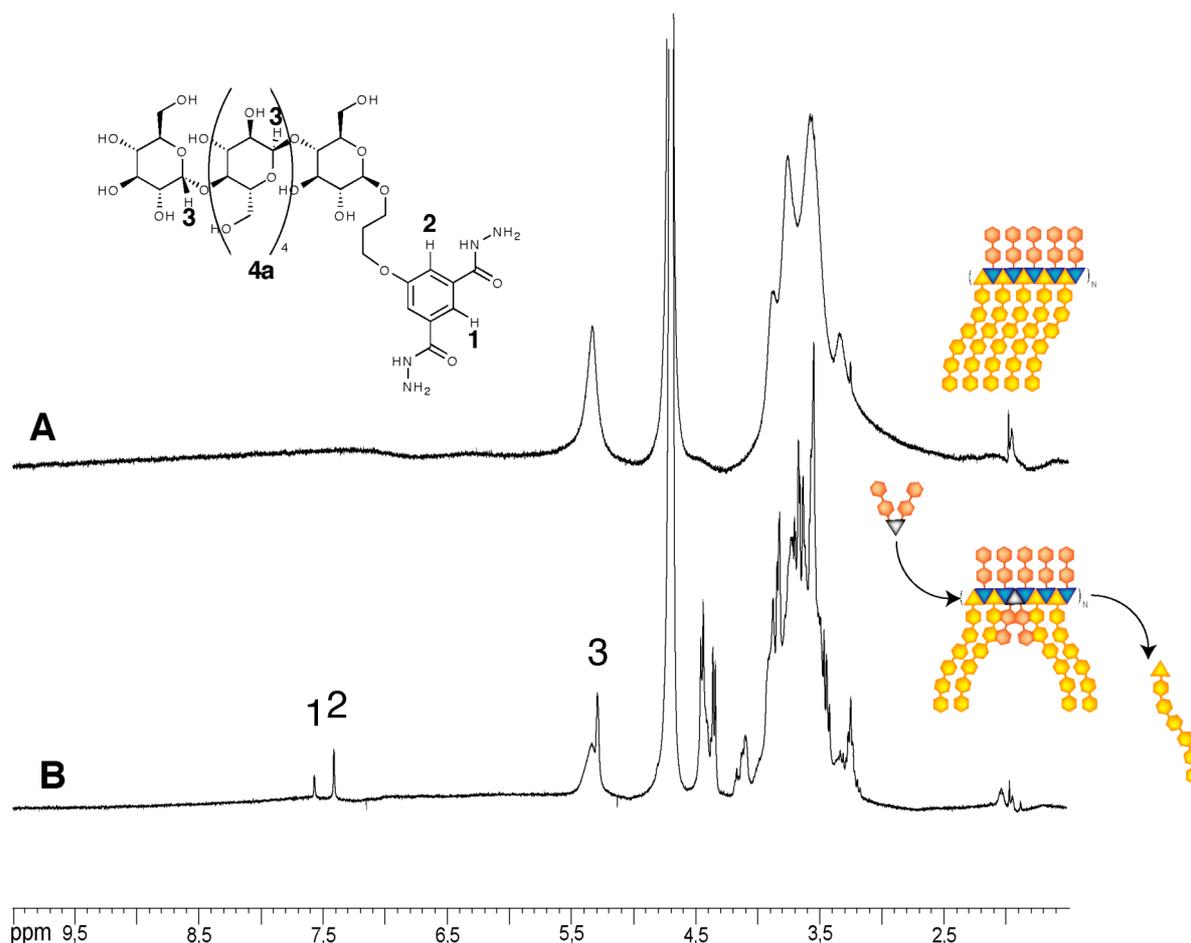


Figure III27: Spectre RMN du ^1H (D_2O) d'une solution du glycopolymère **4a5b** en milieu tamponné à $\text{pD}=4$ à une concentration initiale en monomère de 5 mM: **A** avant et **B** après addition d'un équivalent de **4b** (5 mM) et chauffage à $80\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 70 min. Les signaux 1, 2, 3 désignent les pics attribués aux protons aromatiques (1 et 2) et anomériques (3) de **4a**.

Du fait de la présence de signaux très larges, dus aux signaux aromatiques du polymère dans de D_2O , l'intégration des signaux attribués à **4a** dans le mélange est peu fiable, et il est par conséquent difficile de quantifier les échanges par cette méthode. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser la technique de dilution du mélange de glycopolymères dans le $\text{DMSO}-d_6$ pour dénaturer le polymère et d'ouvrir la structure en goupillon, ce qui rend les signaux des protons de la chaîne principale à nouveau visible en RMN du ^1H . Ainsi il est possible de suivre la cinétique d'échange et quantifier les proportions des différents

dihydrazides en solution ou incorporés dans le polymère. Nous avons suivi la réaction d'échange après ajout de **4b** à une solution de **4a5b** à pD=4 en prélevant à intervalles réguliers une petite quantité de milieu réactionnel pour la diluer six fois dans du DMSO- d_6 . **Cette dilution gèle les équilibres. En effet si on enregistre un nouveau spectre d'un échantillon préparé de cette manière 24h après la dilution, le spectre est identique à celui enregistré 2 min après la dilution. Il n'est donc pas nécessaire de neutraliser l'échantillon avant dilution de l'échantillon dans ces conditions.**

Si on compare le spectre RMN du ^1H du polymère **4a5b** dans le DMSO- d_6 /D $_2$ O 5/1 avant et après la réaction d'échange avec un équivalent de bis-hydrazide **4b**, on peut constater l'apparition de 2 singulets correspondants aux signaux des protons aromatiques de **4a**(Figure III28 **B** signaux 7 et 8) ainsi que l'apparition d'un nouveau signal d'imine, ce qui confirme l'incorporation de **4b** dans le polymère.(Figure III28 **B** signal 6) On peut quantifier cet échange par intégration relative des signaux du monomère **4b** libre par rapport à celui incorporé dans le polymère.³⁸ Le temps de demi échange, c'est à dire le temps nécessaire à l'incorporation de 50 % de la proportion finale de **4b** dans le polymère initial, est de 90 min à pD=4 à 80°C. A température ambiante ce temps de demi échange est de 1500 min (25 H).

A pD=7, les échanges sont trop lents pour être observés sur une échelle de temps raisonnable, en effet, après 3 semaines, aucune trace d'échange n'a pas être détectée par RMN du ^1H .

Une neutralisation du pD est donc un moyen efficace pour geler la composition du mélange. Ou d'un point de vue plus intéressant, dans des conditions physiologiques de pH, le glycopolymère **4a5b** peut être considéré comme non réversible, du moins sur une échelle de temps de l'ordre de 3 semaines.

³⁸ Un schéma permettant d'assigner les signaux est présenté en annexe 4 page 304.

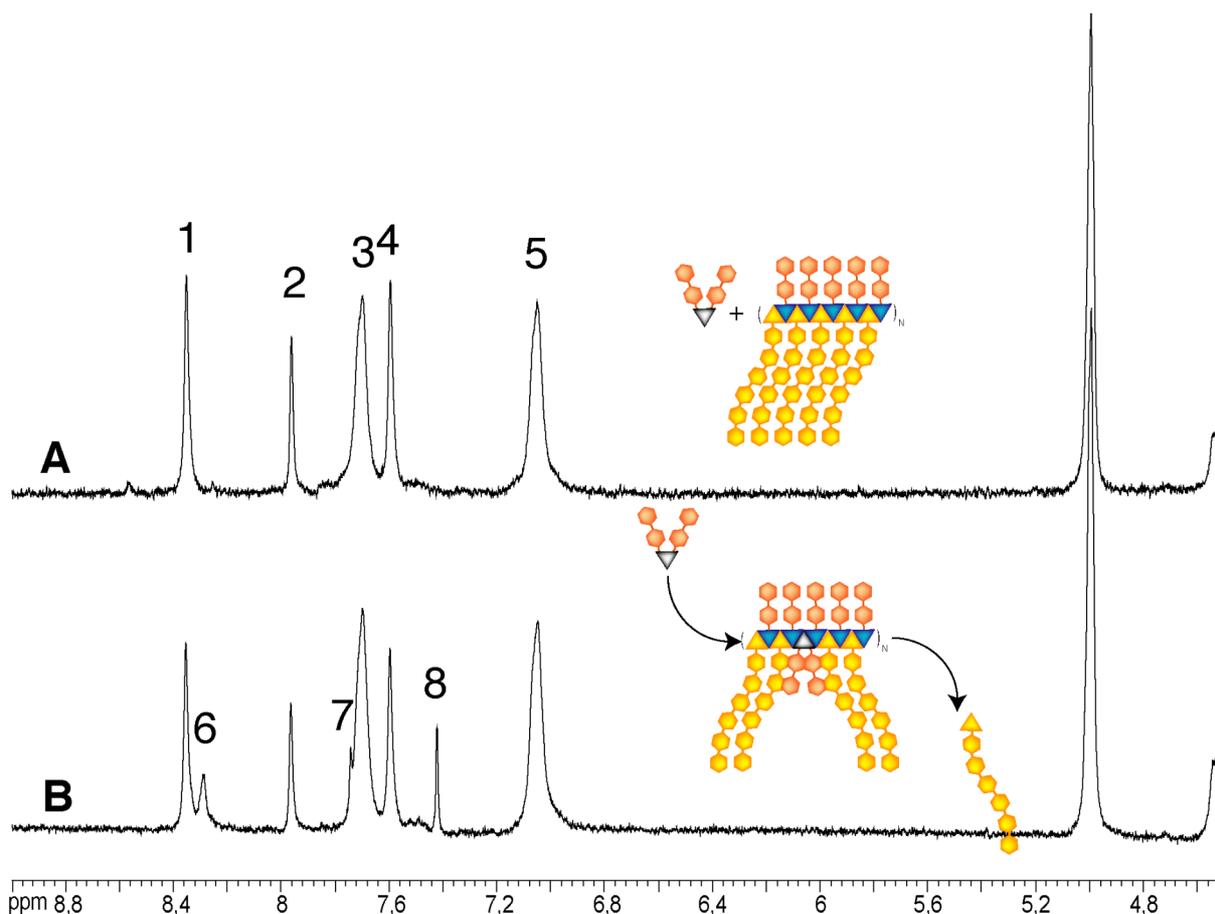


Figure III28: Zoom sur les spectres RMN du ^1H ($\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 5/1) obtenus après dilution de 100 μL d'une solution de **4a5b** (à $\text{pD}=4$ et 5 mM) avec 500 μL de $\text{DMSO-}d_6$, **A**: après quelques minutes et **B**: après équilibration suite à l'addition de 1 équivalent de **4b**.

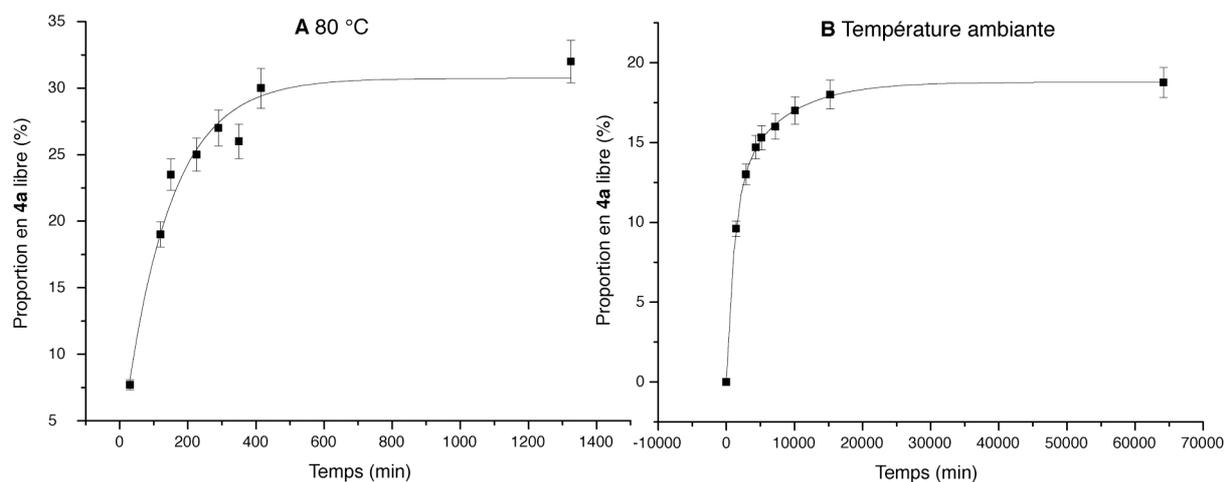


Figure III29: Evolution de la proportion de **4a** libre par rapport à **4a** incorporé dans le polymère **4a5b** après addition d'un équivalent de **4b** à $\text{pD}=4$ à 80°C (**A**) ou à température ambiante (**B**) avec une concentration initiale en monomères de 5 mM.

Etude des échanges par spectrométrie de fluorescence

Il est également possible de suivre la réaction d'échange entre le glycopolymère dynamique **4a5b** et **4b** par spectrométrie de fluorescence. La Figure III30 montre l'évolution

du spectre d'émission de fluorescence du polymère **4a5b** après ajout d'un équivalent de **4b**. Les spectres ont été enregistrés pour 2 longueurs d'onde différentes, celle correspondant au maximum d'excitation pour **4a5b** (393 nm à 80°C) et celle du maximum d'excitation du polymère mixte **4a4b5b** (419 nm à 80 °C).

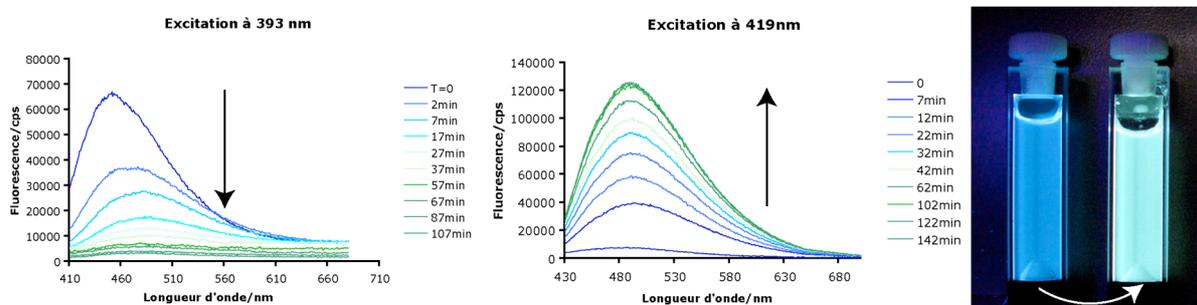


Figure III30: Evolution de l'émission de fluorescence du polymère **4a5b** après addition d'un équivalent de **4b** à pD=4, 80°C, et une concentration initiale en monomère de 5 mM. A gauche les spectres ont été enregistrés pour une longueur d'onde d'excitation 393 nm et à droite pour une longueur d'onde d'excitation de 419 nm. A droite on peut voir une photographie de deux échantillons du polymère **4a5b**, un avant (cuve de fluorescence de gauche) et l'autre après échange covalent avec **4b** (cuve de fluorescence de droite).

Les longueurs d'ondes maximums pour l'émission passent du bleu au vert du fait de l'incorporation de **4b** dans le polymère **4a5b**. Si on se réfère à la Figure III16 on comprend que ce décalage vers le vert est dû à la formation d'unités **4b5b** ($\lambda_{\text{max}} = 499$ nm pour l'émission) au sein du polymère **4a5b** qui devient donc un copolymère mixte **4a4b5b**. La modification de la constitution du polymère **4a5b** par réaction d'échange covalent avec le bis-hydrazide **4b** entraîne une modification des propriétés de fluorescence du polymère initial.

Glycopolymères dynamiques de deuxième génération

D'éventuelles applications en biochimie, comme par exemple une réorganisation constitutionnelle d'un glycopolymère en présence d'une lectine (Schéma III2), nous ont poussé à trouver des conditions dans lesquelles les échanges ont lieu à des vitesses raisonnables et dans des conditions douces. Pour le glycopolymère **4a5b**, pour obtenir des temps de demi-échange de l'ordre de l'heure (90 min) un chauffage important des solutions de glycopolymères (80°C) et un pH acide (pH=4) sont nécessaires. Il serait préférable de pouvoir conserver des vitesses d'échanges similaires à température ambiante, et à des pH proches de la neutralité, pH=6 par exemple.

L'option que nous avons choisie a été de remplacer les monomères dialdéhydes aromatiques **5a** et **5b** par les dialdéhydes aliphatiques fortement hydratés **25h** et **26h** qui ont été décrits et utilisés dans le chapitre II page 78 et 79.(Figure III31) De cette manière nous espérons réduire la constante d'association entre les monomères bis-hydrazides et dialdéhyde.

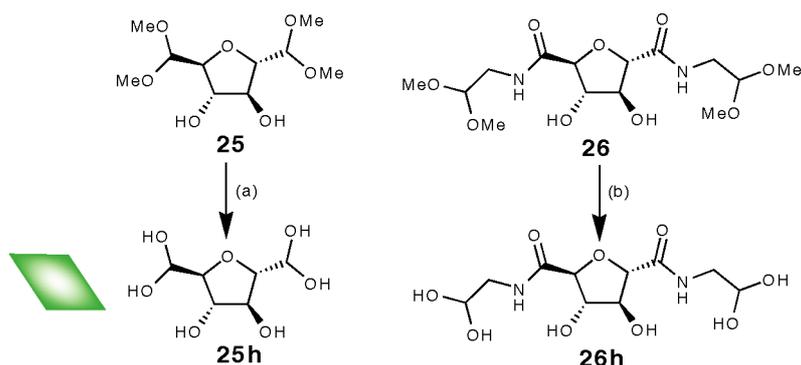


Figure III31: Structure moléculaires et représentation symbolique des monomères dialdéhydes aliphatiques **25h** et **26h** sous forme d'hydrates en solution aqueuse. La préparation de ces composés est décrite dans le chapitre II. (a) DCl, pD<1, D₂O, 50°C, 24h; (b) DCl, pD<1, D₂O, 30°C, 12h.

Pour vérifier notre hypothèse de l'effet destabilisateur de l'hydratation des fonctions aldéhydes sur la jonction acylhydrazone nous avons préparé le composé monoaldéhyde modèle **27h** à partir de son équivalent protégé par une fonction diméthylacétal **27**.(Figure III32)

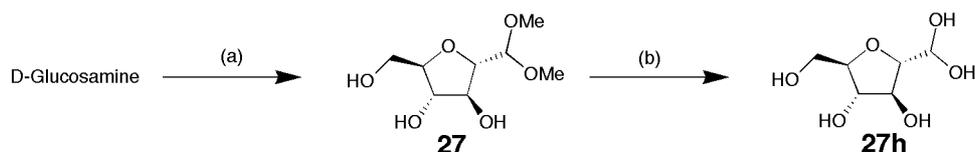


Figure III32: Synthèse du monomère **27h**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) (i) NaNO₂ (ii) triméthylorthoformate, *p*-toluenesulfonic acid, MeOH, 82 % sur 2 étapes; (b) pD<1, DCl, D₂O, 50 °C, 24h, *in situ*.

Nous avons ensuite mis en présence le monoaldéhyde **27h** et le dérivé bis-hydrazide **4a** pour tester l'efficacité de la réaction de polycondensation.(Figure III33) Cette réaction modèle doit permettre de déterminer le rendement de la réaction de polycondensation qui sera utilisée pour la préparation des glycopolymères de deuxième génération. Les résultats ont montré que la constante de formation d'acylhydrazone entre **27h** et **4a** est faible ($K=550 \text{ M}^{-1}$). En effet, si on effectue la réaction entre une quantité équivalente de **27h** (10 mM) et de **4a** (5 mM) à pD= 6, on obtient un mélange des composé **28** et **29**. Pour obtenir une conversion complète de **4a** en bis-acylhydrazone, un large excès de **27h** est nécessaire (**C** Figure III34). En ayant le spectre du composé **29** en référence, on peut alors assigner les signaux appartenant aux composés **28** et **29** et ainsi déterminer leurs concentrations relatives dans le mélange de **27h** (10 mM) et de **4a** (5 mM) à pD= 6 (**A** et **B** Figure III34). D'après les intégrations relatives des signaux 6, 7, et 2 Figure III34, nous avons déterminé les concentrations pour **4a** (0.6 mM), **28** (2.2 mM), et **29** (2.2mM). Les intégrations des signaux 3, et 4+10 Figure III permettent de déterminer la concentration en hydrate résiduel **27h** (3.4 mM). Si on considère que les 2 fonctions acylhydrazides de **4a** ont une réactivité

similaire et indépendante, on peut déterminer la constante de formation de la liaison acylhydrazone K contenue dans **28** et **29**. Les concentrations des différentes espèces à l'équilibre sont toutes connues, ce qui permet de calculer la concentration en fonctions aldéhydes ($[27h]$) et hydrazides libres ($2[4a]+[28]$) ainsi que la concentration en fonctions acylhydrazones ($[28]+2[29]$)

La constante d'équilibre K de la réaction de formation d'acylhydrazone à $pD=6$ et à $25^{\circ}C$ est donc:

$$K = \frac{[28] + 2[29]}{([27h])(2[4a] + [28])} = \frac{(2.2 \times 10^{-3}) + 2(2.2 \times 10^{-3})}{(3.4 \times 10^{-3})(2(0.6 \times 10^{-3}) + (2.2 \times 10^{-3}))} = 550 \text{ M}^{-1}$$

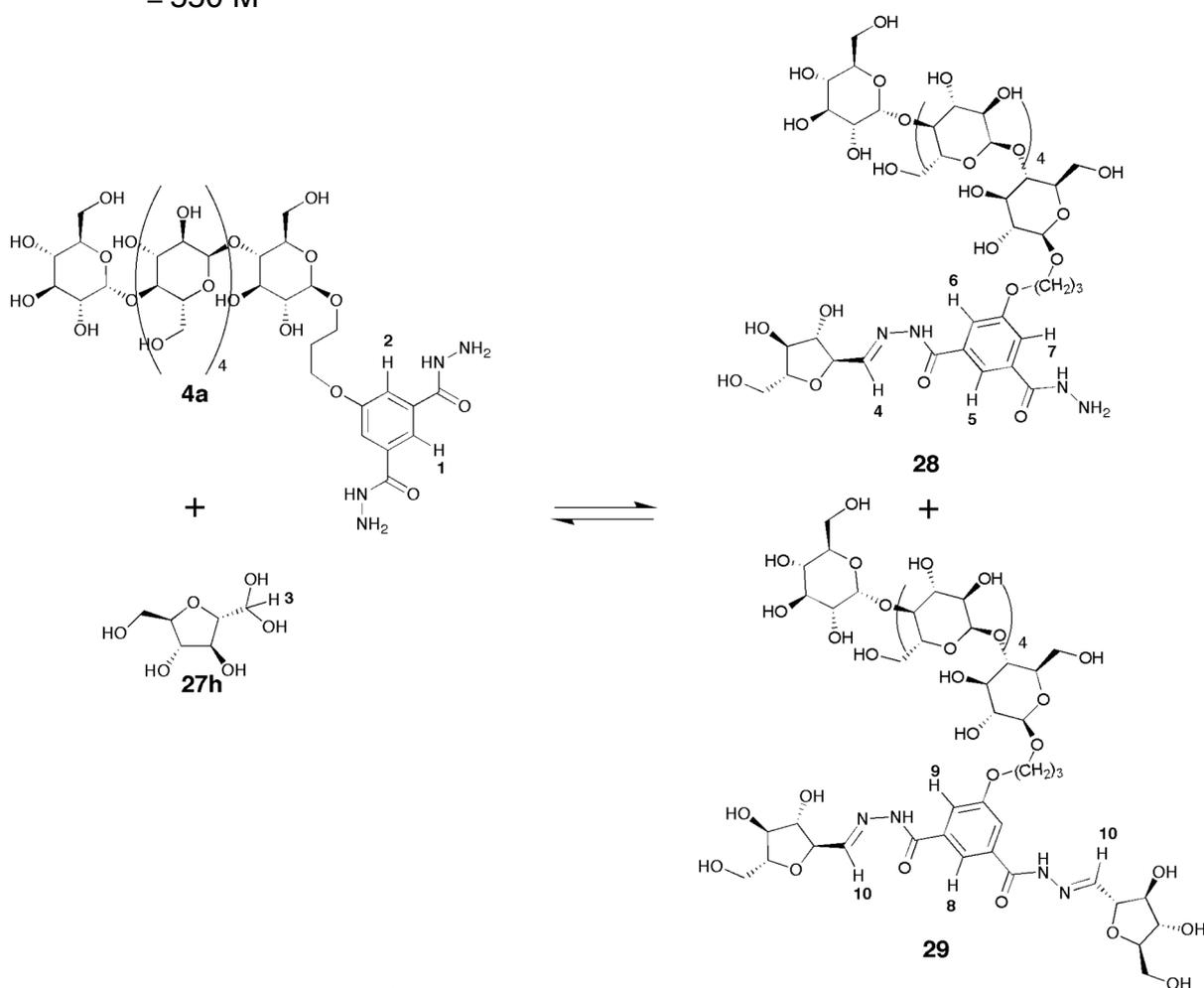


Figure III33: Réaction de condensation entre **27h** et **4a** pour former le trimère modèle **29**. Cette réaction étant équilibrée, la formation de **28** a été observée. Les références pour l'attribution des signaux sont utilisées Figure III34.

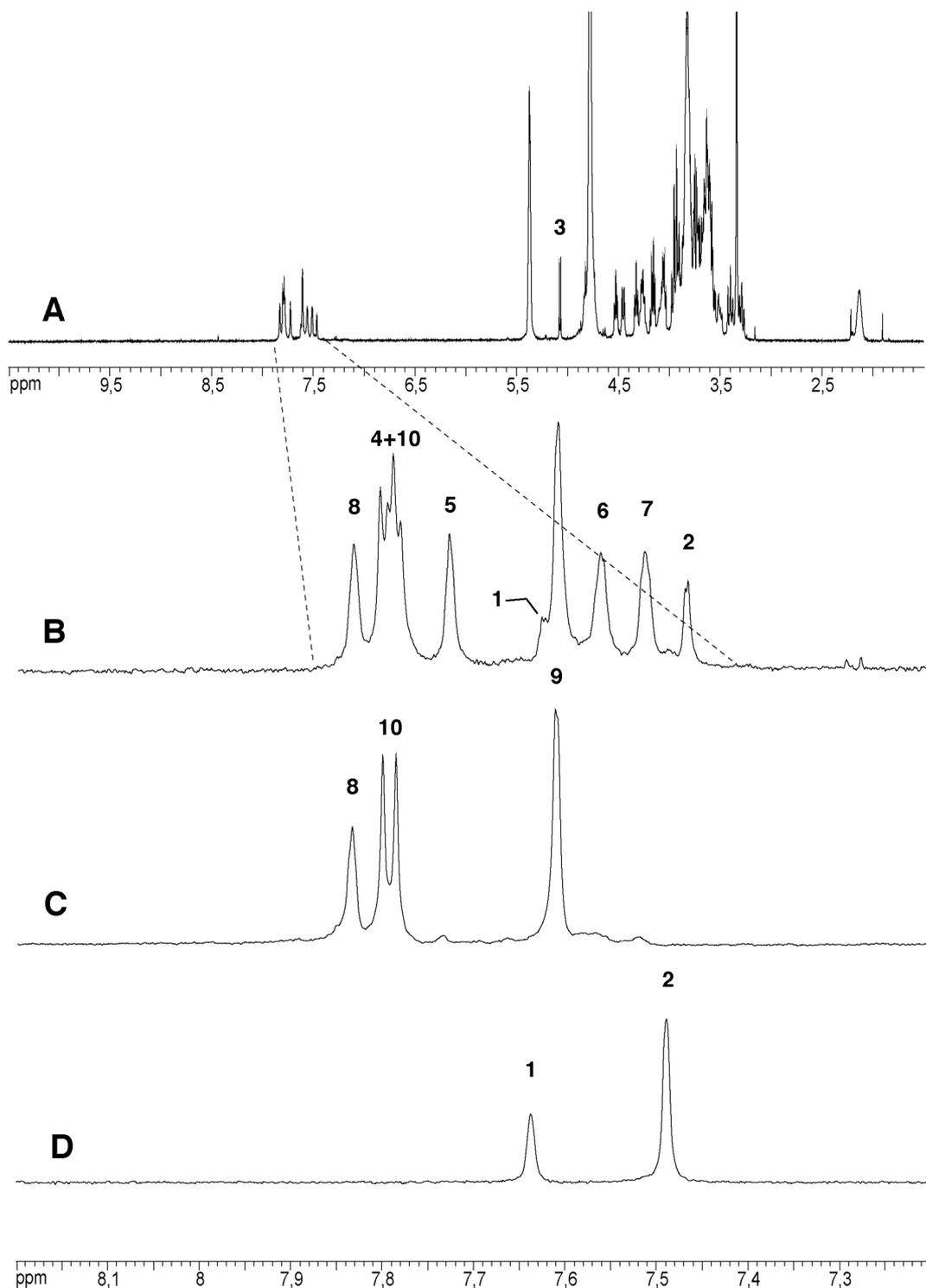


Figure III34: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction entre **27h**(10 mM) et **4a**(5mM) à pD=6. **B** Zoom sur la région des signaux hydrazones et aromatiques du spectre **A**, les attributions sont à rapporter Figure III33 et dans le texte. On constate qu'il s'agit bien d'un équilibre entre **27h** et **4a** pour former un mélange de **28** et **29**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction entre un large excès de **27h**(72 mM) et **4a**(5mM) à pD=5, le composé **29** est largement majoritaire dans ces conditions. **D** Zoom sur la région des signaux aromatiques du spectre RMN du ^1H (D_2O) de **4a**.

Par analogie avec **27h**, la constante de formation de la jonction acylhydrazone entre **4a**, **4b**, et **25h** devrait donc être faible, ce qui favoriserait la réversibilité des polymères basés sur cette jonction.

En connaissant la constante de formation de la jonction acylhydrazone entre **25h** et **4a** on peut extrapoler le poids moléculaire théorique du polymère qui résulterait de la polycondensation des ces deux monomères **4a25h** à l'aide d'un modèle de polymérisation isodesmique d'un monomère *A* avec une constante d'association $K= 550 \text{ M}^{-1}$ identique quelle que soit la longueur de la chaîne.³⁹ Si on connaît les concentrations initiales en monomères c_i on peut alors écrire les équations suivantes:

$$K[A] = 1 + \frac{1}{2Kc_i} - \sqrt{\frac{1}{Kc_i} + \frac{1}{4(Kc_i)^2}}$$

où $[A]$ est la concentration résiduelle en monomère *A* à l'équilibre.

Ce qui permet d'estimer le degré de polymérisation moyen en nombre $\langle dp \rangle_n = 1/(1 - K[A]) = 2.9$ pour **4a25h** avec une concentration initiale en monomères de 10 mM et $K= 550 \text{ M}^{-1}$. La polycondensation de **4a** et **25h** devrait donc donner lieu à la formation d'oligomères très courts.

Nous avons ensuite synthétisé les polymères **4a25h**, **4a26h**, **4b25h**, et **4b26h** par polycondensation des monomères bis-hydrzides **4a** et **4b** avec les dialdéhydes **25h** et **26h** en milieu aqueux à un pH compris entre 4 et 7. (Figures III35 à III42) A un pH supérieur à 7 la polymérisation est trop lente pour être observée.

³⁹ a) Nucleation-elongation: A Mechanism for Cooperative Supramolecular Polymerisation. D. Zhao, J. S. Moore. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3471-3491. b) Comparisons of Indefinite Self-Association Models. R. B. Martin. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3043-3064.

Préparation des glycopolymères dynamiques de deuxième génération

On observe bien la polycondensation par RMN du ^1H , et les spectres obtenus pour ces polymères **4a25h**, **4a26h**, **4b25h**, et **4b26h** sont similaires à ceux des précédents glycopolymères **4a5a**, **4a5b**, **4b5a**, et **4b5b** avec un net élargissement des signaux aromatiques. Bien que dans le cas des polymères **4b25h** et **4b26h** on peut clairement identifier la formation d'acylhydrazone en solution aqueuse (signaux 4 Figures III39 et III41 **C**), il est possible comme précédemment diluer les solutions aqueuses des polymères dans le DMSO- d_6 pour obtenir des spectres de meilleure qualité. (Figure III35 **D**)

Pour ces quatre polymères une petite proportion de signaux d'hydrates résiduels est toujours observable après la polymérisation, ce qui est une bonne indication que les polymères sont réversibles. (Figure III35 **C** signal 9; Figure III37 **C** signal 6; Figure III39 **C** signal 5; Figure III41 **C** signal 5)

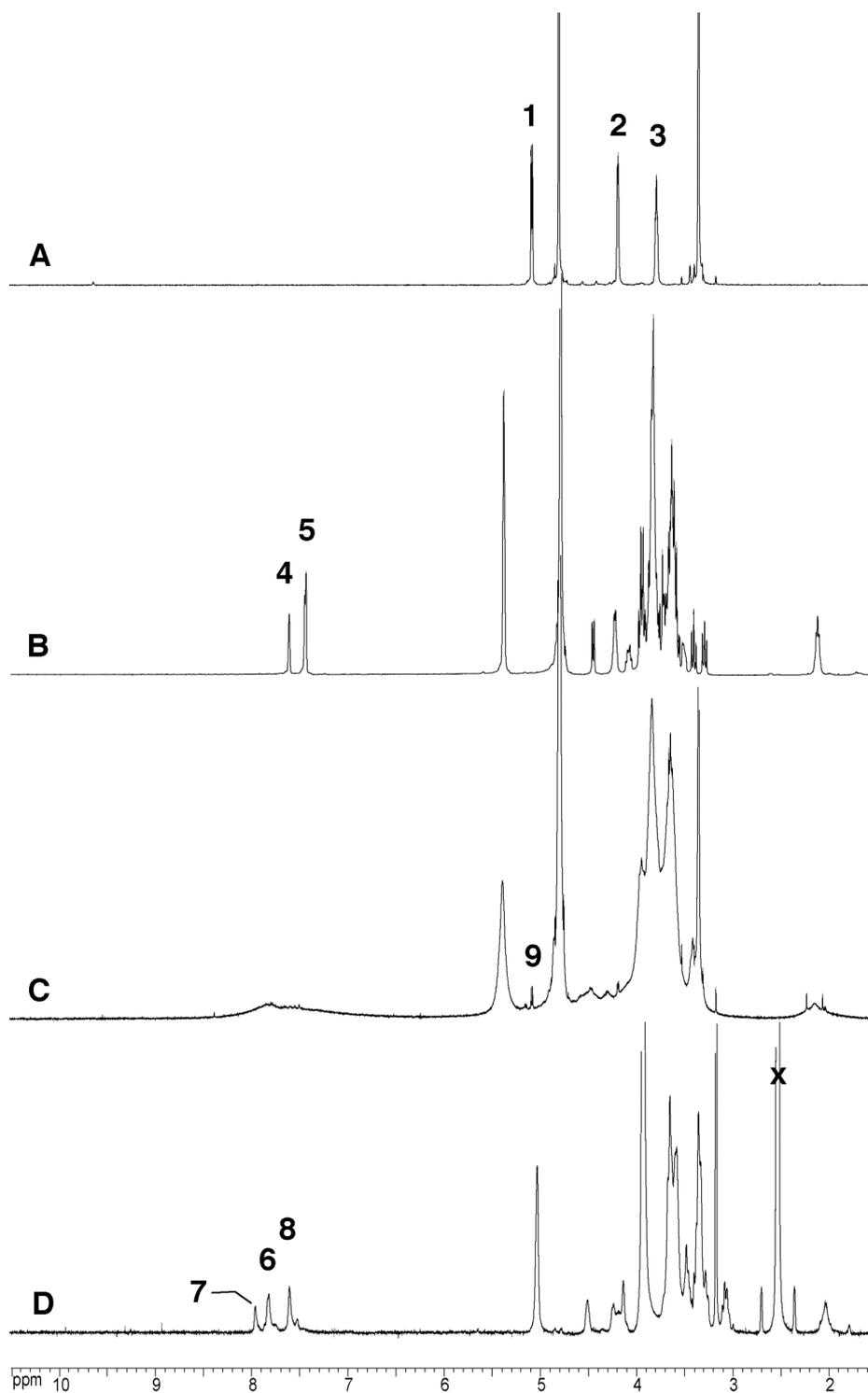


Figure III35: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **25h**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **4a**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère **4a25h** à une concentration en monomères de 10 mM, et à $\text{pD}=5$. **D** Spectre RMN du ^1H ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$ 5/1) obtenu après dilution de 100 μL de la solution précédente du polymère **4a25h** dans 500 μL de $\text{DMSO}-d_6$. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III36.

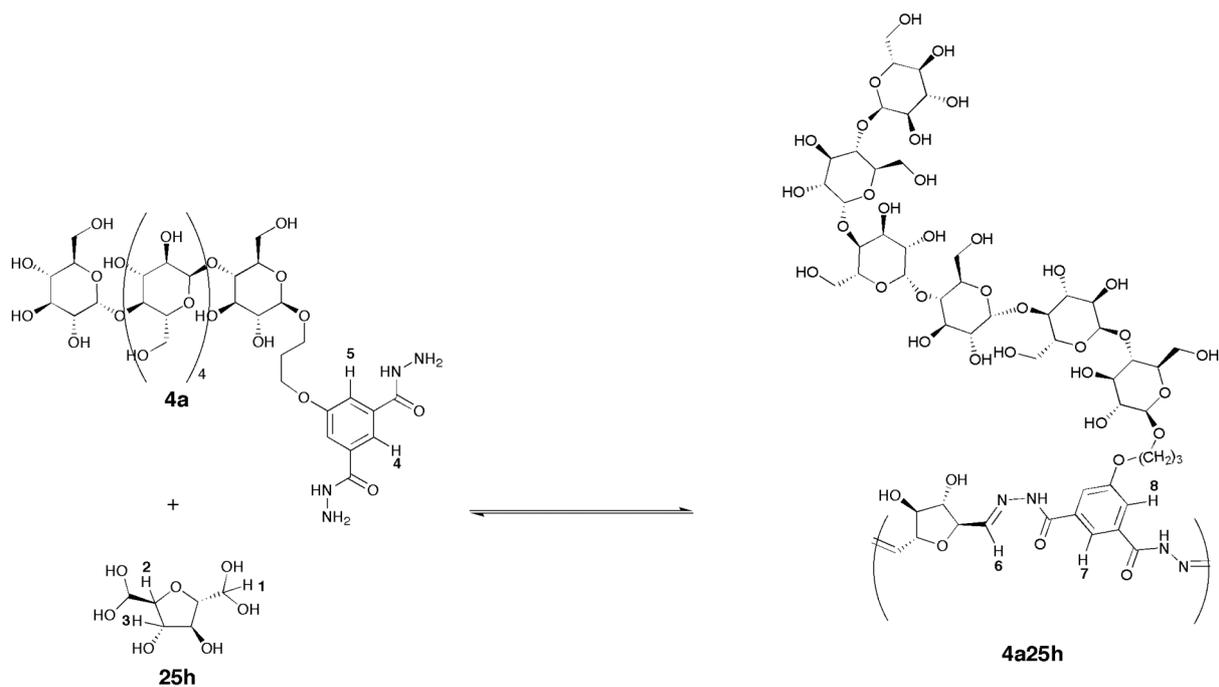


Figure III36: Préparation du glycopolymère dynamique **4a25h** par polycondensation des monomères **4a** et **25h**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III35.

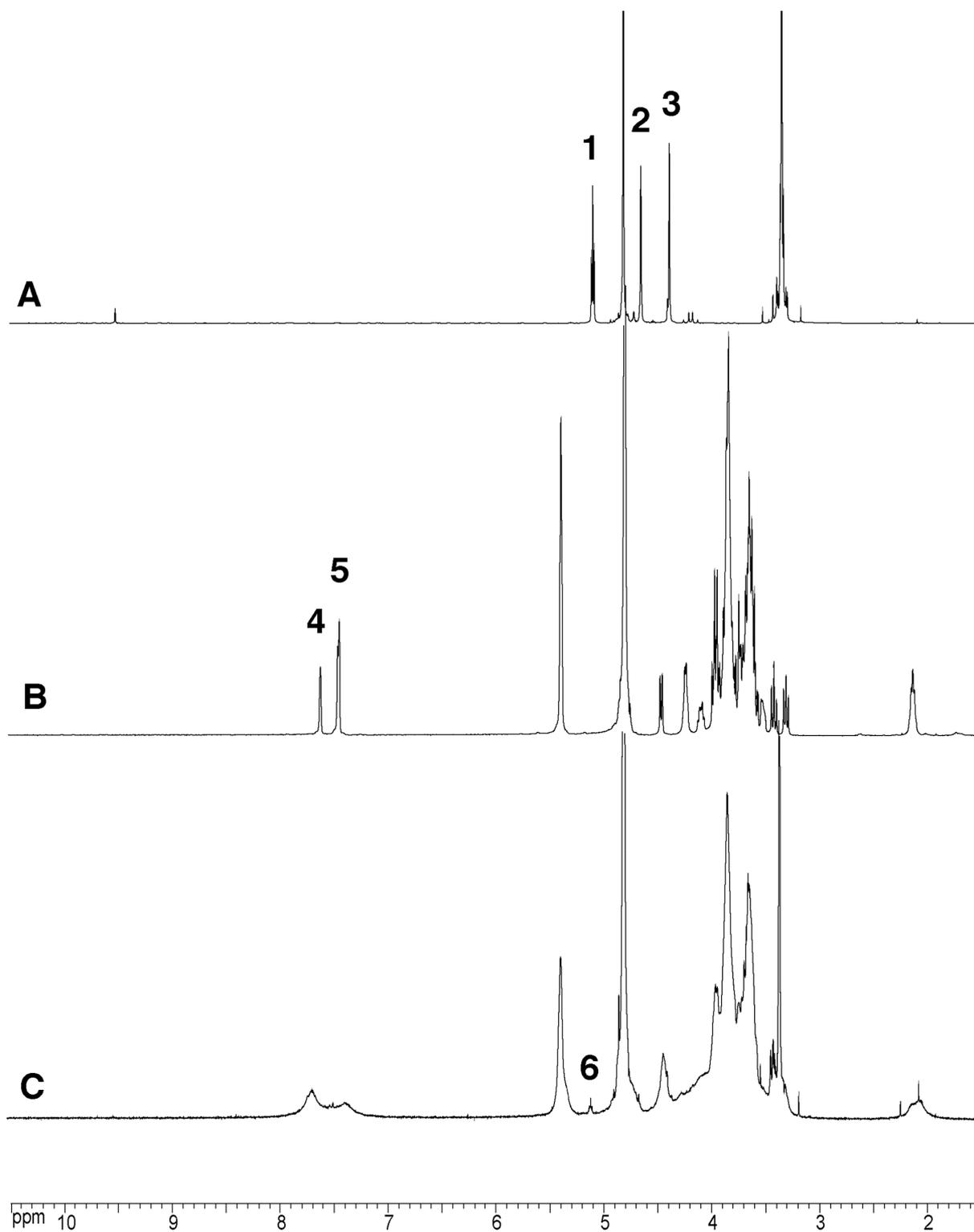


Figure III37: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **26h** **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **4a**. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère **4a26h** à une concentration en monomères de 10 mM, et à pD=5. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III38. Le signal 6 correspondrait aux hydrates résiduels à l'extrémité des polymères.

CHAPITRE III: Glycopolymères Dynamiques

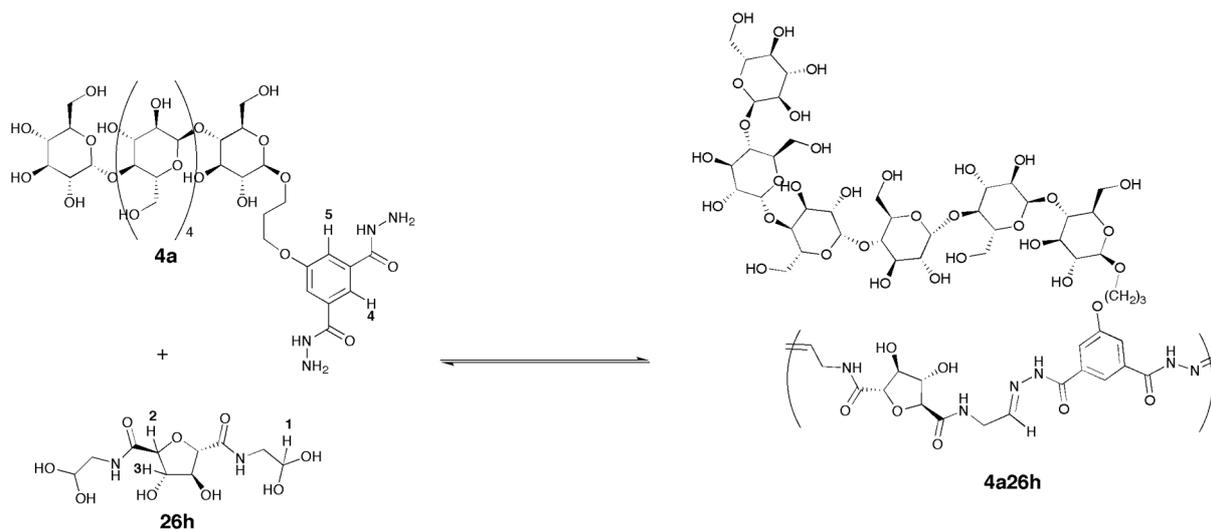


Figure III38: Préparation du glycopolymère dynamique 4a26h par polycondensation des monomères 4a et 26h. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III37.

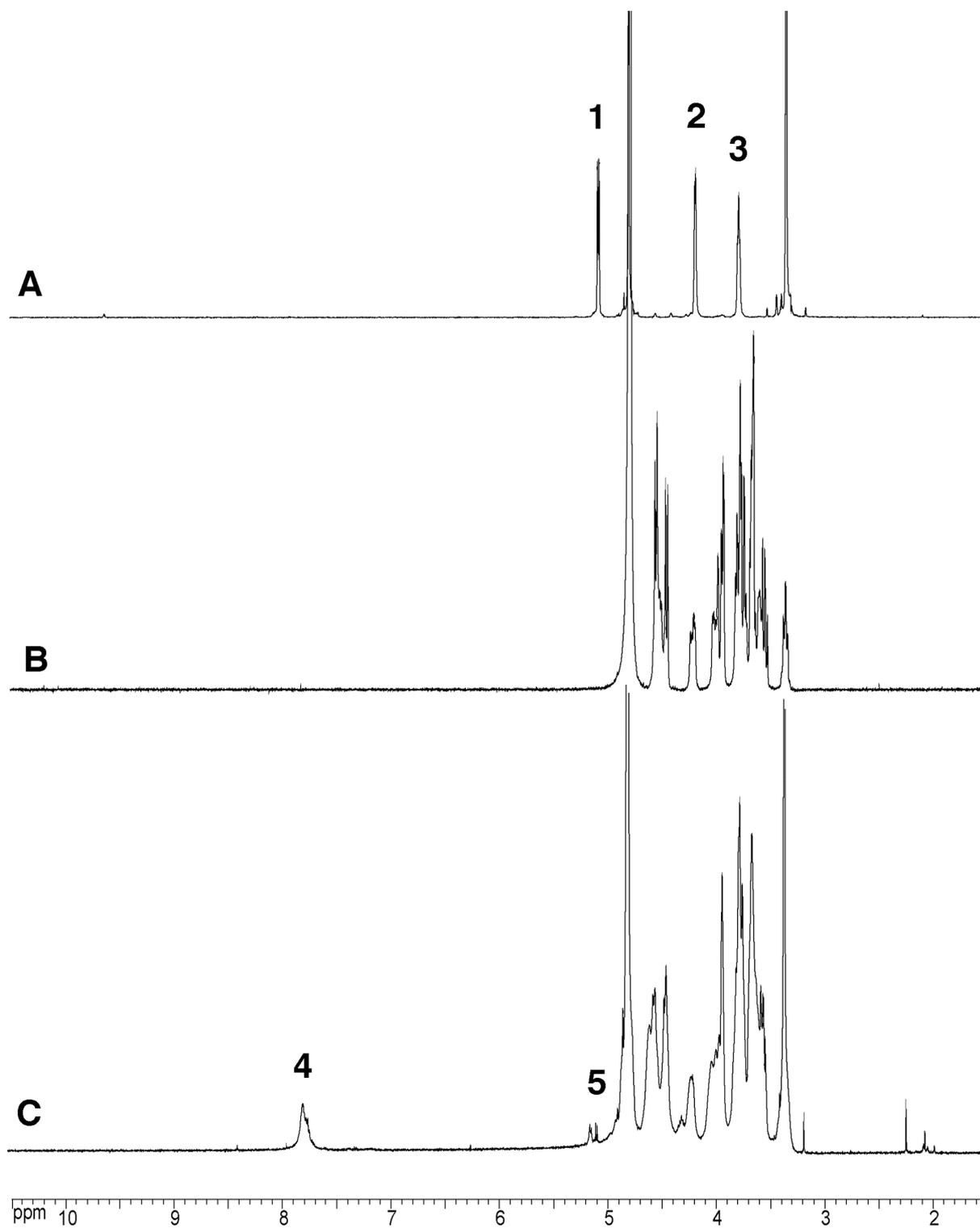


Figure III39: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **25h** **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **4b**. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère **4b25h** à une concentration en monomère de 10 mM, et à pD=5. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III40. Le signal 5 correspondrait aux hydrates résiduels à l'extrémité des polymères.

CHAPITRE III: Glycopolymères Dynamiques

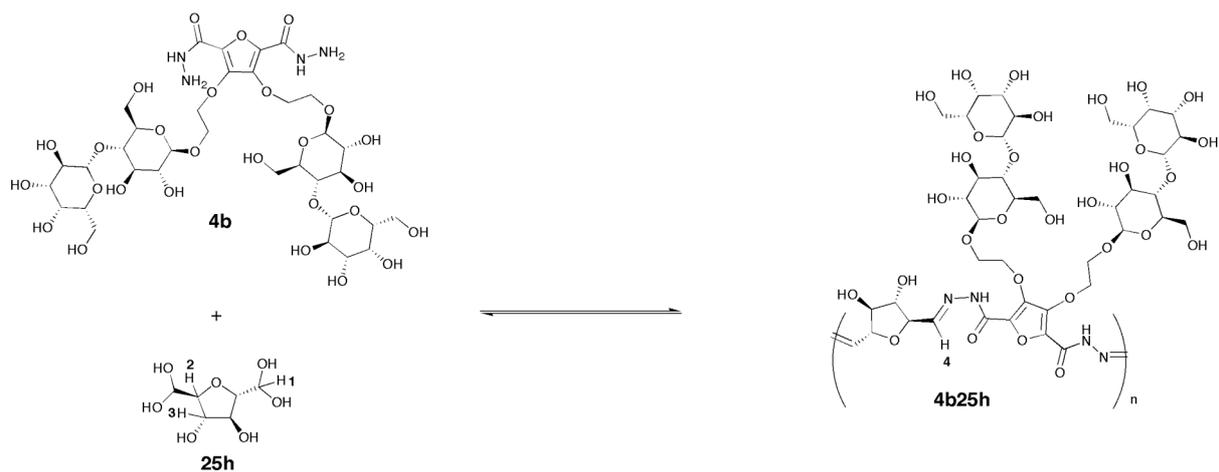


Figure III40: Préparation du glycopolymère dynamique **4b25h** par polycondensation des monomères **4b** et **25h**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III39.

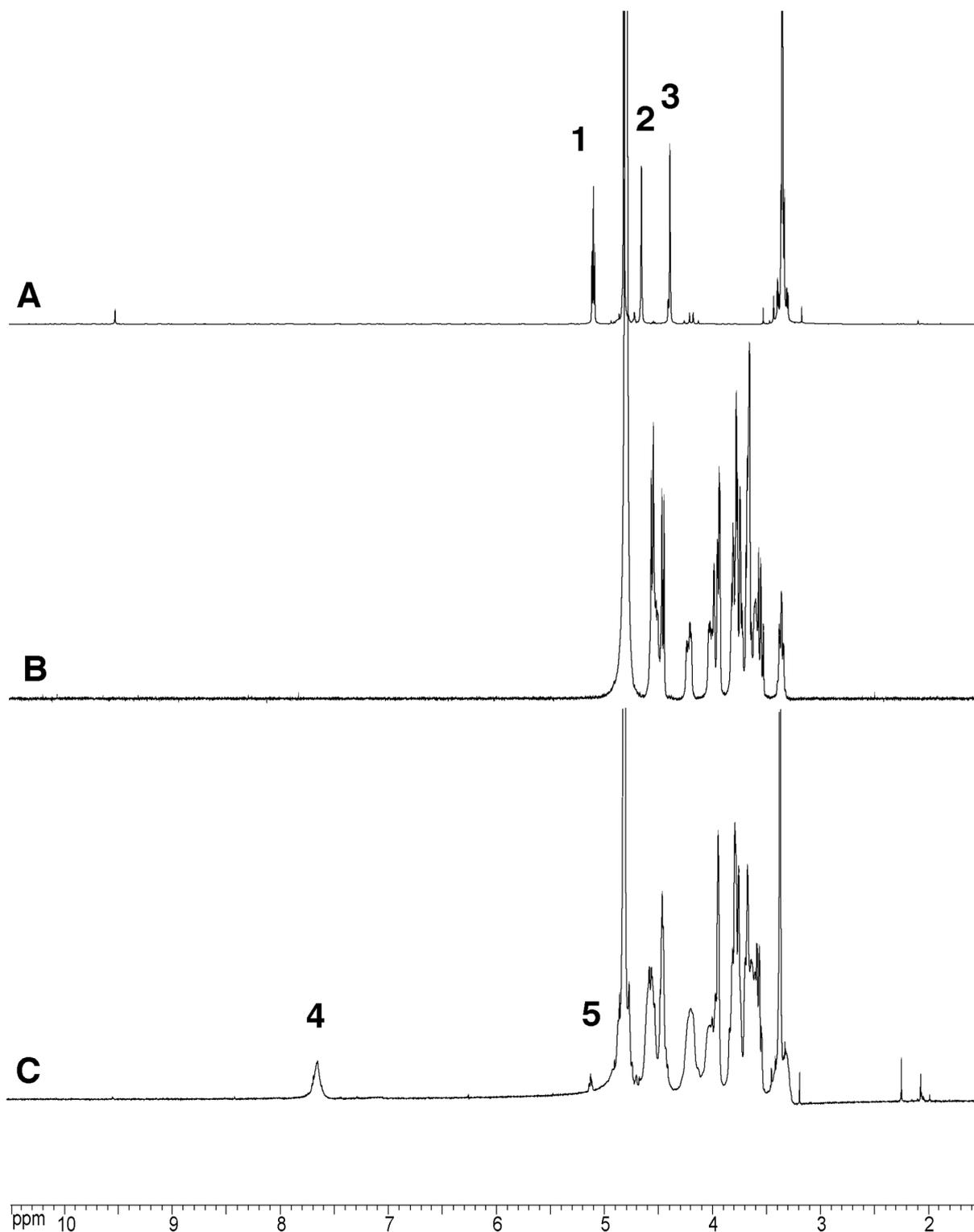


Figure III41: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **26h** **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **4b**. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère **4b26h** à une concentration en monomère de 10 mM, et à pD=5. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans la Figure III43. Le signal 5 correspondrait aux hydrates résiduels à l'extrémité des polymères.

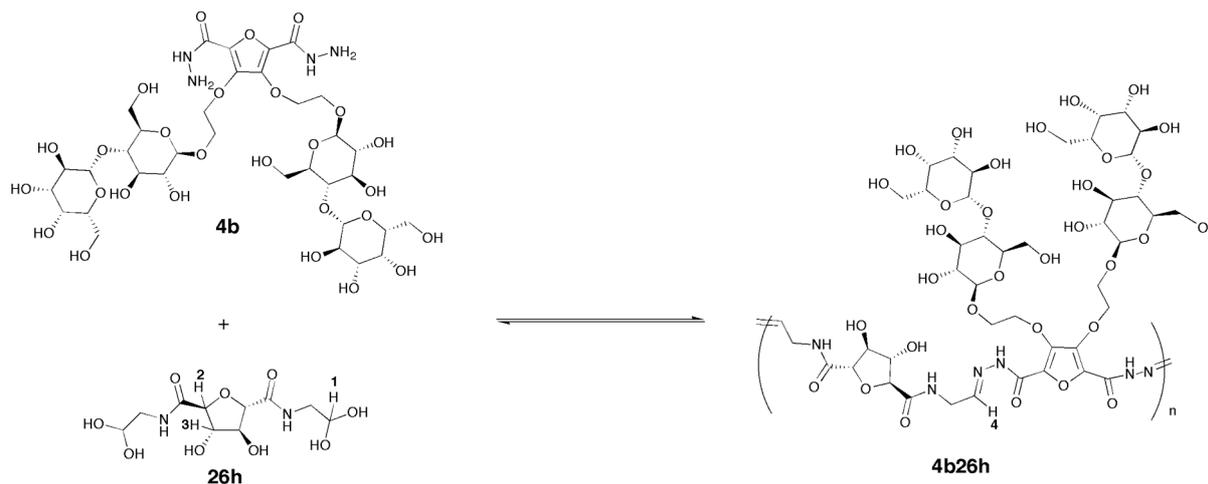


Figure III42: Préparation du glycopolymère dynamique **4b26h** par polycondensation des monomères **4b** et **26h**. Les indices d'attribution des protons sont à rapporter dans la Figure III41.

Etude de fluorescence des glycopolymères dynamiques de deuxième génération

Après les propriétés de fluorescence observées pour les glycopolymères préparés à partir de dialdéhydes aromatiques nous avons été surpris de constater que les polymères préparés à partir des dialdéhydes **25h** et **26h** sont également fluorescents. (Figure III43) Les quatre combinaisons de monomères montrent toutes des émissions de fluorescence avec des maximums d'émissions dans le bleu pour les deux glycopolymères qui intègrent le bis-hydrazide **4a**, et dans le vert pour les deux combinaisons qui intègrent de bis-hydrazide **4b**. Les longueurs d'onde maximums pour l'excitation et l'émission des glycopolymères dynamiques de seconde génération sont indiquées dans le Tableau III3.

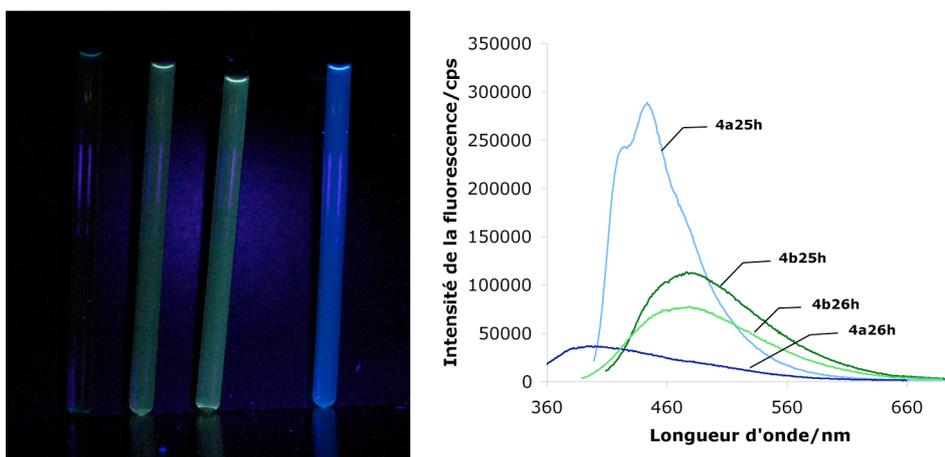


Figure III43: *gauche*: photographie d'échantillons des polymères **4a26h**, **4b26h**, **4b25h**, **4a25h** sous irradiation UV (365 nm) dans D_2O à $pD=5$ avec une concentration initiale en monomères de 10 mM; *droite*: Spectres d'émissions des mêmes échantillons de polymères.

Tableau III3: Longueurs d'ondes maximums pour l'émission de fluorescence et l'excitation pour les glycopolymères **4a25h**, **4b25h**, **4a26h**, et **4b26h**.

	4a25h	4b25h	4a26h	4b26h
Longueur d'onde maximum pour l'excitation (nm)	383	396	339	376
Longueur d'onde maximum pour l'émission (nm)	444	488	427	494

Ce n'est donc pas l'extension de conjugaison lors de la formation d'acylhydrazone aromatiques qui est responsable de l'intensité de la fluorescence des glycopolymères dynamiques présentés ici, mais certainement une conformation particulière dans laquelle les chromophores aromatiques de **4a** et **4b** sont isolés de la phase aqueuse dans un environnement hydrophobe.

Caractérisation du polymère 4a25h par cryo-TEM

Comme nous avons pu le constater par des études de cryo-TEM, le remplacement du dialdéhyde **5b** par le dialdéhyde **25h** dans la structure du polymère **4a5b** a radicalement modifié les caractéristiques du glycopolymère obtenu **4a25h**. Un échantillon du glycopolymère **4a25h** a été soumis à une analyse par cryo-TEM à partir d'une solution dans le D₂O, à pD=5, et avec une concentration initiale en monomères de 10 mM. Les filaments observés pour **4a5b** ne sont plus présents. Seul des structures ellipsoïdales sont visibles. La longueur moyenne de l'axe transversal de ces objets est de $39 \text{ \AA} \pm 5 \text{ \AA}$, ce qui est proche du diamètre des filaments individuels du polymère **4a5b**.(Figure III44) **Cela suggère que c'est la longueur des chaînes latérales oligosaccharide de 4a qui détermine la section du polymère 4a25h.**

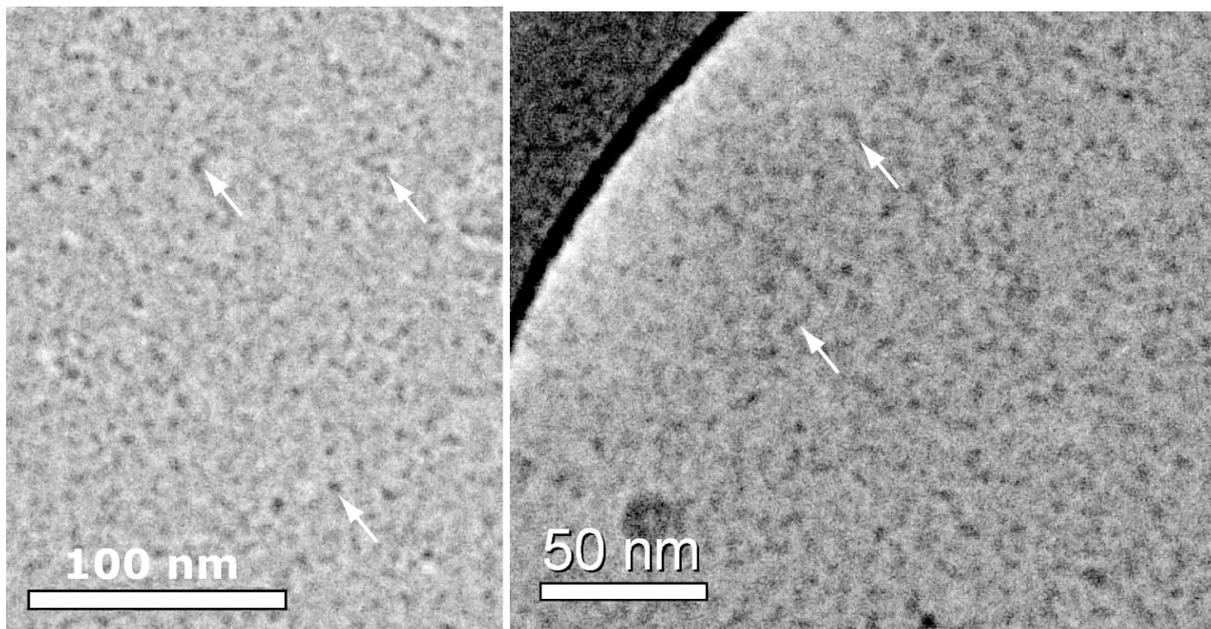


Figure III44: Images de cryo-TEM réalisées à partir d'un échantillon du polymère **4a25h** dans D₂O à une concentration initiale en monomère de 10 mM, et à pD=5. Les flèches indiquent les structures ellipsoïdales attribuées aux chaînes de polymères de **4a25h**.

Ces clichés nous fournissent déjà une preuve de la nature polymérique de **4a25h**. Pour caractériser plus en détail ce polymère nous avons à nouveau utilisé la technique de diffusion des neutrons aux petits angles.

Caractérisation des glycopolymères dynamiques de deuxième génération par diffusion des neutrons aux petits angles

Si on compare le profil de diffusion du polymère **4a25h** avec celui du polymère **4a5b** dans les mêmes conditions expérimentales on peut clairement voir que le glycopolymère de seconde génération **4a25h** est plus court. (Figure III45) L'absence de régime en q^{-1} pour **4a25h** montre que la conformation de ce polymère ne peut pas être assimilée à un bâtonnet rigide, ce qui corrobore les résultats de cryo-TEM.

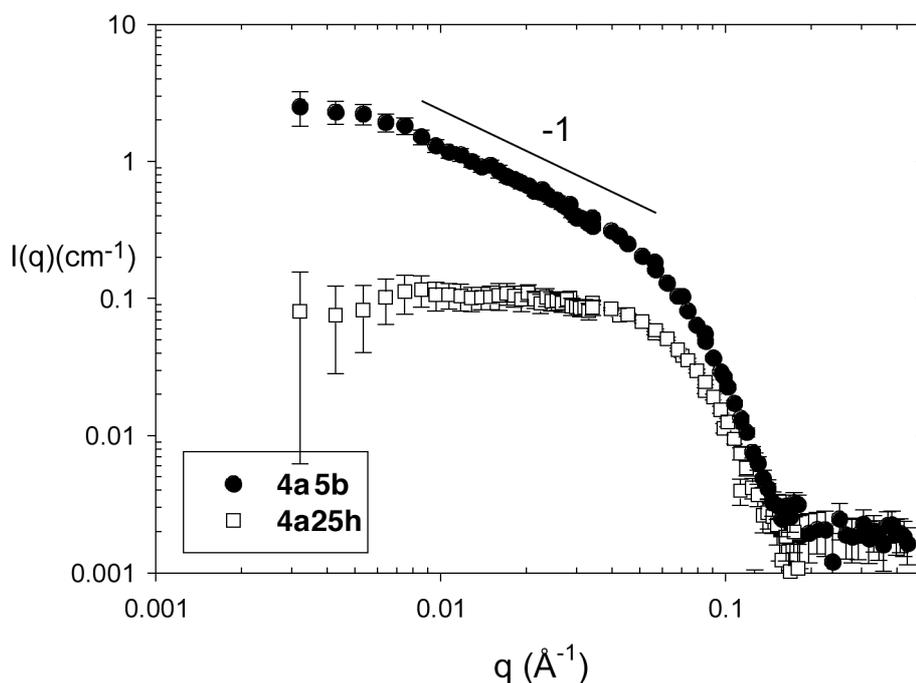


Figure III45: Comparaison des profils de diffusion des neutrons (D_2O) d'un échantillon de polymère **4a5b** et **4a25h** avec une concentration initiale en monomère de 5 mM à $pD=4$.

Le profil de diffusion obtenu pour **4a25h** nous a permis de déterminer le poids moléculaire ainsi que le rayon de giration des chaînes de ce polymère. Comme pour le polymère **4a5b**, l'extrapolation de l'intensité à $q=0$ dans le régime de Guinier nous permet de calculer le poids moléculaire des chaînes comme étant égal à environ $39\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ à $pD=5$, à 20°C , avec une concentration initiale en monomères de 5 mM. **Cela correspond à 28 unités monomériques, ce qui confirme la nature polymérique de 4a25h.**

Le rayon de giration du polymère **4a25h** a été déterminé en effectuant une régression linéaire entre $I(q)^{-1}$ et q^2 pour les vecteurs d'onde du régime de Guinier (le plateau Figure III46), ce qui donne une valeur comprise entre 32 et 34 Å selon la température.(Figure III47)

Pour un ellipsoïde de révolution avec pour rayons a , b , c avec $b=c$, le rayon de giration R_g obéit à l'équation suivante³⁴: $R_g^2=(b^2/5)\times(2+a^2/b^2)$. Les images de cryo-TEM nous ont montré que l'axe transversal des ellipsoïdes de **4a25h** a sensiblement la même valeur que le diamètre de la section des filaments de **4a5b**. Si on prend l'hypothèse que $b=d/2=24.45\text{ Å}$ où d est la section de **4a5b** on obtient une valeur de $a=61.9\text{ Å}$ pour la longueur du demi axe longitudinal de **4a25h**; c'est à dire un rapport axial de ~ 2.5 pour **4a25h** ce qui explique l'absence de régime en q^{-1} dans le profil de diffusion de ce polymère.

L'effet de la température, du pH et de la concentration sur le rayon de giration et le poids moléculaire de **4a25h** ont été évalués. L'influence de la concentration (10, 5, et 2.5 mM) et des variations de pH (4, 5, et 6) ont été négligeables dans le domaine étudié. Les résultats pour l'effet de la température sont transcrits dans le tableau III.4. La Figure III.46 regroupe les profils de diffusion à différentes températures pour un échantillon de **4a25h**.

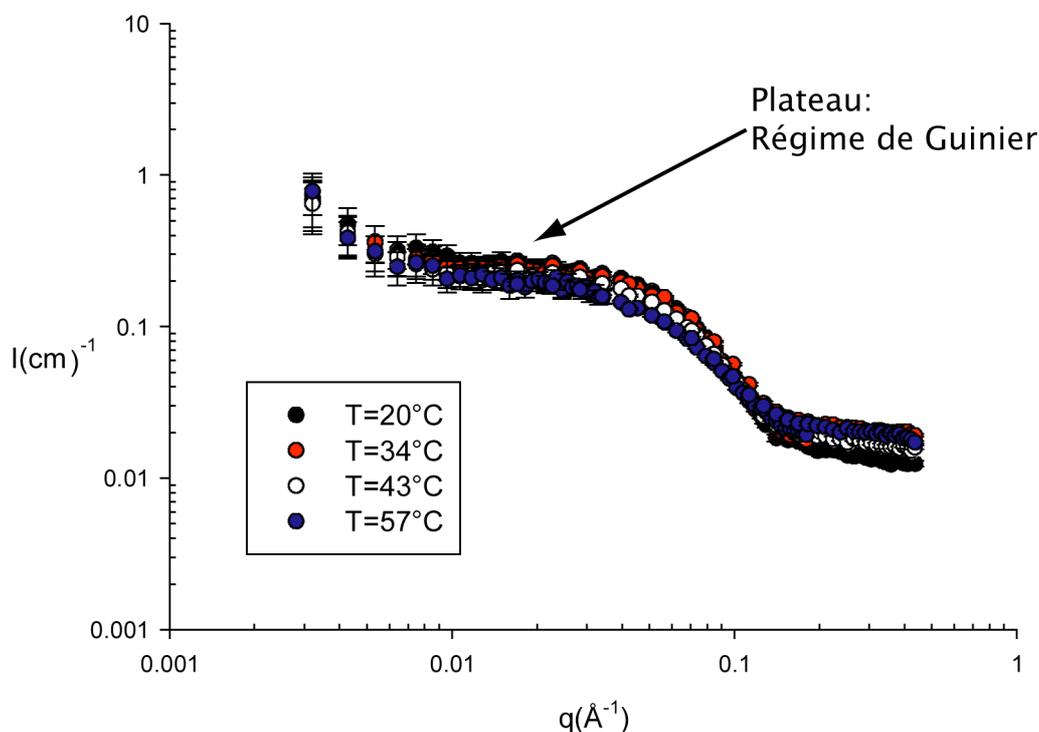


Figure III.46: Profil de diffusion des neutrons (D_2O) d'un échantillon de **4a25h** à différentes températures, avec une concentration initiale en monomères de 10 mM à pD=5.

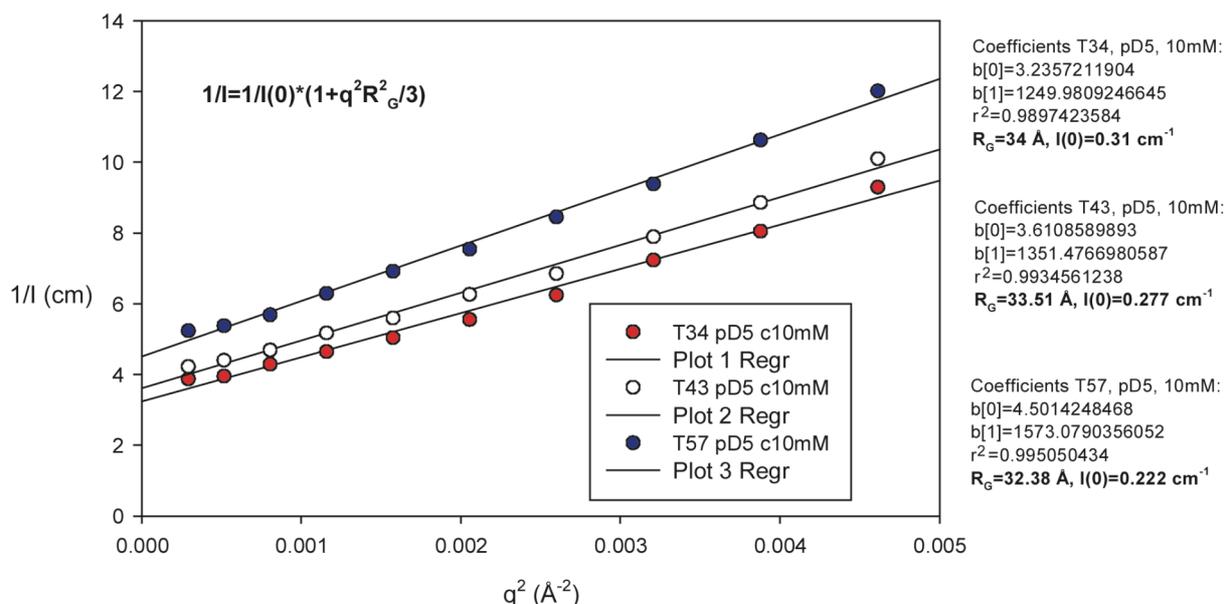


Figure III.47: Régression linéaire entre $I(q)^{-1}$ et q^2 pour 3 mesures à 3 températures différentes (34, 43, et 57°C) sur un échantillon de **4a25h** à pD=5, dans D_2O , avec une concentration initiale en monomères de 10 mM.

Tableau III4: Effet de la température sur le rayon de giration et le poids moléculaire M_w (déterminé à partir de l'intensité pour $q=0$) de **4a25h** à pD=5, et concentration initiale en monomères de 10 mM.

	T=20°C	T=34°C	T=43°C	T=57°C
$R_g(\text{Å})$	32.81	34	33.51	32.38
$I(0)(\text{cm}^{-1})$	0.318	0.31	0.277	0.222
$M_w(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	39000	38600	34500	27400

Bien que l'effet de la température sur le rayon de giration reste limité, l'effet sur le poids moléculaire est plus marqué avec une décroissance avec l'augmentation de la température. Une augmentation de la température de l'échantillon de **4a25h** de 37°C entraîne une baisse du poids moléculaire du polymère de 30% par rapport à la température ambiante (20°C). **Il s'agit là d'une preuve du caractère dynamique du polymère 4a25h.**

Le profil de diffusion des polymères **4a26h** et **4b26h** a lui aussi été déterminé. (Figure III48) Pour ces polymères on observe une forte remontée de l'intensité I pour les petites valeurs de q , ce qui est caractéristique de la formation d'agrégats. L'analyse de Guinier pour les valeurs de q intermédiaires permet de déterminer un rayon de giration pour ces polymères de même que l'intensité pour $q=0$ après extrapolation. (Figure III49) En effectuant les mêmes calculs que pour le polymère **4a5b** on trouve un rayon de giration de 27.4 Å et un poids moléculaire de 22544 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le polymère **4a26h**, ce qui correspond à environ 15 unités monomériques. Pour le polymère **4b26h** on trouve un rayon de giration de 19.3 Å et un poids moléculaire de 10735 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui correspond à environ 10 unités monomériques.

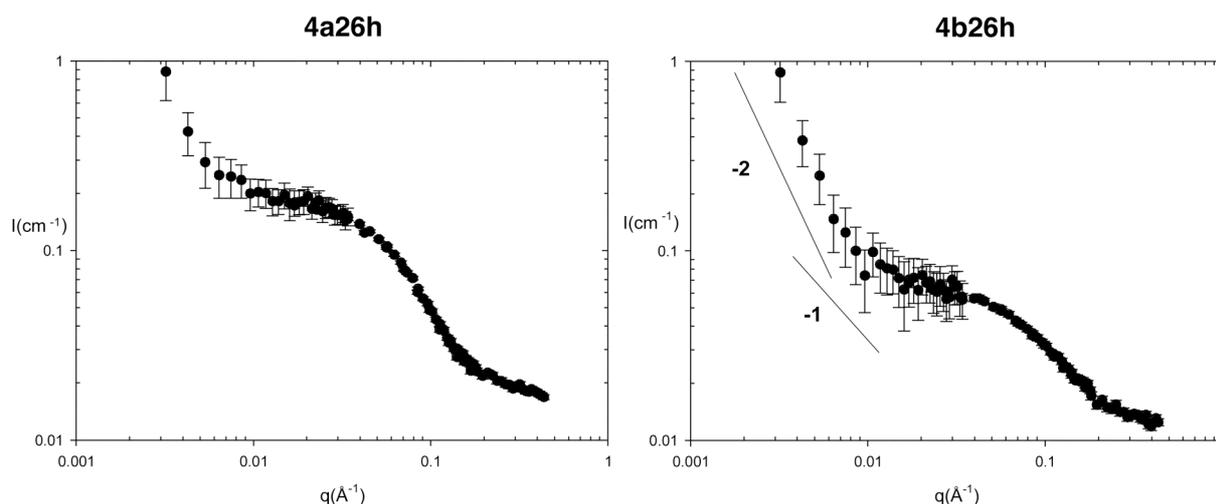


Figure III48: Profil de diffusion des neutrons (D_2O) des échantillons de **4a26h** et **4b26h** avec une concentration initiale en monomères de 10 mM à pD=5 et 25°C.

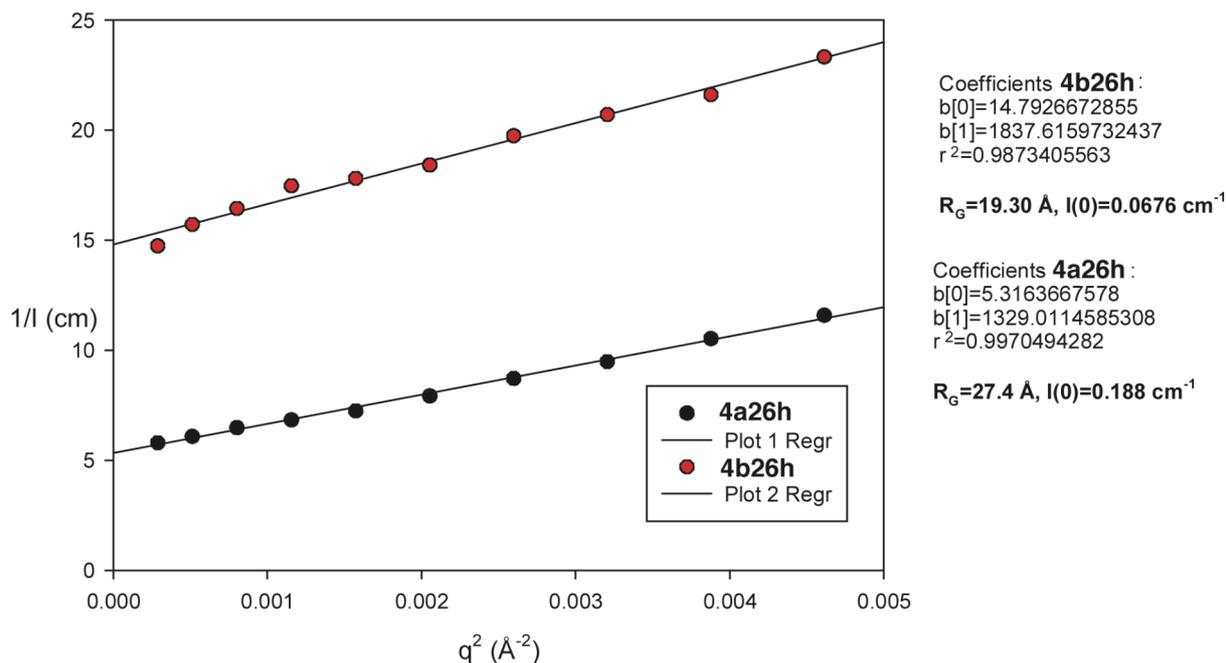


Figure III49: Corrélation linéaire entre $I(q)^{-1}$ et q^2 et l'équation $I(q)^{-1}=I(q=0)^{-1}(1+q^2R_g^2/3)$ pour une mesure sur les échantillons de **4a26h** et **4b26h** à pD=5, dans D_2O , avec une concentration initiale en monomères de 10 mM, à 25 °C.

Polymérisation coopérative

Les différentes caractérisations du glycopolymère dynamique **4a25h** ont bel et bien montré son caractère polymérique. Le poids moléculaire et le degré de polymérisation qui ont été déterminés pour ce polymère sont nettement supérieurs à ce qui est prédit par la théorie à partir de la constante de formation K de la jonction acylhydrazone sur laquelle est basée la chaîne polymérique. (voir plus haut) La diffusion des neutrons aux petits angles permet d'estimer le degré de polymérisation moyen à environ 28, ce qui est 10 fois supérieur à celui calculé pour **4a25h** en se basant sur un modèle isodesmique³⁹ pour lequel toutes les constantes d'association entre monomères et oligomères seraient égales à $K=550 \text{ M}^{-1}$. Il y a une augmentation de la constante de formation de la jonction acylhydrazone au sein du polymère par rapport à celle observée pour le trimère modèle **29**. Il semble donc que le modèle isodesmique ne soit pas le bon, et que le processus de polymérisation de **4a25h** obéisse à un modèle de type nucléation-élongation³⁹ pour lequel une fois le cap de la, ou des premières associations passé, les polycondensations suivantes se font avec une plus grande efficacité. Ce phénomène pourrait être expliqué par une conformation de type goupillon dans laquelle les chaînes latérales oligosaccharides feraient office de bouclier empêchant dans une certaine mesure l'eau d'intervenir dans la dissociation de la jonction acylhydrazone. La chaîne principale polyacylhydrazone se trouverait donc maintenue à l'écart de la phase aqueuse dans un environnement hydrophobe, conditions dans lesquelles la constante de

formation d'acylhydrazone devrait être plus élevée. Il est en effet connu que des structures micellaires, comme la conformation des glycopolymères décrits ici, sont capables de favoriser des processus réversibles en phase aqueuse comme la formation de bases de Schiff, et en particulier d'hydrazones.⁴⁰

Démonstration du caractère dynamique

Comme pour le polymère **4a5b**, le caractère réversible de **4a25h** a été démontré par réaction d'échange avec un équivalent de bishydrazide **4b** après équilibration en phase aqueuse. Cette réaction d'échange covalent a été suivie et quantifiée par RMN du ¹H. Dans le D₂O pur, les spectres des polymères sont trop larges pour être interprétables et obtenir des intégrations précises, c'est pourquoi nous avons à nouveau préféré effectuer une dilution préalable des échantillons de la réaction dans le DMSO-*d*₆ avant l'enregistrement des spectres RMN du ¹H à intervalles réguliers. Sur le spectre RMN du ¹H (DMSO-*d*₆/D₂O 5/1) du polymère **4a25h** on peut sans ambiguïté assigner le signal correspondant aux fonctions imines (signal 1: 8.34 ppm Figure III50) aux protons aromatiques du monomère **4a** incorporés dans le polymères (signaux 2: 7.95 ppm et 3: 7.58 ppm Figure III50). Les signaux aromatiques des unités monoimines terminales (signal 4 Figure III50) sont aussi visibles.⁴¹

L'exclusion du monomère **4a** sous forme libre a de nouveau été observée et quantifiée par intégration relative de ses deux protons aromatiques équivalents dans le DMSO-*d*₆/D₂O 5/1 (signal 6 Figure III50). Le temps de demi-échange dans ce cas est de 12 min à pD=5, et 34 min à pD=6 avec une concentration initiale en monomères de 10 mM et à température ambiante. **Les cinétiques d'échange sont donc environ 125 fois plus rapides dans ces conditions quelles ne l'était avec le polymère 4a5b dans des conditions plus acides (pD=4).**

⁴⁰ Micellar Catalysis and Product Stabilization in Hydrazone Formation Reactions and Micellar-Modified Determination of Hydrazine and Phenylhydrazine. A. K. Yatsimirsky, N. T. Yatsimirskaya, S. B. Kashina. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2232-2239.

⁴¹ Un schéma permettant d'assigner ces signaux est présenté en annexe 5 page 305.

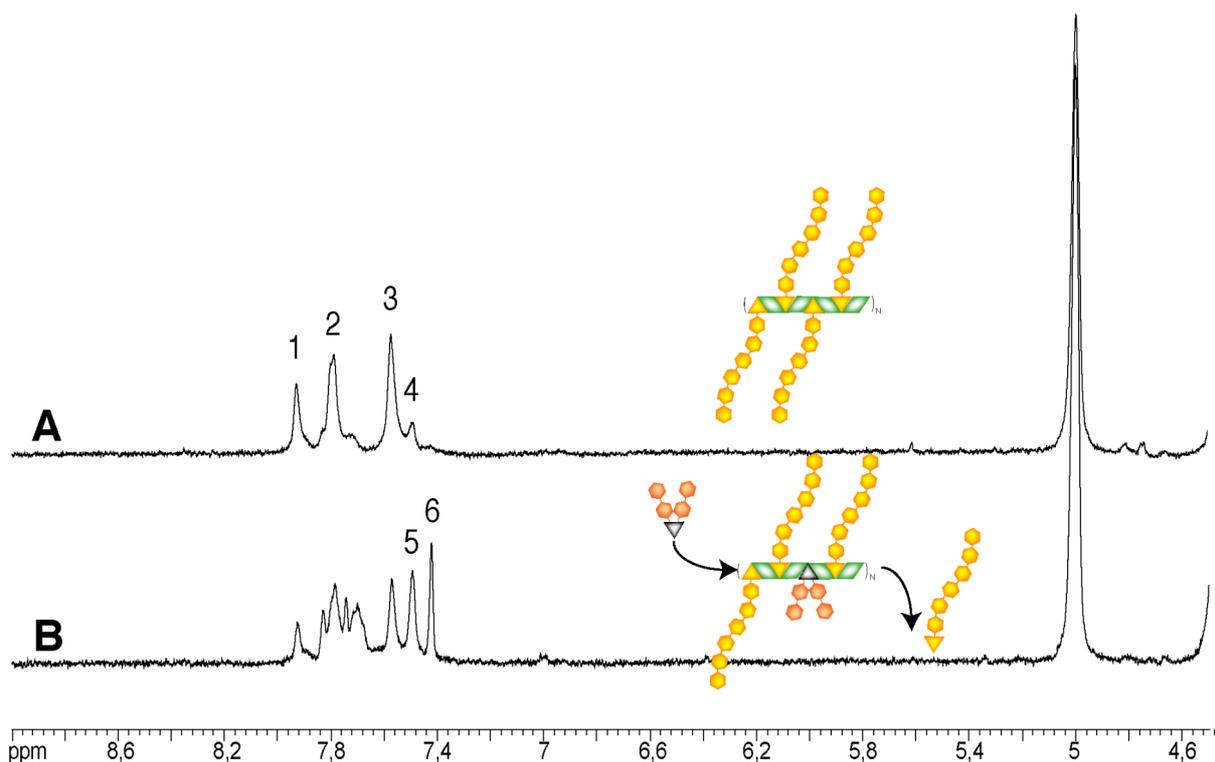


Figure III50: Zoom sur les spectres RMN du ^1H ($\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ 5/1) obtenus après dilution de $100\ \mu\text{L}$ d'une solution de **4a25h** (à $\text{pD}=5$ et $10\ \text{mM}$) avec $500\ \mu\text{L}$ de $\text{DMSO-}d_6$, **A**: avant et **B**: après addition de 1 équivalent de **4b**.

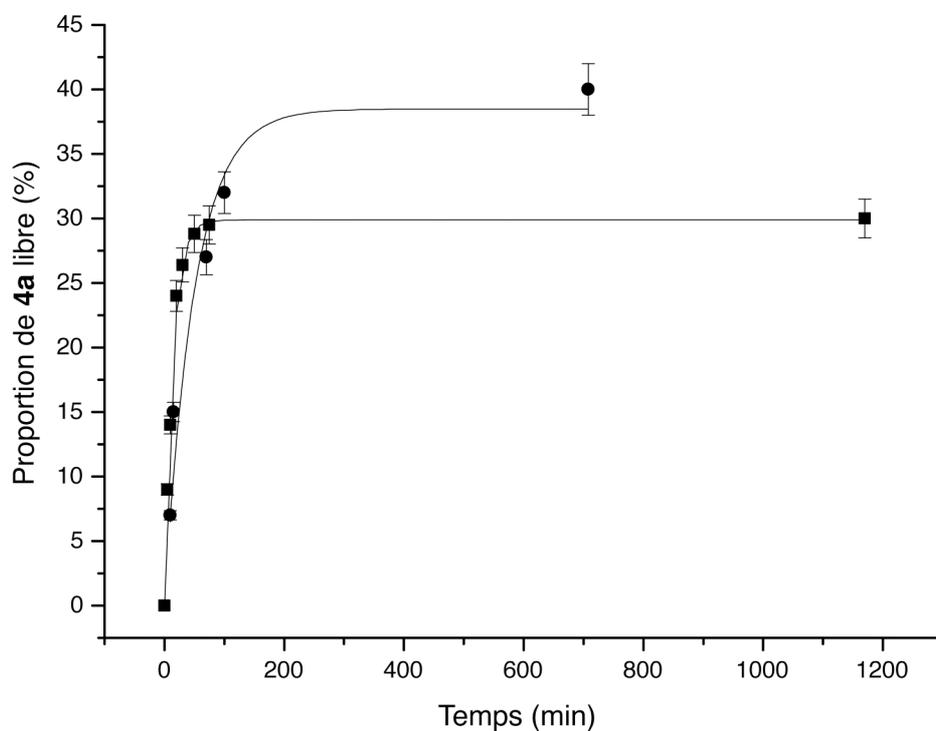


Figure III51: Evolution de la proportion de **4a** libre par rapport à **4a** incorporé dans le polymère **4a25h** à $\text{pD}=5$ et $\text{pD}=6$ à température ambiante avec une concentration initiale en monomères de $10\ \text{mM}$ après ajout d'un équivalent de **4b** ($10\ \text{mM}$).

Etude des échanges par spectrométrie de fluorescence

Nous avons suivi la réaction d'échange entre le polymère **4a25h** et le bis-hydrazide **4b** par spectrométrie de fluorescence. Après addition de **4b** à la solution du polymère **4a25h** à pD=5 on constate rapidement une diminution de l'intensité de la fluorescence émise à 444 nm (longueur d'onde maximum pour l'émission) puis une augmentation pour arriver à 73% de l'intensité initiale.(Figure III52) Ce comportement complexe est difficilement interprétable à ce stade.

On peut simplement constater que l'incorporation de **4b** dans le polymère **4a25h** n'a pas un effet aussi marqué que son incorporation dans le polymère **4a5b**. On peut expliquer ce résultat en constatant que l'intensité maximum pour l'émission de fluorescence du polymère **4a25h** est 2.6 fois plus intense que celle du polymère **4b25h**.(Figure III43)

L'introduction du chromophore **4b25h** dans la structure polymérique est en quelque sorte masquée par l'émission des chromophores **4a25h**. Nous avons donc décidé de suivre la réaction d'échange "inverse", c'est-à-dire l'incorporation de **4a** dans le polymère **4b25h**. (Figure III53)

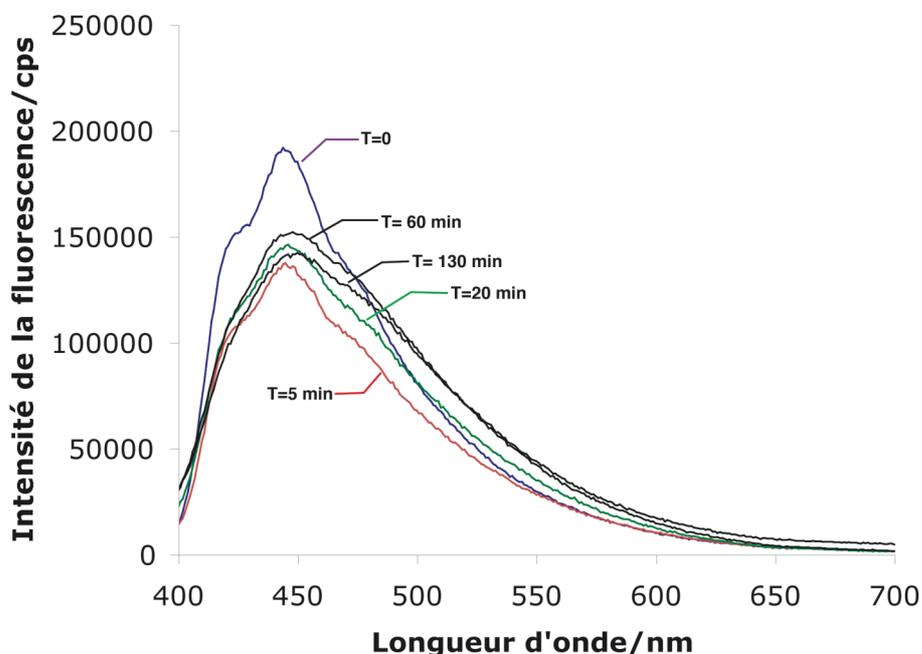


Figure III52: Evolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence émise lors de la réaction d'échange après addition d'un équivalent de **4b** à une solution de **4a25h** à une concentration initiale de 10mM et pD=5 (longueur d'onde d'excitation $\lambda=383$ nm). L'intensité est mesurée en coups par seconde cps.

Dans ce cas, la formation des unités **4a25h** devrait s'accompagner d'une augmentation de l'intensité d'émission de la fluorescence à une longueur d'onde proche de 444 nm, ce qui correspond au maximum d'émission pour le polymère **4a25h** isolé. C'est bien ce qui a été observé, après l'introduction de **4a** dans le milieu réactionnel. On constate une nette augmentation de l'intensité de l'émission de fluorescence accompagnée d'un décalage progressif vers le bleu. A $t=0$, le maximum d'émission correspond à $\lambda_1= 486\text{nm}$, au fur et à mesure ce maximum se décale jusqu'à atteindre une longueur d'onde $\lambda_2= 454 \text{ nm}$. Les spectres enregistrés n'évoluent plus après un temps de réaction supérieur à 110 min, et on peut donc en conclure que le temps d'équilibration du mélange est de cet ordre.

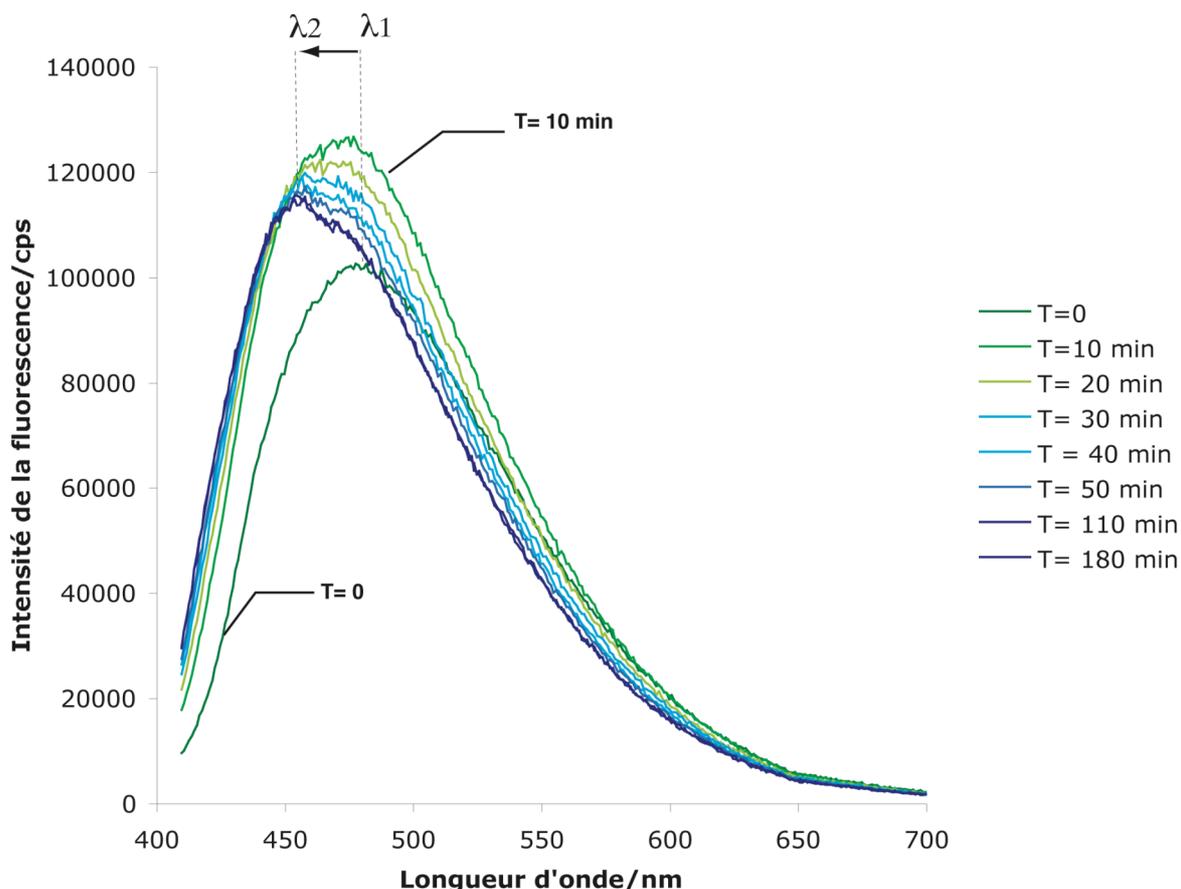


Figure III53: Evolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence émise lors de la réaction d'échange après addition d'un équivalent de **4a** à une solution de **4b25h** à une concentration initiale de 10mM et pD=5 (longueur d'onde d'excitation $\lambda=396 \text{ nm}$). L'intensité est mesurée en coups par seconde cps.

Ensuite nous avons cherché à suivre un échange "croisé" au cours duquel le motif **4a25h** serait formé. Si on mélange une solution aqueuse du polymère **4a26h** avec une solution du polymère **4b25h** à pD=5 les différents monomères peuvent se recombinaer pour générer les motifs **4a25h** et **4b26h**. Les spectres RMN du ^1H de cette réaction d'échange sont trop complexes pour être interprétables du fait de nombreux recouvrement de signaux. Sachant que le motif **4a25h** est celui qui a l'émission de fluorescence la plus intense pour

une excitation à 383 nm, on s'attend à une augmentation de l'intensité de la fluorescence émise par ce mélange **4a26h+4b25h**, ainsi qu'à un décalage du maximum d'émission vers le bleu. Lors de l'expérience il y a bien une augmentation transitoire de l'intensité de la fluorescence émise, mais suivie d'une baisse progressive de l'intensité d'émission, accompagnée d'un décalage du maximum d'émission qui passe de $\lambda_1 = 481$ nm à $\lambda_2 = 446$ nm. (Figure III54)

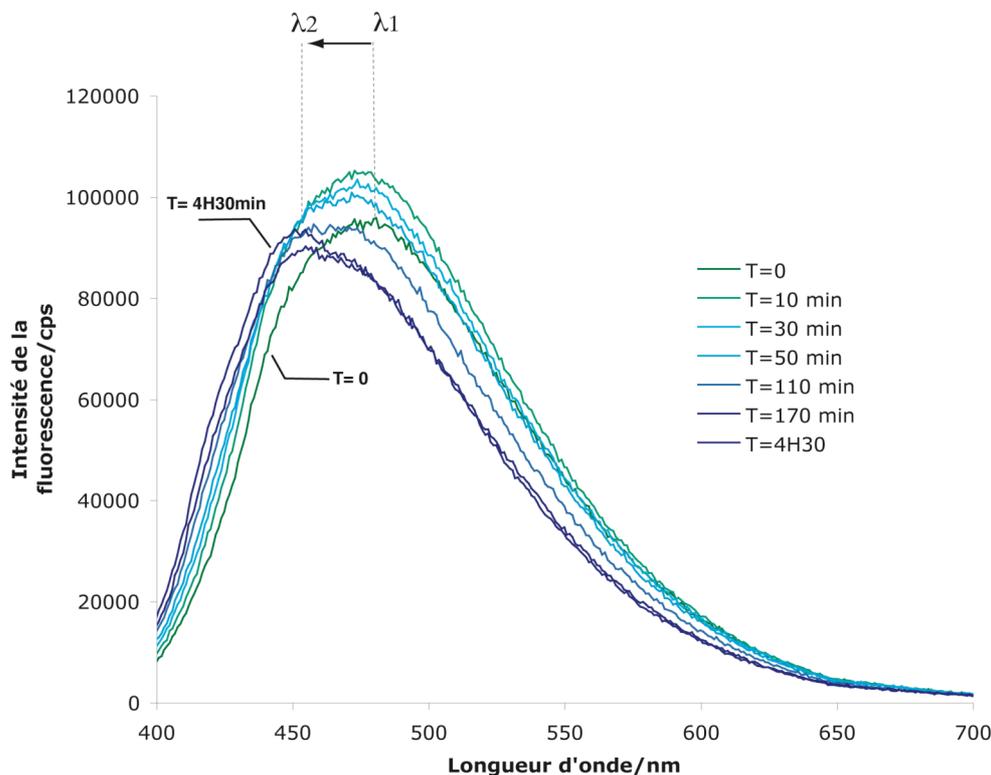


Figure III54: Evolution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence émise lors de la réaction d'échange après addition d'un volume d'une solution de **4b25h** à un même volume d'une solution de **4a26h** toutes deux à une concentration initiale de 10mM et pD=5. Longueur d'onde d'excitation $\lambda = 383$ nm. L'intensité est mesurée en coups par seconde cps.

Bilan des études de fluorescence sur les glycopolymères de deuxième génération:

Pour tous les échanges testés, l'incorporation d'un nouveau monomère dans le polymère, présent initialement en solution, a entraîné des modifications notables dans le spectre d'émission du mélange. Les modifications observées peuvent être corrélées avec les caractéristiques d'émission des polymères isolés, et par conséquent on peut envisager de déterminer un profil d'émission caractéristique de chaque monomère, et donc de chaque type d'oligosaccharide lui étant attribué. Par exemple, si le maximum d'émission d'un mélange des monomères **4a**, **4b**, et **25h** est proche de la longueur d'onde d'émission maximum de **4a25h** (444 nm) cela suggère que c'est ce monomère qui est incorporé préférentiellement. Par contre, si l'intensité maximum d'émission de fluorescence diminue et

se décale vers la longueur d'onde d'émission maximum de **4b25h** (488 nm) cela voudrait dire que c'est **4b** qui est inclus préférentiellement dans le polymère pour former **4b25h**. La spectrométrie de fluorescence pourrait donc servir d'outil pour l'analyse de la constitution des glycopolymères.

Il a également été montré que les échanges croisés sont possibles et peuvent être suivis par spectroscopie de fluorescence quand la RMN du ^1H ne peut pas être utilisée.

Conclusion

Les glycopolymères dynamiques présentés dans ce chapitre ont montré des propriétés structurales et d'émissions de fluorescence originales. Les caractérisations qui ont été menées ont permis de définir avec précisions la taille et la conformation de ces macromolécules. Ces deux dernières caractéristiques étant fortement liées à la constitution des polymères. **Il a été montré que les glycopolymères préparés à partir d'un bis-hydrazide aromatique 4a et d'un dialdéhyde aromatique 5b ont une structure secondaire bien définie en bâtonnet rigide de plusieurs dizaines de nanomètres de long et permettent d'accéder à des polymères de haut poids moléculaires, alors que le même bishydrazide 4a combiné à un dialdéhyde aliphatique 25h donne lieu à la formation de polymères plus courts avec une structure secondaire en ellipsoïde.**

Le caractère réversible de ces polymères et les vitesses d'échanges sont eux aussi fortement dépendant de la composition. **Dans le cas du polymère 4a5b les conditions nécessaires pour obtenir des vitesses d'échange raisonnables (temps de demi échange de l'ordre de l'heure) sont relativement dures, et incompatibles avec une application impliquant la présence simultanée d'une cible biologique et du polymère,** dans des conditions dans lesquelles celui-ci serait significativement réversible du point de vue cinétique. Ce type de polymère pourrait par contre montrer des applications intéressantes dans des domaines où une dégradation lente est préférable, comme le relargage de médicaments.

Le polymère 4a25h par contre a montré des vitesses d'échanges nettement plus rapides avec des temps de demi échange de quelques dizaines de minutes dans des conditions proches des conditions physiologiques (pH 6 et température ambiante). Ce type de polymère serait donc plus à même d'être utilisé pour des expériences d'évolution moléculaire dirigée, visant à modifier la composition du polymère en présence d'une matrice ou cible biologique multivalente. **Les propriétés de fluorescence des glycopolymères dynamiques sont un atout supplémentaire dans ce domaine, étant**

donné qu'il a été montré que le profil d'émission dépend de la composition des polymères, et que de ce fait toute réorganisation constitutionnelle devrait pouvoir être observée par spectrométrie de fluorescence.

Pour finir, les glycopolymères fluorescents classiques ont de nombreuses applications que ce soit dans le domaine des biosenseurs⁴², la détection et le développement de ligand pour les lectines^{43c}, bactéries⁴³, et toxines^{11,44}, mais aussi le marquage et la détection de virus^{43a}, et de métaux lourds.⁴⁵ L'extension de notre approche au développement d'un nouveau type de glycopolymère adaptatif et fluorescent pourrait donc avoir des retombées intéressantes dans tous ces domaines.

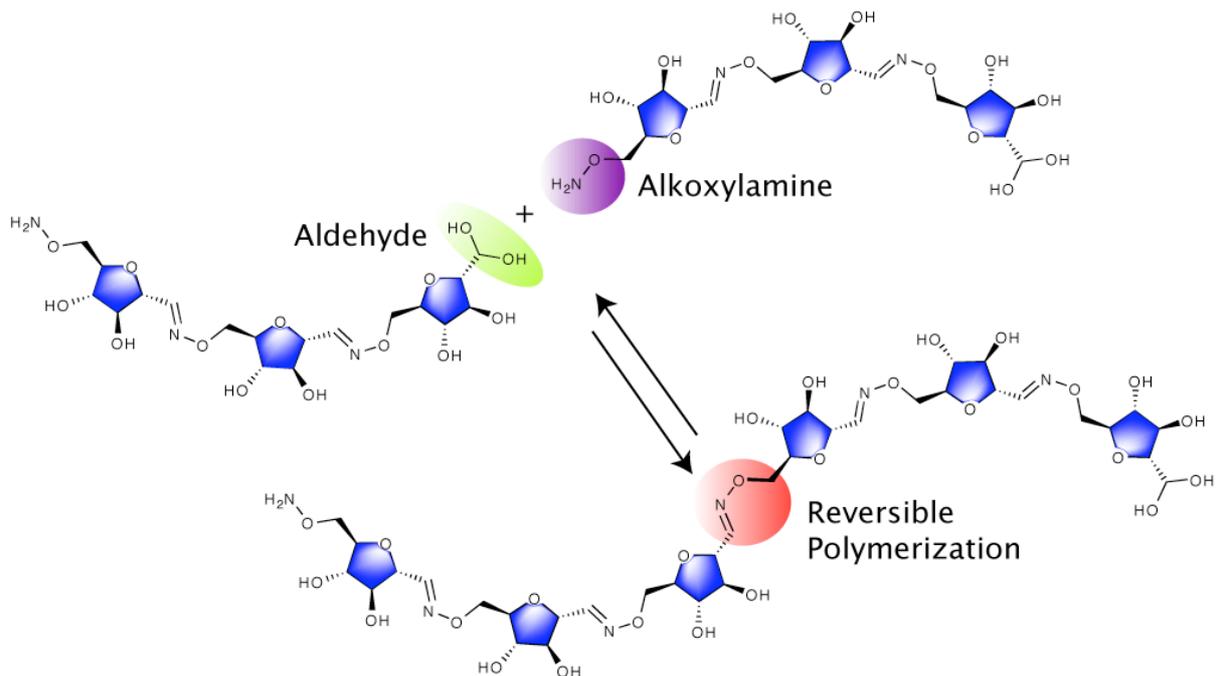
⁴² Carbohydrate Biosensors. R. Jelinek, S. Kolusheva. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5987-6015.

⁴³ a) Design and Synthesis of Novel Glycopolymers for Colorimetric Detection of Influenza Virus and *E. coli*. M.-G. Baek, R. C. Stevens, D. H. Charych. *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 777-788. b) Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13343-13346. c) Synthesis of Highly Water-soluble Fluorescent Conjugated Glycopolymers for Lectin and *Escherichia coli*. C. Xue, S. P. Jog, P. Murthy, H. Liu. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2470-2474.

⁴⁴ Mannose-substituted PPEs Detect Lectins: A model for Ricin sensing. I. B. Kim, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz. *Chem. Commun.* **2005**, 1273-1275.

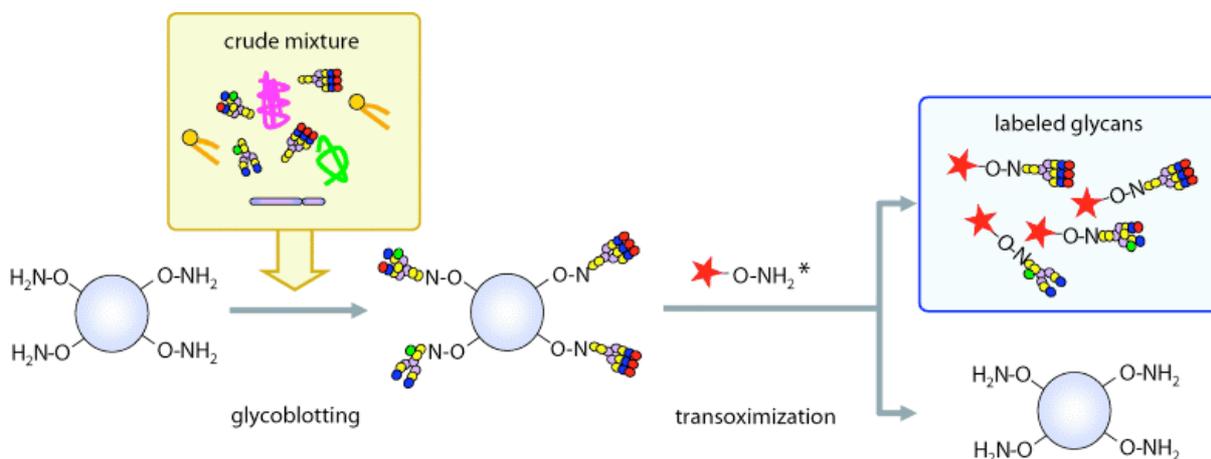
⁴⁵ Sugar-Poly(*para*-phenylene ethylene) Conjugates as Sensory Materials: Efficient Quenching by Hg²⁺ and Pb²⁺ Ions. I.-B. Kim, B. Erdogan, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 6247-6254.

CHAPITRE IV ANALOGUES DE POLYSACCHARIDES NATURELS LA JONCTION OXIME



Ce qui nous intéresse c'est d'appliquer cette jonction oxime à la préparation de polymères dynamiques covalents dans l'eau, et plus généralement à la chimie combinatoire dynamique des sucres.

Dans ce cadre, les travaux d'une équipe japonaise ont mené à l'utilisation de réactions d'échanges covalents pour la préparation et l'isolation sélectives d'oligosaccharides naturels.³ Cette méthode est basée sur l'introduction d'une fonction aldéhyde à l'extrémité de certains oligosaccharides contenus dans des extraits biologiques par le biais d'une enzyme, la galactose oxidase. Cette fonction aldéhyde sert ensuite de point d'attachement à une résine solide grâce à la formation d'oxime dans des conditions aqueuses. Après lavage de la résine et réaction d'échange en présence d'un excès de monoalkoxyamine, on peut isoler des glycopeptides soit sous forme pure, soit marqués par des molécules fluorescentes. (Schéma IV1) Les conditions utilisées pour la réaction de transoximisation impliquent un chauffage à 80°C jusqu'à évaporation du solvant. Ce sont donc des conditions dures et incompatibles si on souhaite appliquer nos polymères à des expériences d'évolution moléculaire dirigée par des cibles biologiques potentielles comme des protéines (lectines,...) ou des cellules vivantes (bactéries, cellules cancéreuses,...).



* O-substituted aminoxy compounds

Schéma IV1: Principe général du concept de "glycoblotting" et de la transoximisation par des composés du type O-R alkoxyamines.

La combinaison aldéhyde/alkoxyamine :

Intérêt de ce type de jonction réversible:

Tout comme la fonction hydrazide permet de conserver une liaison de type amide dans les polymères analogues de polyamides (et polypeptides), la fonction oxime permet de

³ One-Pot Solid-Phase Glycoblotting and Probing by Transoximation for High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics. H. Shimaoka, H. Kuramoto, J.-H. Furukawa, Y. Miura, M. Kuroguchi, Y. Kita, H. Hinou, Y. Shinohara, S.-I. Nishimura. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 1664-1673.

conserver un atome d'oxygène du sucre sur lequel elle est fixée tout en raccourcissant au maximum la distance entre deux sucres consécutifs, ce qui accroît le biomimétisme du polymère obtenu. (Schéma IV2)

Composés modèles et études cinétiques d'échanges :

Le 2,5-anhydro-D-mannose **6** peut être préparé en une étape à partir de la glucosamine commerciale⁴ et constitue un excellent modèle pour l'étude de la réactivité de la fonction aldéhyde dans le cadre de la chimie des sucres. Après avoir préparé la méthyle oxime de cet aldéhyde, le composé **7** nous a servi de modèle pour étudier la possibilité d'appliquer la jonction oxime à la chimie constitutionnelle dynamique des saccharides. (Figure IV2)

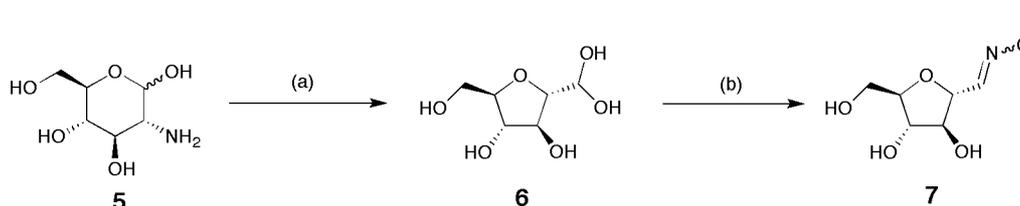


Figure IV2: Préparation de l'oxime modèle **7**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) NaNO_2 , AcOH , H_2O ; (b) $\text{MeONH}_2 \cdot \text{HCl}$, Na_2CO_3 , H_2O , 56 % sur 2 étapes.

Le premier point important est que la réaction de formation d'oxime est rapide; elle est complète en 15 min à température ambiante, à pD=4 et une concentration en réactif de 20 mM. L'oxime **7** est obtenue sous la forme d'un mélange des stéréoisomères E et Z identifiables par les déplacements chimiques de leurs protons respectifs. Les protons de la fonction imine de l'isomère E apparaissent déblindés (7.45 ppm signal 1 Figure IV4 **A**) par rapport aux protons imines de l'isomère Z (6.95 ppm signal 2 Figure IV4 **A**).⁵ La dissociation de l'oxime **7** en aldéhyde **6** et méthyle hydroxylamine **4** n'a pas été observée dans ces conditions par RMN du ^1H , la conversion en oxime est donc maximum, ce qui est un avantage supplémentaire si on veut préparer des polymères de hauts poids moléculaires.

La réaction d'échange entre **7** et **8** a été suivie par RMN du ^1H en solution dans le D_2O , en milieu tamponné (acide acétique- d_4 /acétate de sodium- d_3 (pD= 4 ou 5) ou phosphate (pD= 6) 200mM) et à une concentration de 20 mM. (Figure IV3) Cette réaction

⁴ An Easy Stereospecific Synthesis of 1-amino-2,5-anhydro-1-deoxy-D-mannitol and Arylamino Derivatives. S. Claustre, F. Bringaud, L. Azéma, R. Baron, J. Périé, M. Willson. *Carbohydr. Res.* **1999**, 315, 339-344.

⁵ a) Structural Studies by Nuclear Magnetic Resonance. III. *syn-anti* Assignments from Solvent Effect. G. J. Karabastos, R. A. Taller, F. M. Vane. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 5, 2326-2327. b) Structural Studies by Nuclear Magnetic Resonance. IV. Conformations of *syn-anti* Isomers from Chemical Shifts and Spin-spin coupling Constants. G. J. Karabastos, R. A. Taller, F. M. Vane. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 5, 2327-2328.

peut facilement être suivie par l'intégration du signal de la forme E de la nouvelle oxime qui apparaît après l'addition de la *O*-*tert*-butylhydroxylamine (Figure IV4 signal 5).

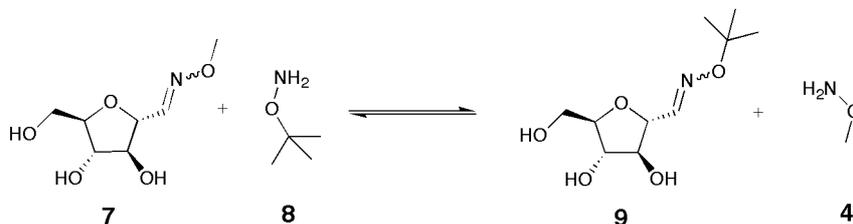


Figure IV3: Echange modèle entre l'oxime 7 et la *tert*-Butylhydroxylamine 8.

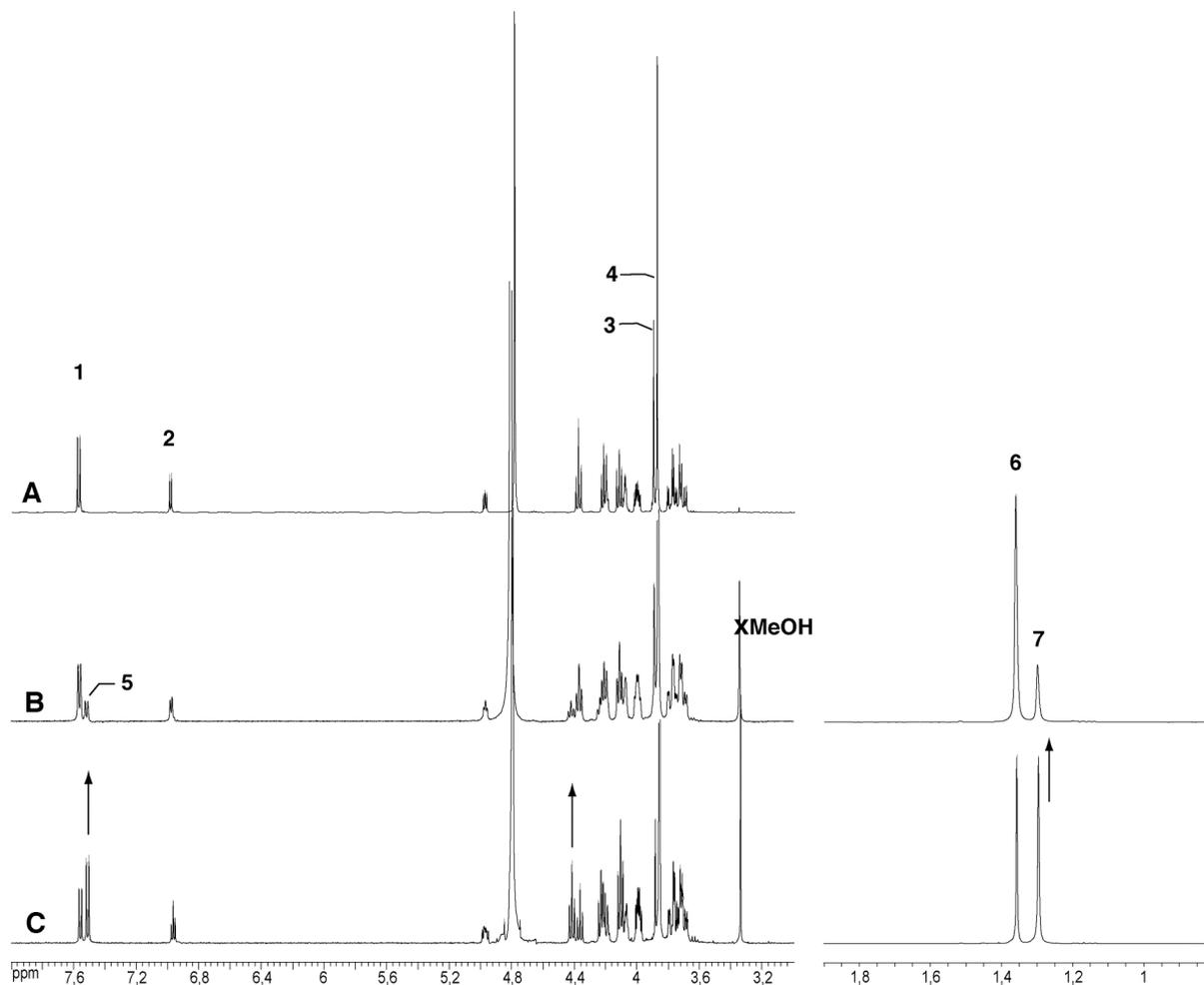


Figure IV4: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du composé oxime modèle 7. Les signaux 3 et 4 correspondent respectivement aux groupements methoxy des formes Z et E de 7. **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'échange entre le composé oxime modèle 7 (20mM) et la *tert*-butyl hydroxylamine (20mM) 8 à pD=4 après 1 h de réaction. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'échange entre le composé oxime modèle 7 (20mM) et la *tert*-butyl hydroxylamine 8 (20mM) à pD=4 après 8 h 35 min de réaction. Pour les spectre **B** et **C** un agrandissement de la zone des signaux *tert*-butylhydroxylamine (signal 6) et *tert*-butyloximes (signal 7) est présenté.

Le tableau suivant résume les temps de demi-réaction (temps nécessaire pour arriver à 50% de la proportion de la nouvelle oxime 9 à l'équilibre) dans les conditions mentionnées précédemment.

Tableau IV1: Temps de demi-échange ($T_{1/2}$) à différents pD pour la réaction entre les composés modèle **7** et l'alkoxylamine **8**, à une concentration de 20 mM. Ces valeurs ont été déterminé après lecture sur la figure IV5.

	pD= 4	pD= 5	pD= 6
$T_{1/2}$ (min)	98	242	777

Le graphique suivant représente les courbes de cinétiques des échanges effectués à différents pD.(Figure IV5)

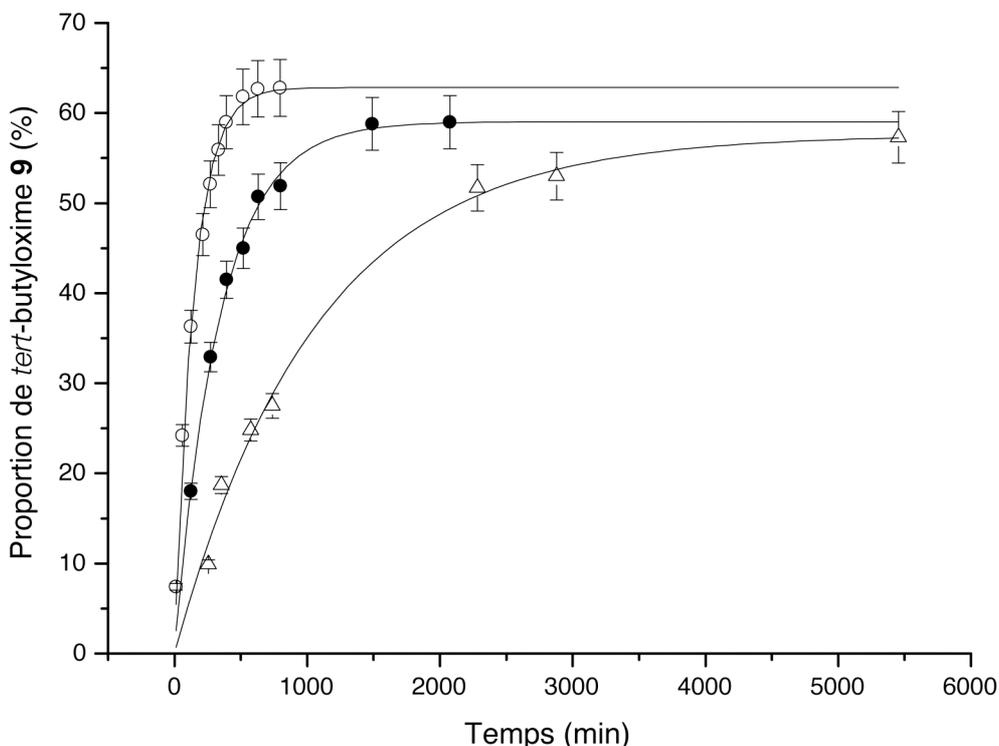


Figure IV5: Influence du pD sur la cinétique d'échange entre **7** et **8**. La proportion de **9** par rapport à **7** est déterminé par le rapport des intégrales de leurs signaux relatifs. ○ pD= 4; ● pD= 5; △ pD= 6.

Aux pH acides (pD= 4) le temps de demi-échange de la réaction modèle entre 7 et 9 est de 98 min, ce qui fait de la jonction oxime étudiée une liaison covalente réversible sur une échelle de temps raisonnable du point de vue pratique. Les cinétiques d'échanges sont fortement ralenties lorsqu'on élève le pH, en effet à pD= 6 la cinétique d'échange est environ 8 fois plus lente qu'à pD= 4, ce qui procure une méthode pour geler les équilibres.

Compte tenu de ces résultats nous avons appliqué la jonction oxime modèle de **7** pour la préparation d'analogues de polysaccharides naturels.

Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides : Arabino-furanoses Dynamiques

Conception et Synthèse des monomères

Comme dans le chapitre II (page 83) ce sont les oligoarabinofuranosides des mycobactéries qui ont été pris comme modèles. Si on remplace la liaison glycosidique α -(1 \rightarrow 5) dans le motif monomérique de ces polysaccharides par une jonction covalente réversible, comme la liaison oxime R-CH=N-O-R, cela donne accès à un analogue d'oligoarabinanes, dont les monomères sont connectés entre eux de manière réversible. (Schéma IV2)

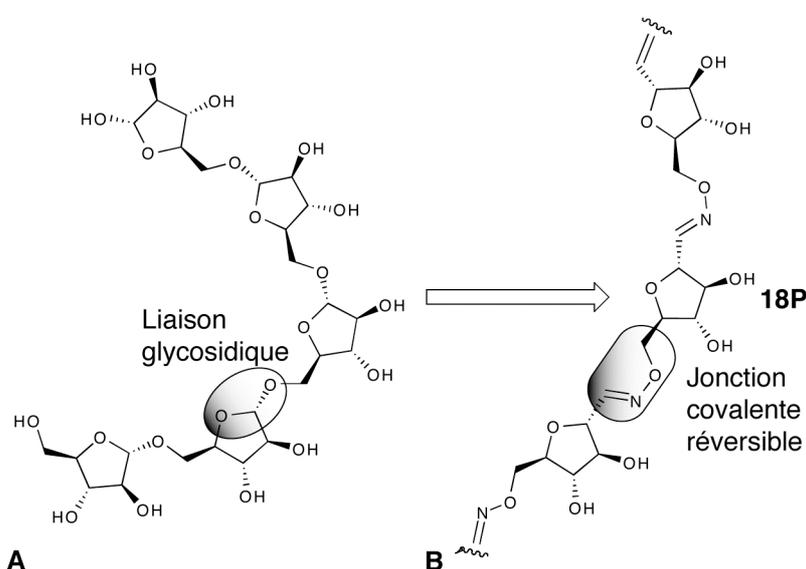


Schéma IV2: **A** α -(1 \rightarrow 5)-D-Oligoarabinofuranosides naturels **B** Analogue dynamique de **A** obtenu par remplacement la liaison glycosidique par une jonction réversible.

Deux approches différentes ont été choisies pour synthétiser soit un analogue de type copolymère alterné **19P** soit le polymère **18P**. (Figure IV9)

Synthèse de composés “homo”-bifonctionnalisés

La préparation du copolymère alterné **19P** nécessite l'utilisation du monomère dialdéhyde protégé **10** et son dérivé déprotégé **10h**. (Figure IV6) La préparation de ces composés est détaillée chapitre II page 78.

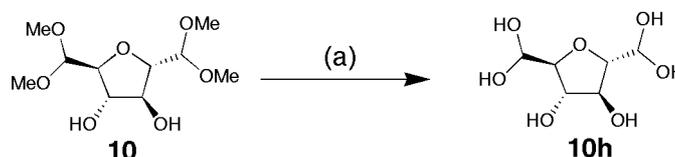


Figure IV6: Synthèse du dialdéhyde **10h**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) DCI, pD<1, 50°C, 24h.

A partir du 2,5-anhydro-D-mannitol **11** on obtient par acétalisation et tosylation le composé **12** décrit dans la littérature, qui après acétylation⁶, alkylation et déprotection fournit le monomère **14**.(Figure IV7)

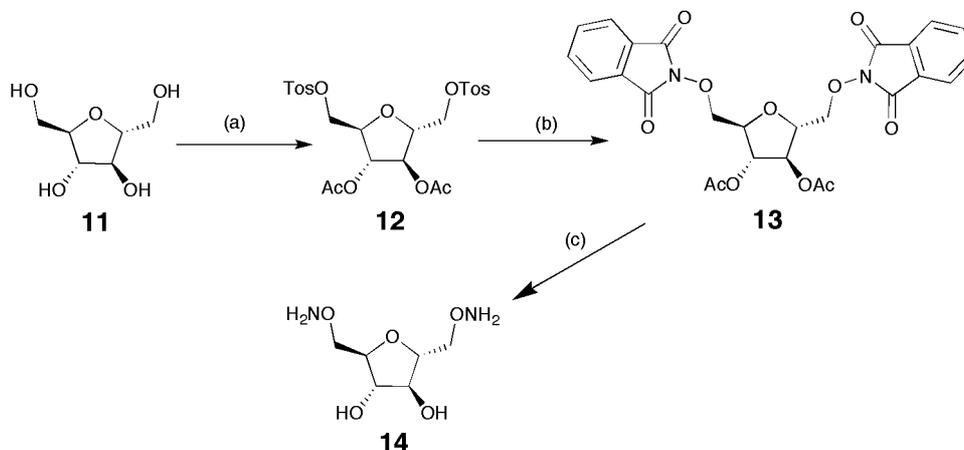


Figure IV7: Synthèse du bis-alkoxyamine **14**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) (i) tosyl chloride, pyridine (ii) Ac_2O , pyridine, 29% sur 2 étapes;(b) N-hydroxyphthalimide, DBU, DMF, 40%;(c) butylamine, MeOH, 76%.

Synthèse de composés “hétéro”-bifonctionnalisés

Le monomère **18** a été préparé à partir du tosylate **16** décrit dans la littérature.⁷ Ce monomère est constitué d'une unité furanose fonctionnalisé à une extrémité par une fonction aldéhyde protégée et à l'autre par une fonction alkoxyamine. De ce fait **18** peut être déprotégé et polymérisé *in situ* par polycondensation.

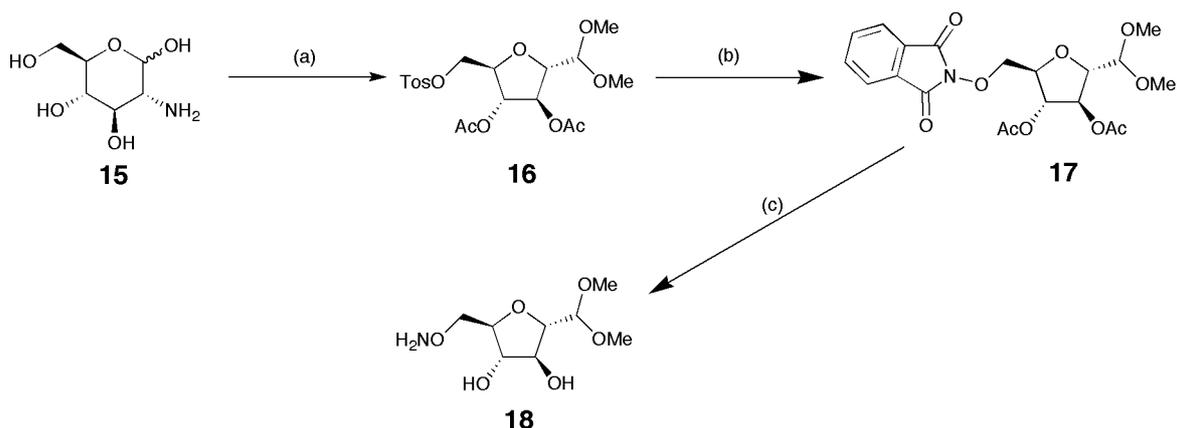


Figure IV8: Synthèse du monomère **18**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) (i) NaNO_2 , Amberlite IR120 H^+ form, H_2O (ii) triméthylorthoformate, *p*-toluenesulfonic acid, MeOH (iii) tosyl chloride, pyridine (iv) Ac_2O , pyridine, 20% sur 4 étapes; (b) N-hydroxyphthalimide, DBU, DMF, 65%; (c) butylamine, MeOH, 49%.

⁶ Synthesis of some Derivatives of 2,5-Anhydromannitol. R.D. Guthrie, Ian D. Jenkins, James J. Watters, Micheal W. Wright, Ryohei Yamasaki. *Aust. J. Chem.* **1982**, 35, 2169-73.

⁷ Total Synthesis of Two Furanomycin Stereoisomers. S.-Y. Chen, M. M. Joullié. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 1769-1772.

Polymérisation et études RMN des arabino-furanoses dynamiques

Le monomère **18** donne accès à un polymère **18P** analogue du motif **A** des oligoarabinofuranosides (Schéma IV2).

Les monomères **10h** et **14** combinés entre eux fournissent le copolymère alterné **19P**, lui aussi analogue des oligoarabinofuranosides. (Figure IV9)

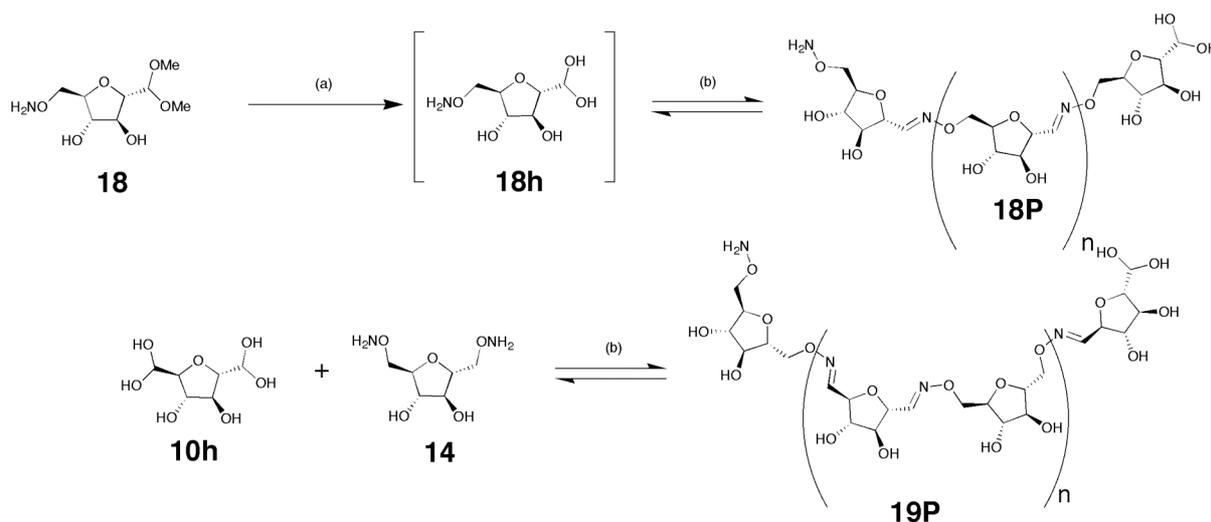


Figure IV9: Préparation des polymères **18P** et **19P**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) $pD < 1$, $50^{\circ}C$, 24h, D_2O . (b) D_2O , $pD = 4$ ou 5 .

La déprotection du composé **18** s'effectue *in situ* par hydrolyse en milieu acide à $pD < 1$ à $50^{\circ}C$ sur une durée de 24 h. La déprotection et la polycondensation ont lieu simultanément, et même dans les conditions de pD très acides nécessaires à la déprotection, la formation d'oxime est observée. Après déprotection complète le pD de la solution est ajusté à une valeur de $pD = 4, 5$ ou 6 pour obtenir **18P**. La réaction de déprotection peut facilement être suivie par la disparition des signaux correspondant au proton et aux méthyles de la fonction acétal de **18**. (Figure IV10 **A** signaux 1 et 2) L'apparition de signaux attribués aux formes E et Z des oximes formés par polycondensation confirme que la polymérisation a bien eu lieu. (Figure IV10 **B** signaux 3 et 4) Pour confirmer la structure du polymère le spectre du polymère **18P** peut être comparé à celui du composé modèle **7** (Figure IV10 **C**).

Le polymère **19P** est obtenu après addition d'un équivalent de **14** à une solution neutralisée de **10h** après sa déprotection. Comme pour **18P**, on observe bien la formation d'imines se traduisant par l'apparition des signaux 2 et 3 des formes E et Z des oximes. (Figure IV11 **B** signaux 2 et 3) La disparition du signal des hydrates de **10h** (Figure IV11 **A** signal 1) est aussi un signe de l'avancée de la réaction de polymérisation.

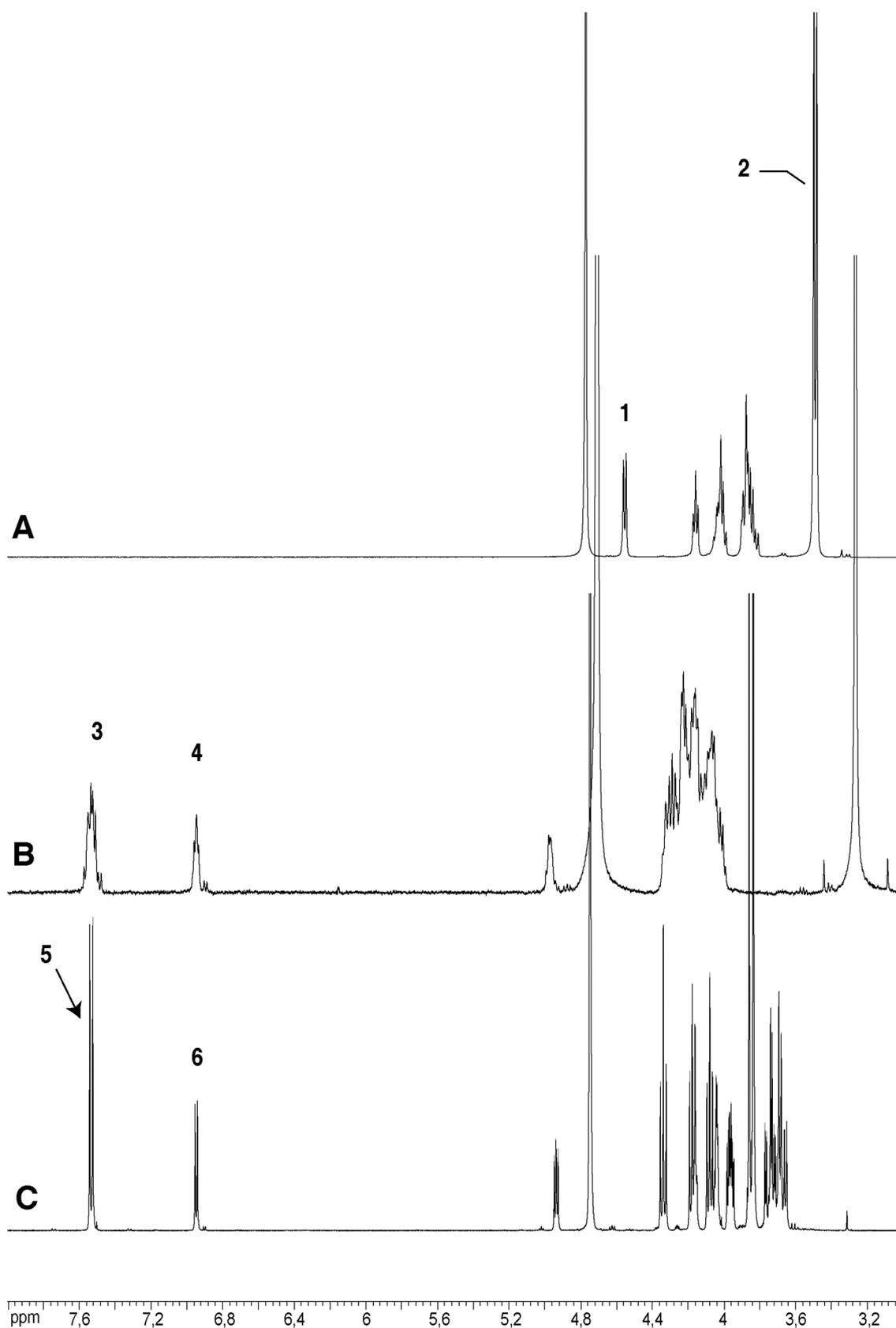


Figure IV10: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **18**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère dynamique **18P**, les signaux 3 et 4 correspondent respectivement aux formes E et Z des oximes de **18P**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du composé modèle **7** les signaux 5 et 6 correspondent respectivement aux formes E et Z de l'oxime **7**.

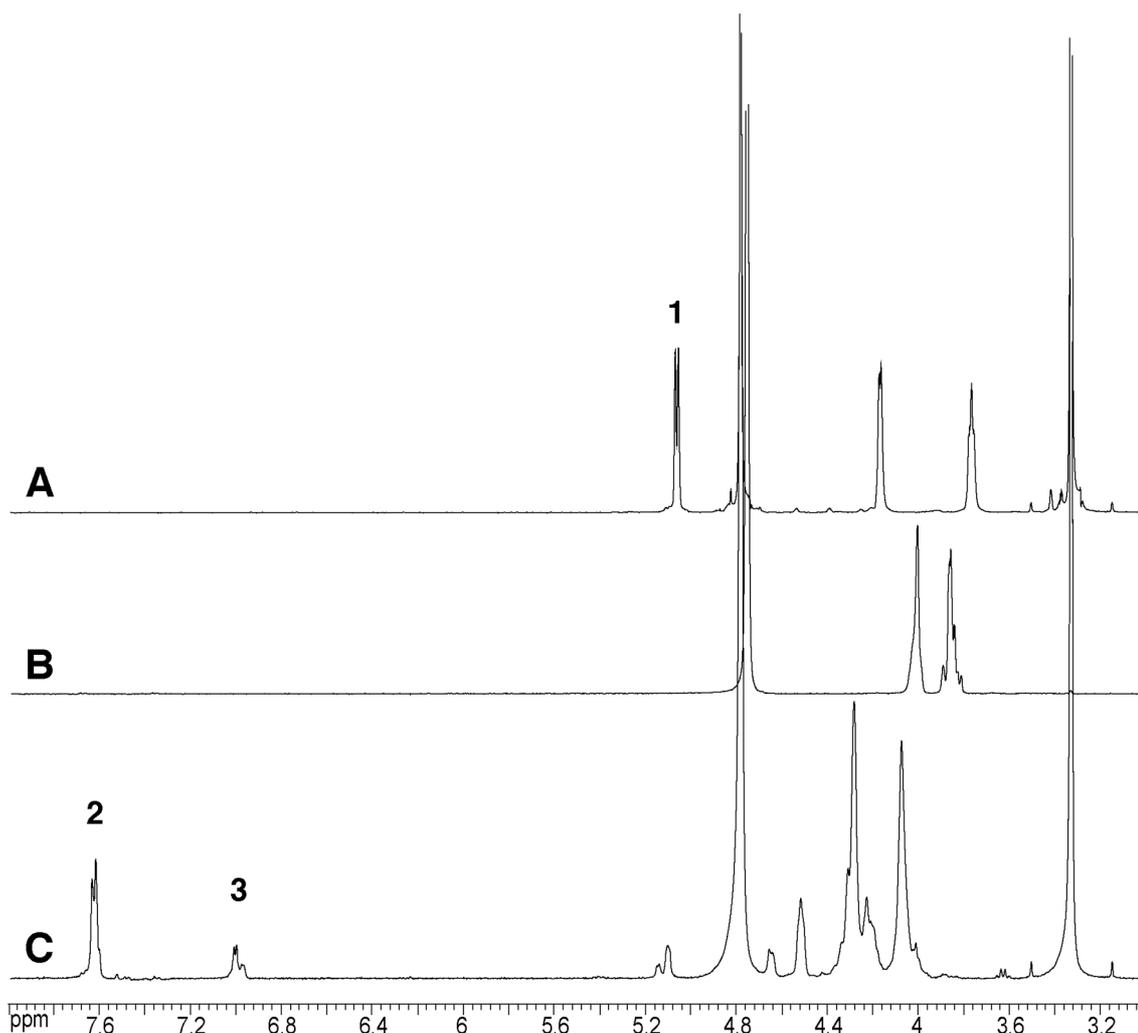


Figure IV11: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du composé dialdéhyde déprotégé **10h**. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère bis-alkoxylamine **14**. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère dynamique **19P** obtenu par mélange d'une quantité équivalente de **10** (20mM) et **14** (20mM) à $\text{pD}=4$. L'élargissement des signaux est aussi significative de la formation d'un polymère. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans le texte.

Caractérisation des arabino-furanoses dynamiques par RMN DOSY

Les polymères **18P** et **19P** ont ensuite été caractérisés par RMN DOSY⁸ (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy). La séquence RMN "pulsed-field gradient stimulated echo" a été utilisée pour mesurer le coefficient de diffusion de translation (D) des polymères, ce coefficient étant relié au poids moléculaire et à la forme des macromolécules. Au laboratoire cette technique a déjà été employée pour l'analyse de bibliothèques combinatoires dynamiques de complexes métalliques de type grille et hélice.⁹ Cette technique est du plus grand intérêt pour l'étude des polymères dynamiques qu'ils soient covalents ou non, car elle

⁸ Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter-New Insights. Y. Cohen, L. Avram, L. Frish. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 520-553.

⁹ a) Discrimination of Metallosupramolecular Architectures in Solution by Using Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) Experiments: Double-Stranded Helicates of Different Lengths. L. Allouche, A. Marquis, J.-M. Lehn. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7520-7525. b) N. Giuseppone, J. L. Schmitt, L. Allouche, J.-M. Lehn. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1-6.

peut être utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion des polymères en solution, dans des conditions dans lesquels ils sont toujours réversibles. La RMN DOSY a également été proposée comme alternative à la GPC pour la détermination du poids moléculaire des polysaccharides.¹⁰ Il a en effet été démontré que le coefficient de diffusion peut être corrélé avec le poids moléculaire M_w de ces biopolymères. Ces travaux se basent sur l'établissement d'une courbe de calibration entre le $\log(D)$ et le $\log(M_w)$ obtenue après détermination de D pour des échantillons d'oligosaccharides de poids moléculaires connus. Après régression linéaire la relation obtenue permet d'estimer le poids moléculaire d'oligosaccharides naturels ou de synthèse de structure proche à partir de leur coefficient de diffusion D . Le coefficient de diffusion translationnel nous permet aussi de calculer le rayon hydrodynamique sphérique des particules r_{sph} , en utilisant l'équation de Stokes-Einstein $D=k_B T/(6\pi\eta r_{sph})$ où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, et η la viscosité du milieu.

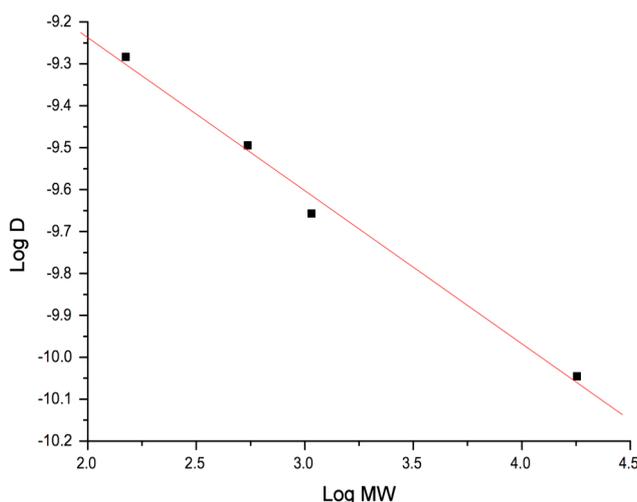


Figure IV12: Représentation graphique du $\log D$ en fonction du $\log Mw$ pour une série d'oligoarabinanes: D-arabinofuranose, α -(1→5)-L-arabinotetraose, α -(1→5)-L-arabinoaoctose, α -(1→5)-L-arabinane linéaire ($M_w=18000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Une régression linéaire donne la relation suivante $\log D = -(0,365)\log Mw - 8,506$ (D en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) (M_w en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), avec un coefficient de corrélation $R = -0,99584$, dont la courbe de tendance est représentée en rouge.

¹⁰a) Diffusion Ordered Spectroscopy as a Complement to Size Exclusion Chromatography in Oligosaccharide Analysis. P. Groves, M. Ohsten Rasmussen, M. D. Molero, E. Samain, F. Javier Canada, H. Driguez, J. Jimenez-Barbero. *Glycobiology* **2004**, 14, 451-456. b) Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: Aversatile Tool for the Molecular Weigth Determination of Uncharged Polysaccharides. S. Viel, D. Capitani, L. Mannina, A. Segre. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1843-1847.

Tableau IV2: Coefficients de diffusion D et rayons hydrodynamiques sphériques r_{sph} d'une série d' α -(1→5)-arabinofuranoses standards déterminés à 298 K.

Degré de polymérisation des Oligoarabinanes standards	$M_w(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	$D(\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$	$r_{\text{SPH}}(\text{Å})$
1	150	520 ^a	3,8
4	546	320 ^a	6,2
8	1075	220 ^a	9
120	18000	90 ^a	22,1

^a $D(D_2O)=1690 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$

Nous avons tout d'abord établi une courbe de calibration du $\log(D)$ par rapport au $\log(M_w)$ à l'aide d'oligoarabinofuranoses commerciaux.(figure IV12, Tableau IV2) Comme les structures de **18P** et **19P** sont très proches des α -(1→5)-arabinofuranoses (Schéma IV2), l'hypothèse que cette calibration nous permet d'estimer le poids moléculaire des espèces majoritaires en solution est justifiée. **Pour 18P les espèces majoritaires ont un poids moléculaire compris entre 800 et 1100 g.mol⁻¹ (270> $D(\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$ >242). Pour 19P les poids moléculaires s'évalent de 1600 à 2200 g.mol⁻¹ (210> $D(\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$ >187).**¹¹

Ces valeurs correspondent à un degré de polymérisation n compris entre 5 et 7 pour **18P** (qui est un homopolymère), et 5 et 7 pour **19P** (qui est un copolymère alterné).

Ces résultats ont ensuite été étayés par des analyses des polymères 18P et 19P par spectrométrie de masse MALDI. (Figure IV 13 et IV14) Ces analyses ont mis en évidence l'existence de produits de polycondensation comportant jusqu'à 16 unités furanoses pour 19P, et 12 pour 18P. Les signaux attribués aux espèces cycliques sont majoritaires, mais comme la formation d'oximes est réversible, en solution à pH acide ces espèces macrocycliques sont en équilibre avec leurs équivalents oligomériques linéaires.

¹¹ Les spectres RMN DOSY des polymères **18P** et **19P** sont donnés en annexe 6.

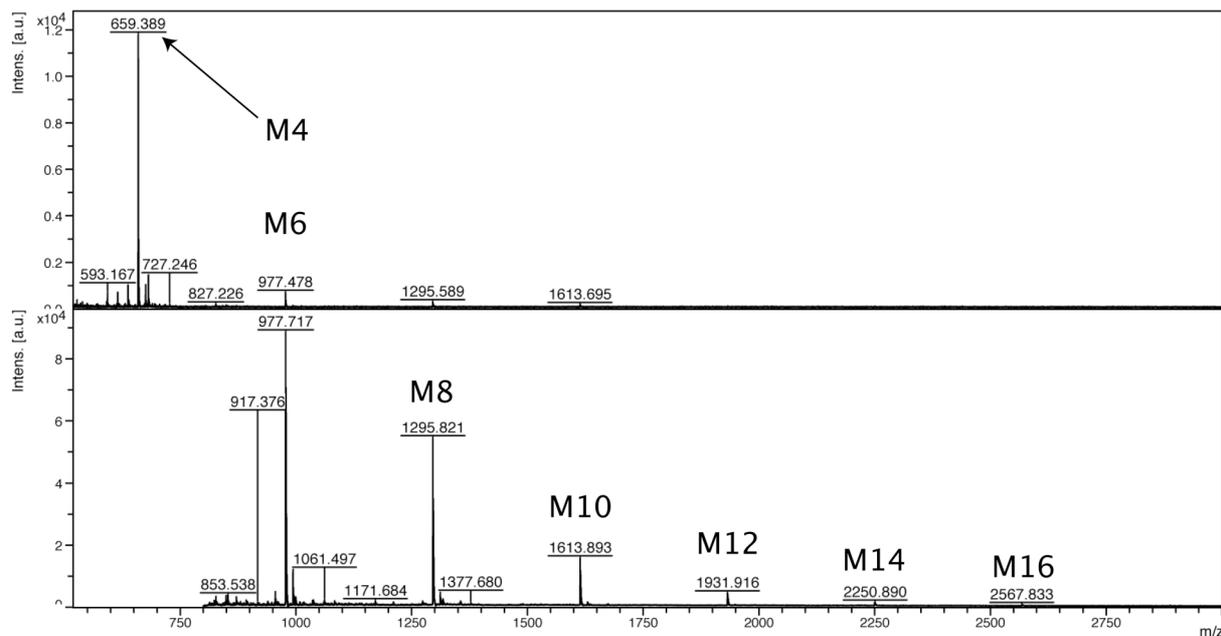


Figure IV13: Spectre de masse MALDI d'un échantillon du polymère **19P**. Les références M4-16 correspondent respectivement aux signaux attribués aux macrocycles contenant 4 à 16 unités furanoses M4-M16 + Na⁺. Dépôt réalisé à partir d'une solution contenant 1% d'acide formique. Matrice utilisée: THAP diluée dans du THF. Les masses observées sont des multiples de $(M_{10h} + M_{14} - 4 \cdot 18) + M_{Na} = (n \cdot 318.28) + 22.99$.

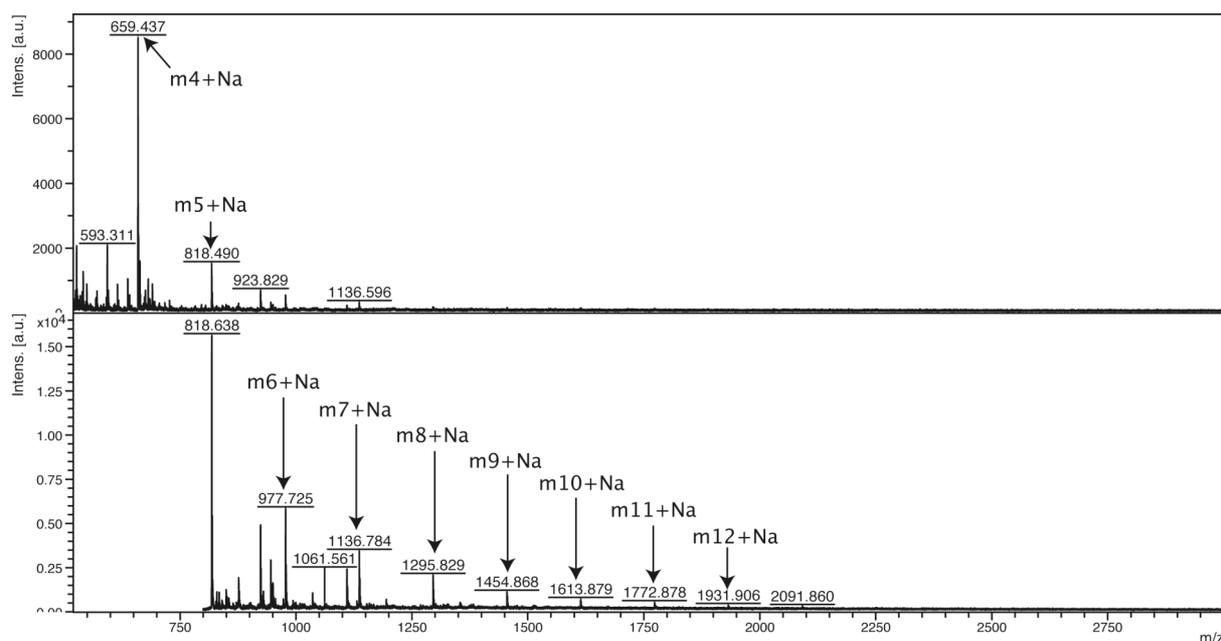


Figure IV14: Spectre de masse MALDI d'un échantillon du polymère **18P**. Les références m4-16 correspondent respectivement aux signaux attribués aux macrocycles tétramère-dodécamère + Na⁺. Dépôt réalisé à partir d'une solution contenant 1% d'acide formique. Matrice utilisée: THAP diluée dans du THF. Les masses observées sont des multiples de $(M_{18h} - 2 \cdot 18) + M_{Na} = (n \cdot 159.14) + 22.99$.

Démonstration du caractère dynamique

Comme la structure de la jonction oxime du composé modèle **7** est proche de celle des polymères **18P** et **19P** on s'attend à un accord entre les résultats obtenus lors des études préliminaires de cinétiques d'échanges, et celles effectuées sur les polymères. Le

caractère dynamique des polymères **18P** et **19P** a été mis en évidence par l'introduction dans le milieu d'un agent de terminaison, la *O-tert*-butylhydroxylamine, après équilibration des polymères dynamiques. Si la polymérisation est réversible, cet agent de terminaison devrait être incorporé dans le polymère et par conséquent le raccourcir du fait de la terminaison de chaînes.(Figure IV15)

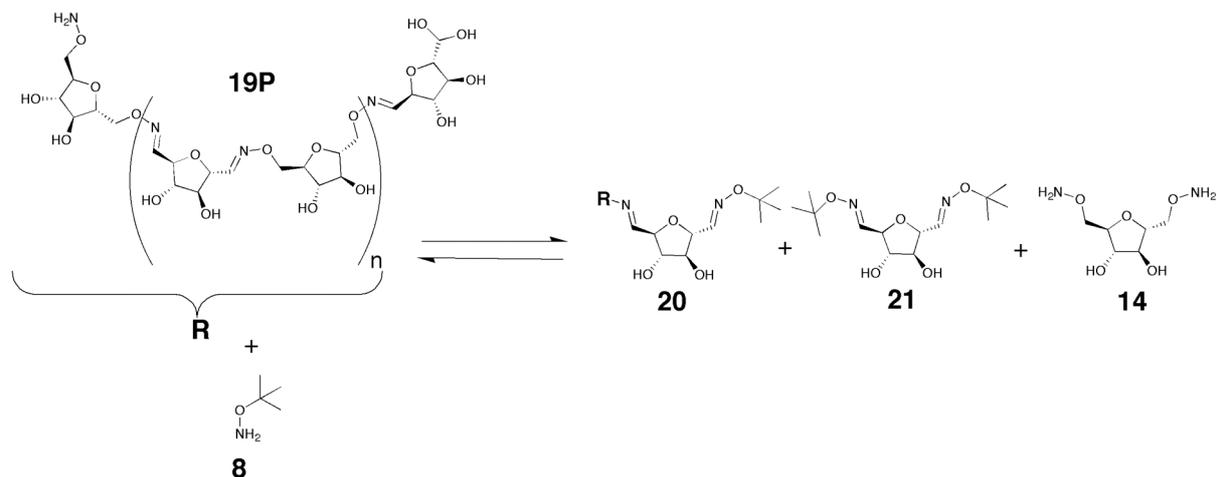


Figure IV15: Réaction de terminaison de chaîne dynamique: Addition d'un agent de terminaison **8** à une solution du polymère dynamique **19P** à l'équilibre thermodynamique.

L'incorporation d'un équivalent de l'agent de terminaison **8** a été observée par RMN du ¹H. L'intégration du signal correspondant aux fonctions *tert*-butyloxime donne la proportion d'agent de terminaison incorporé dans le polymère **19P**. (Figure IV16 et IV17)

La même réaction d'échange a été effectuée en partant du polymère **18P**.(Figure IV18 et IV19)

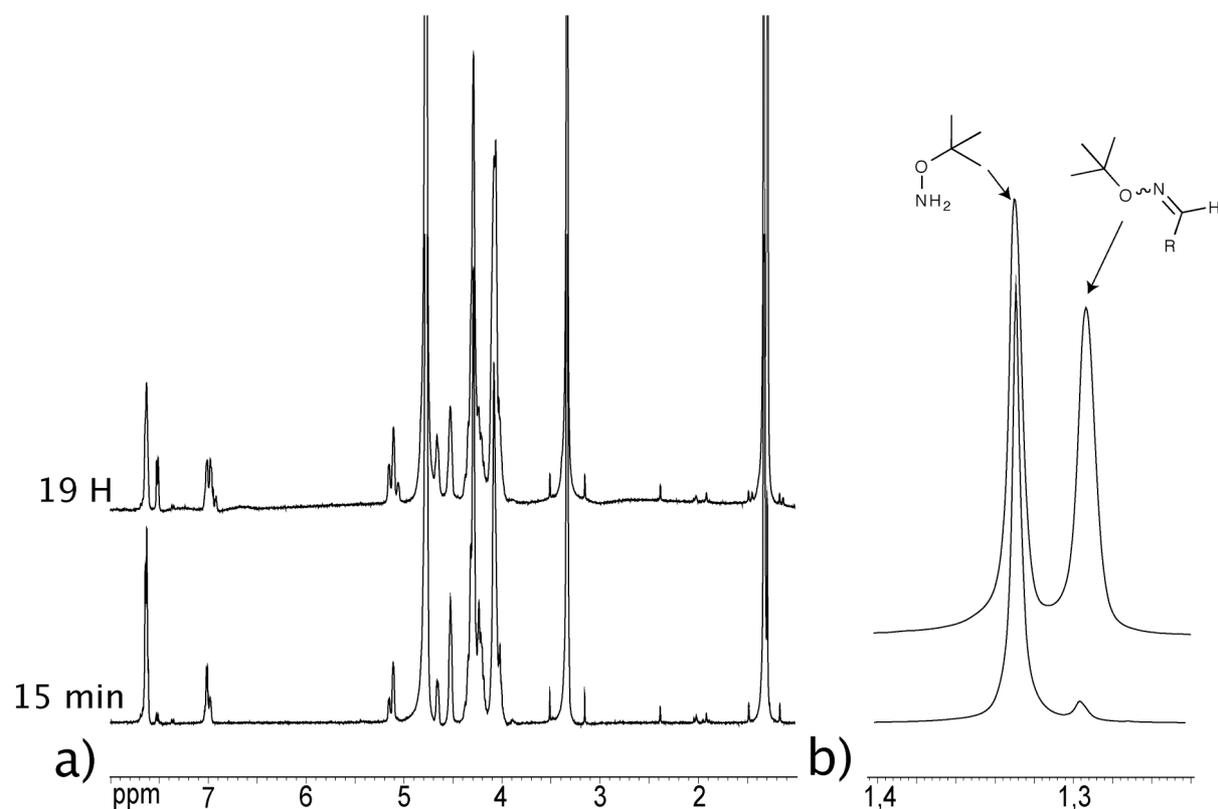


Figure IV16: a) Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction de terminaison de chaîne dynamique sur le polymère **19P** (20 mM) après addition de l'agent de terminaison **8** (20 mM) à pD=4 après 15 min et 19 h. b) Agrandissement de la zone du spectre où se situent les signaux des fonctions *tert*-butyle de **8** et des *tert*-butyloximes terminales.

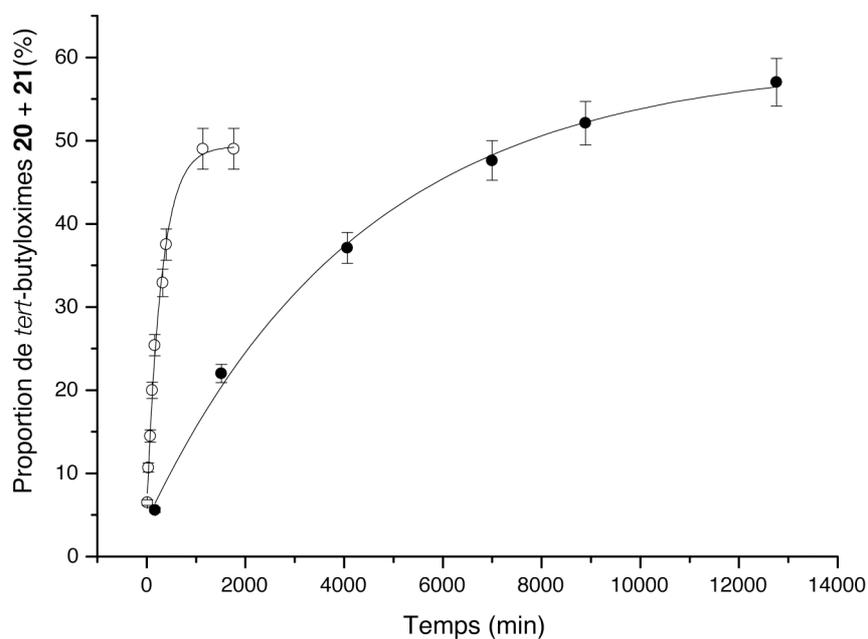


Figure IV17: Influence du pD sur la vitesse d'échange entre **19P** (concentration initiale en monomères 20 mM) et **8** (20 mM). ○ pD= 4; ● pD=6. La proportion de *tert*-butyloximes a été calculée par rapport entre les signaux RMN des protons *tert*-butyl de l'hydroxylamine **8** et *tert*-butyloximes de **20**.

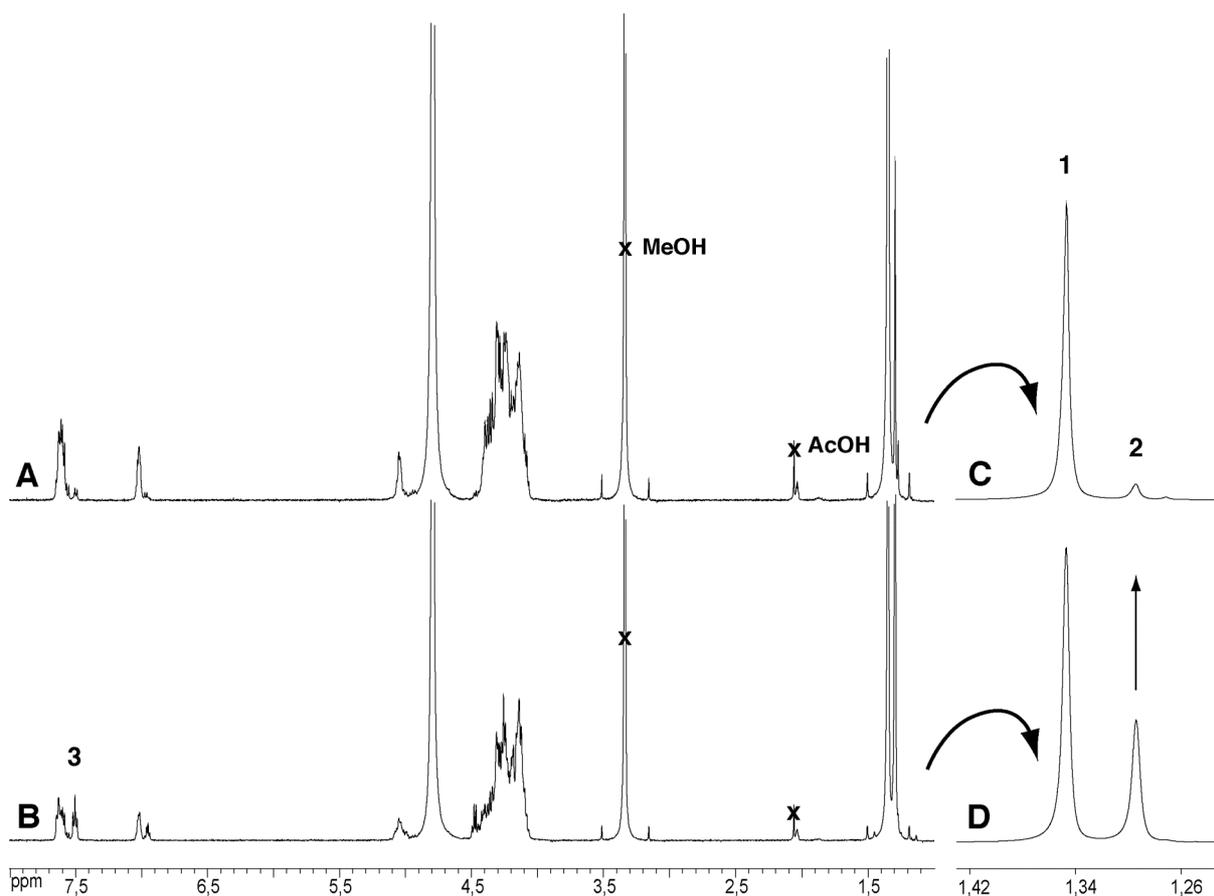


Figure IV18: A Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction de terminaison de chaîne dynamique sur le polymère **18P** (concentration initiale du monomère **18** = 20 mM) après addition de l'agent de terminaison **8** (20 mM) à pD=4 après 70 min et B 22 h 30 min. C Agrandissement de la zone du spectre A où se situe les signaux des fonctions *tert*-butyl de **8** et des *tert*butyloximes terminales (signal 2) et de la *tert*-butylhydroxylamine **8** (signal 1). D Agrandissement de la zone du spectre B où se situe les signaux des fonctions *tert*-butyl de **8** et des *tert*butyloximes terminales et de la *tert*-butylhydroxylamine **8**.

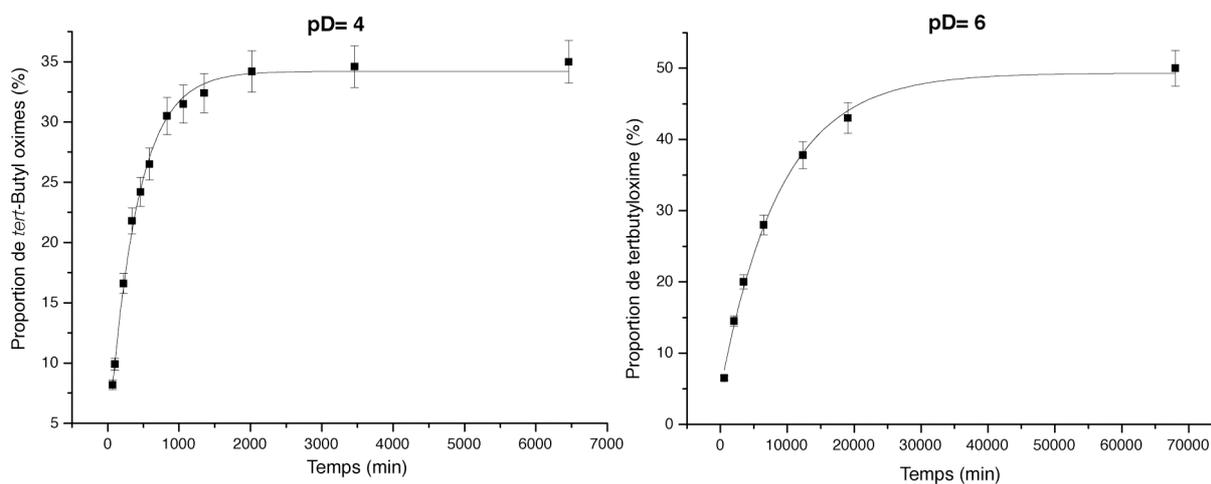


Figure IV19: Influence du pD sur la vitesse d'échange entre **18P** et **8**. ■ pD= 4; ● pD=6. La proportion de *tert*-butyloximes a été calculée par rapport entre les signaux *O-tert*-butylhydroxylamine et *tert*-butyloximes.

Le temps de demi-échange pour cette réaction de terminaison de chaîne dynamique est de 244 min à pD=5 et 2780 min à pD=4 pour 18P avec une concentration initiale en monomère de 20 mM. Pour 19P le temps de demi-échange est de 165 min à pD=4 et 2410 min à pD=6 avec une concentration initiale en monomère de 20 mM. Il n'a pas été possible de suivre cet échange à pD=5 à cause d'un recouvrement des signaux de la *tert*-butylhydroxylamine **8** et des *tert*-butyloximes terminales. Les cinétiques d'échange sont plus lentes que sur le composé modèle **7**. Cela peut s'expliquer par deux effets:

- un effet stérique; la réaction est plus lente sur le polymère plus encombré que **7**.
- un effet de concentration; plus le polymère est long, plus sa concentration diminue.

Lorsque la réaction de terminaison de chaîne a été suivie par RMN DOSY nous avons pu constater l'incorporation de la *tert*-butylhydroxylamine **8** ($D=640 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) dans le polymère en mesurant le coefficient de diffusion des signaux des *tert*-butyloximes terminales de **20** ($250 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1} < D < 315 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$). Cet accroissement du coefficient de diffusion des espèces polymériques est interprété comme un raccourcissement du polymère, conséquence de l'incorporation de l'agent de terminaison. Après équilibration de **19P** avec 1 équivalent de *O*-*tert*-butylhydroxylamine **8** à pD= 4, nous avons déterminé le coefficient de diffusion du polymère et ensuite calculé un rayon hydrodynamique sphérique compris entre 6.3 et 8 Å. Ces valeurs sont à comparer avec le polymère **19P** isolé dont le r_{SPH} est compris entre 9,5 et 11 Å.

On peut donc en conclure que l'addition d'un agent de terminaison réduit la taille de 19P.

Conclusion et perspectives

Le composé oxime modèle **7** a été utilisé pour démontrer la réversibilité de la jonction oxime dans le cadre de la chimie des sucres dans des conditions aqueuses, à pH acide. Cette jonction a ensuite été appliquée à la préparation des polymères dynamiques **18P** et **19P**, tous deux préparés à partir de monomères dérivés de sucres. Les fonctions complémentaires pour la polymérisation, aldéhyde et alcoxylamine, peuvent être, soit toutes les deux sur un même monomère (**18P**), soit sur des unités sucres différentes (**19P**).

Les analogues dynamiques d' α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides 18P et 19P qui ont été préparés par polycondensation d'oximes, ont été caractérisés par RMN du

¹H, RMN DOSY, et spectrométrie de masse MALDI. Leur réversibilité a été démontrée par incorporation d'un agent de terminaison, et le suivi de cette réaction par RMN du ¹H. Les résultats ont mis en évidence une modification de la composition et de la taille de ces polymères suite à une réaction d'échange, ce qui démontre leur caractère dynamique du point de vue de leur constitution.

Les échanges sont plus lents à pD= 6 alors qu'ils sont accélérés à des valeurs de pD plus acides comme pD= 4 ou 5.

Cette approche constitue un nouvel outil pour la synthèse d'analogues d'oligoarabinofuranosides. Elle est de ce fait intéressante pour la préparation d'inhibiteurs potentiels de la synthèse de ces biopolymères dans les mycobactéries, la synthèse de modulateur de la réponse immunitaire, ou de ligands synthétiques pour l'étude des interactions cellulaires.¹² Comme le motif aldéhyde 2,5-anhydro-D-mannose **6** peut être introduit dans un grand nombre de glycoaminoglycanes naturels¹³, on peut aussi espérer que notre méthodologie pourrait être étendue à la préparation d'autres polymères dynamiques ou plus généralement à la chimie combinatoire dynamique des glycanes.

La combinaison méthylcétone/alkoxylamine

Composés modèles et études cinétiques d'échanges :

Etant à la recherche d'autres fonctions applicables à la chimie constitutionnelle dynamique des sucres, nous nous sommes intéressés à une classe particulière de fonctions cétones, les 1-β-C-glycosylpropan-2-ones. Les composés du type **23** sont accessibles en une étape à partir de l'hexose réducteur **22** correspondant¹⁴ ce qui est un avantage non négligeable si l'on envisage une synthèse de monomère courte.

¹² a) First Synthesis of Methyl α-C-D-Arabinofuranosyl-α-D-Arabinofuranoside: the C-disaccharide Segment Motif C of *Mycobacterium tuberculosis*. M. K. Gurjar, R. Nagaprasad, C.V. Ramana. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7577-7579. c) Synthesis of Oligosaccharides as Potential Inhibitors of Mycobacterial Arabinosyltransferases. Di- and Trisaccharides containing C-5 Modified Arabinofuranosyl Residues. O. M. Cociorva, T. L. Lowary. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 853-865. d) Chemistry and Biology of Arabinofuranosyl- and Galactofuranosyl-containing Polysaccharides. J. B. Houseknecht, T. L. Lowary. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 677-682. e) The Antituberculosis, Antitumor, Multibranching Dodecafuranoarabinan of *Mycobacterium* Species has been Assembled from a Single n-pentenylfuranoside Source. J. Lu, B. Fraser-Reid. *Chem. Commun.* **2005**, 862-864.

¹³ a) A Novel Strategy to Generate Biologically Active Neo-Glycosaminoglycan Conjugates. J. Rong, K. Nordling, I. Björk, U. Lindahl. *Glycobiology* **1999**, 9, 1331-1336. b) Interactions of Heparin/heparan Sulfate with Proteins: Appraisal of Structural Factors and Experimental Approaches. A. K. Powell, E. A. Yates, D. G. Fernig, J. E. Turnbull. *Glycobiology* **2004**, 14, 17R-30R. c) Microarrays of heparin oligosaccharides obtained by nitrous acid depolymerization of isolated heparin. J. L. de Paz, D. Spillmann, P. H. Seeberger. *Chem. Commun.* **2006**, 3116-3118.

¹⁴ a) A Convenient, One Step, Synthesis of β-Glycosidic Ketones in Aqueous Media. F. Rodrigues, Y. Canac, A. Lubineau. *Chem. Commun.* **2000**, 2049-2050. b) One-Step Synthesis of β-C-Glycolipid Derivatives from Unprotected Sugars. Y. Hersant, R. Abou-Jneid, Y. Canac, A. Lubineau, M. Philippe, D. Semeria, X. Radisson,

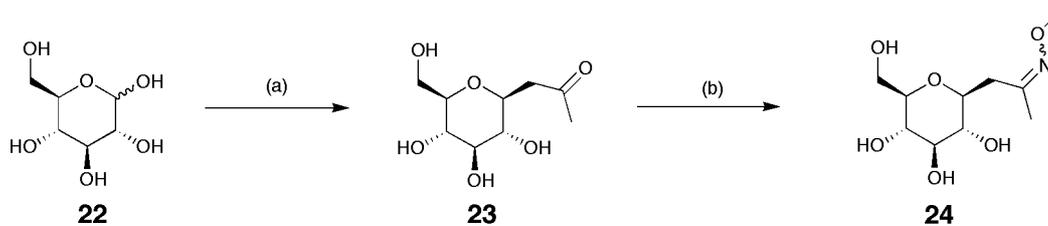


Figure IV20: Préparation de l'oxime modèle **17**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) 2,4-pentanedione, Na_2CO_3 , H_2O , 80°C (b) $\text{MeONH}_2\cdot\text{HCl}$ **4**, Na_2CO_3 , 57%.

Ce type d'oxime est également connu pour être stable dans une large gamme de pH et a été utilisé pour décorer des peptides avec des saccharides d'intérêt biologique.¹⁵ Pour déterminer si cette classe de composés est applicable à la chimie constitutionnelle dynamique, une étude cinétique a été conduite à partir de la cétone modèle **24**. La condensation de **23** et de la *O*-methylhydroxylamine **4** est rapide, le temps de demi-réaction pour la formation de **24** est de 6 min, une concentration initiale de 20 mM pour **23** et **4**, à pD= 5. Le taux de conversion, c'est-à-dire le rendement de la réaction de condensation, est élevé. Il est de 99% à pD= 5, et de 98% à pD= 4, à une concentration de 20 mM en réactifs de départ **23** et **4**.

Nous avons ensuite déterminé la cinétique d'échange entre l'oxime modèle **24** et la *O*-*tert*-butylhydroxylamine **8** en conditions aqueuses et à différents de pD.(Figure IV21)

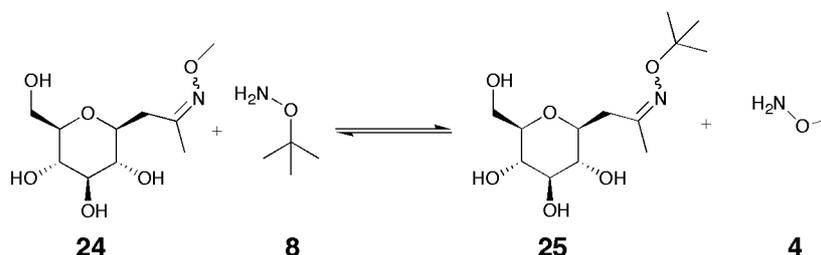


Figure IV21: Echange entre l'oxime modèle **24** et la *O*-*tert*-butylhydroxylamine **8**.

Cette réaction peut être suivie par RMN du ^1H en intégrant les signaux correspondants aux formes E et Z de la *tert*-butyloxime **25** qui sont formés au cours de l'échange. (Figure IV23) La figure IV22 montre l'influence du pD sur la cinétique d'échange entre **24** et **8**. Le tableau IV3 résume les temps de demi-réaction (nécessaire pour arriver à 50% de la proportion de la nouvelle oxime **25** à l'équilibre).

M.-C. Scherrmann. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 741-745. c) C-Glycosides by Aqueous Condensation of β -Dicarbonyl Compounds with Unprotected Sugars. I. Riemann, M. A. Papadopoulos, M. Knorst, W.-Dieter Fessner. *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 147-154.

¹⁵ A Highly Convergent Approach to *O*- and *N*-linked Glycopeptide Analogues. F. Peri, L. Cipolla, B. La Feria, P. Dumy and F. Nicotra. *Glycoconjugate J.* **1999**, 16, 399-404.

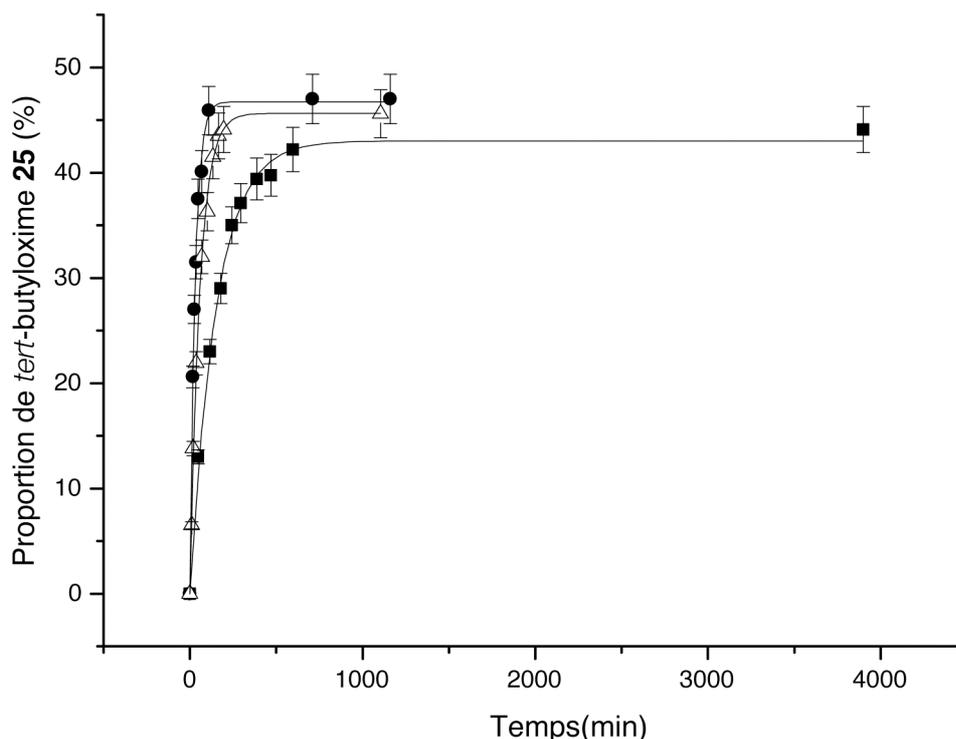


Figure IV22: Influence du pD sur la cinétique d'échange entre **24** (20 mM) et **8** (20mM). ● pD= 4; △ pD= 5; ■ pD= 6. La proportion de **25** a été déterminée à partir des intégrations des signaux *tert*butyl de **8** et de **25** par RMN du ¹H.

Tableau IV3: Influence du pD sur le temps de demi réaction d'échange ($T_{1/2}$) entre **24** (20 mM) et **8** (20 mM) dans le D₂O.

	pD= 4	pD= 5	pD= 6
$T_{1/2}$ (min)	33	39	108

Cette étude montre que la fonction oxime formée à partir de 1-β-C-glucosylpropan-2-ones est réversible dans des conditions de pH allant de 4 à 6. Les cinétiques d'échanges sont plus rapides que dans le cas de l'échange entre 7 et 8 (page 178). Il est intéressant de noter qu'à pD= 6 l'échange entre 24 et 8 est 7 fois plus rapide que l'échange entre 7 et 8 dans les mêmes conditions (108 min pour 24 contre 777 min pour 7).

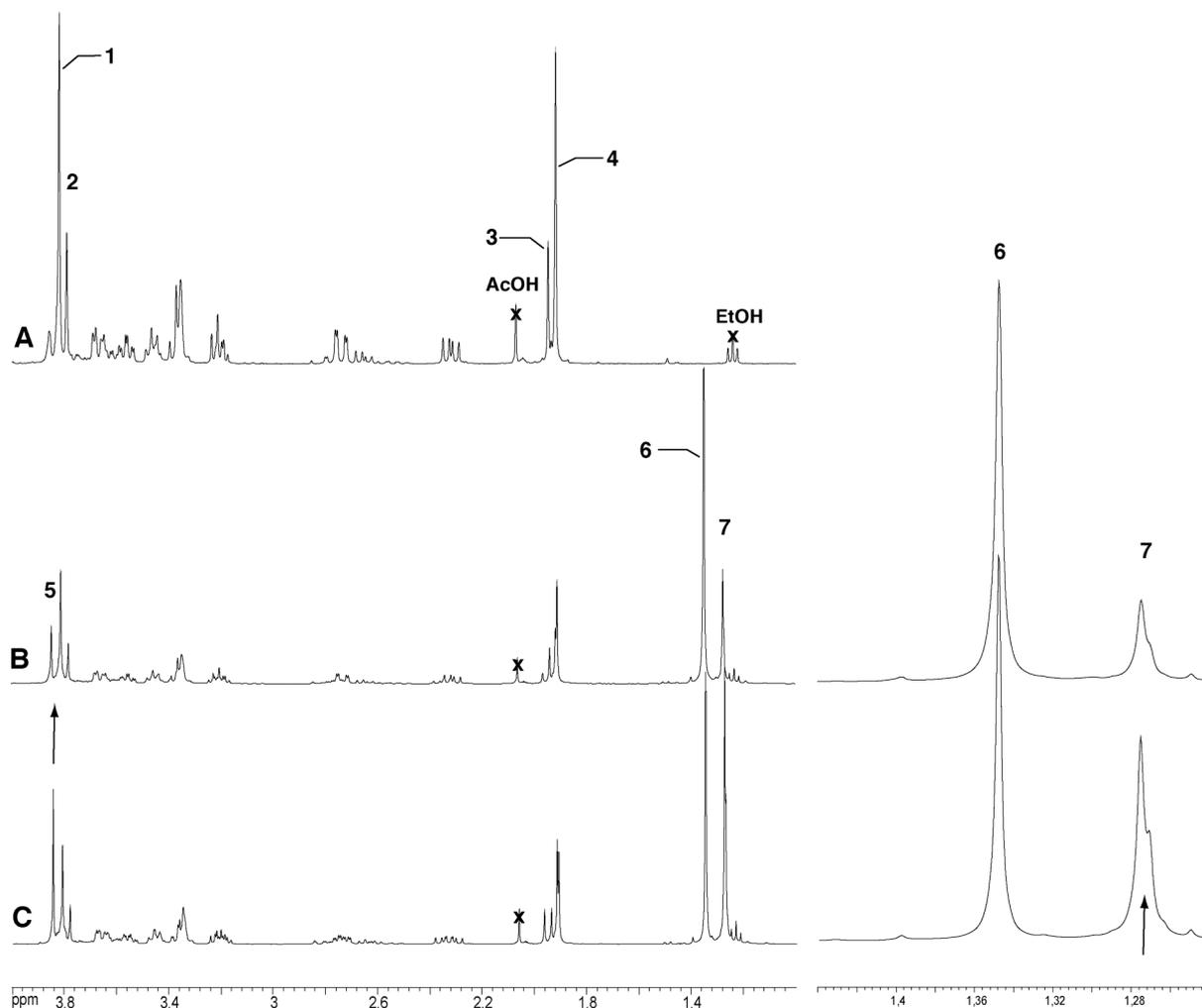


Figure IV23: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du composé oxime modèle **24**. On peut clairement identifier les signaux correspondant aux groupements methoxy-(signaux 1 et 2) et méthyles (signaux 3 et 4) des formes E et Z de la fonction oxime. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction d'échange entre le composé oxime modèle **24** (20mM) et la *O-tert*-butylhydroxylamine **8** (signal 6) (20mM) après 16 min à pD=4. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction d'échange entre le composé oxime modèle **24** (20mM) et la *O-tert*-butylhydroxylamine **8** (20mM) après 1h 49 min à pD=4. On peut suivre l'apparition des methylhydroxylamine libre (signal 5) et des signaux *tert*-butyloximes de **25** (signal 7).

Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides : Dextranes Dynamiques

Après avoir démontré que la jonction oxime de **24** est réversible nous avons décidé de l'appliquer à la préparation d'analogues de polysaccharides naturels. Dans un premier temps, le dextrane **26** nous a servi de modèle pour la préparation du polyoxime **27**. (Schéma IV3) Les caractéristiques et activités biologiques de ce polysaccharide naturel ont été détaillées dans l'introduction (page 45). On peut également mentionner que les oligosaccharides connectés par une liaison glycoside du type $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$ sont connus pour

leur affinité pour les immunoglobulines.¹⁶ Leur synthèse et celle de leurs analogues sont donc du plus grand intérêt.

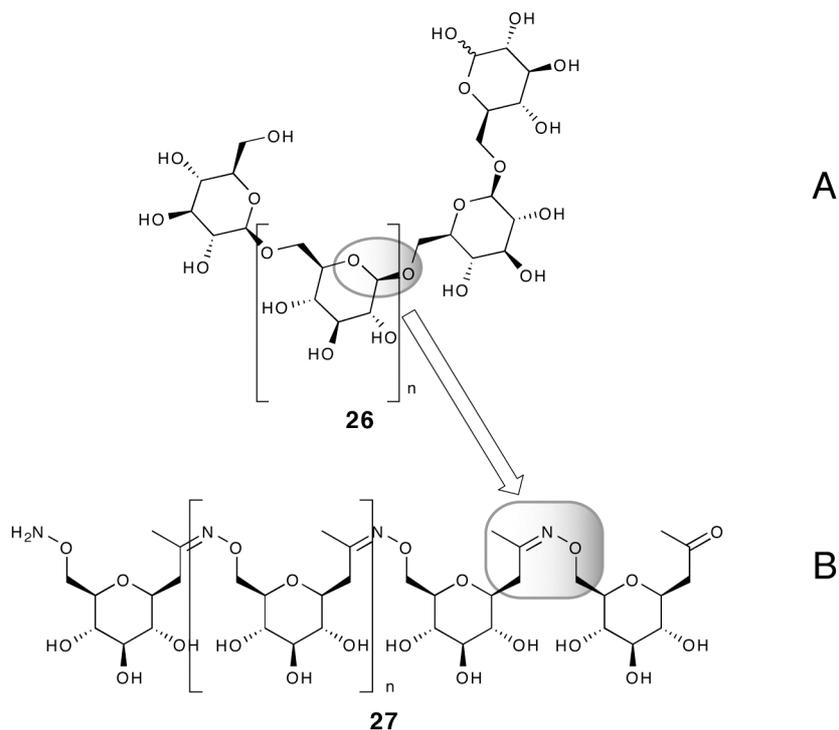


Schéma IV3: A Motif monomérique des dextrans naturels. **B)** Analogue dynamique **27** de ce polysaccharide naturel obtenu en remplaçant la liaison glycosidique par une jonction covalente réversible.

Conception et synthèse du monomère:

La préparation du polymère dynamique **27** nécessite l'introduction d'une fonction méthylcétone en position 1 et une alkoxyamine en position 6 sur le glucose. La méthylcétone **23** obtenue en une étape à partir du glucose¹⁴ est directement transformée en alkoxyamine protégée **28** par une réaction de Mitsunobu régiosélective. Une protection du groupement carbonyle suivie de la déprotection de l'alkoxyamine fournit le monomère **30**.(Figure IV24)

¹⁶ Mapping of Subsites of Monoclonal, Anti-Carbohydrate Antibodies Using Deoxy and Deoxyfluoro Sugars. C. P. J. Glaudemans. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 25-33.

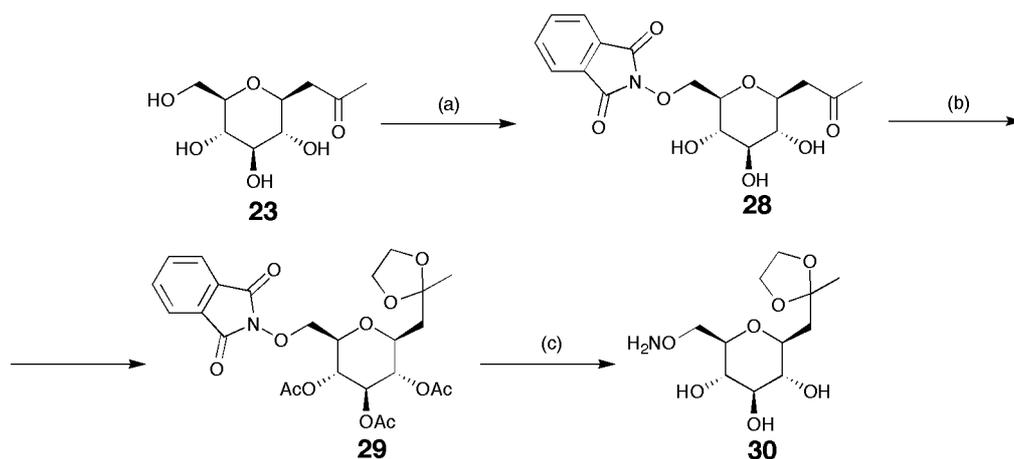


Figure IV24: Synthèse du monomère **30** méthylcétone-alkoxyamine, réactifs et conditions réactionnelles. (a) PPh₃, Diisopropyl azodicarboxylate DIAD, N-hydroxyphthalimide, THF, 20% (b)(i) Ac₂O/Pyridine 1/1 (ii) Ethylène glycol, Triméthylorthoformate, acide *p*-toluène sulfonique (c) butylamine, MeOH 38% sur 3 étapes.

Polymérisation

L'acétal de **30** est rapidement hydrolysé *in situ*. Après 40 min à température ambiante dans une solution de D₂O à pH1 on n'observe plus par RMN du ¹H de signal correspondant au méthyle de la fonction acétal.

Tout comme dans le cas de la polymérisation de **18**, on observe déjà la réaction de condensation produisant les oximes durant l'hydrolyse à pH acide. On remonte ensuite le pH pour augmenter le degré de polymérisation.

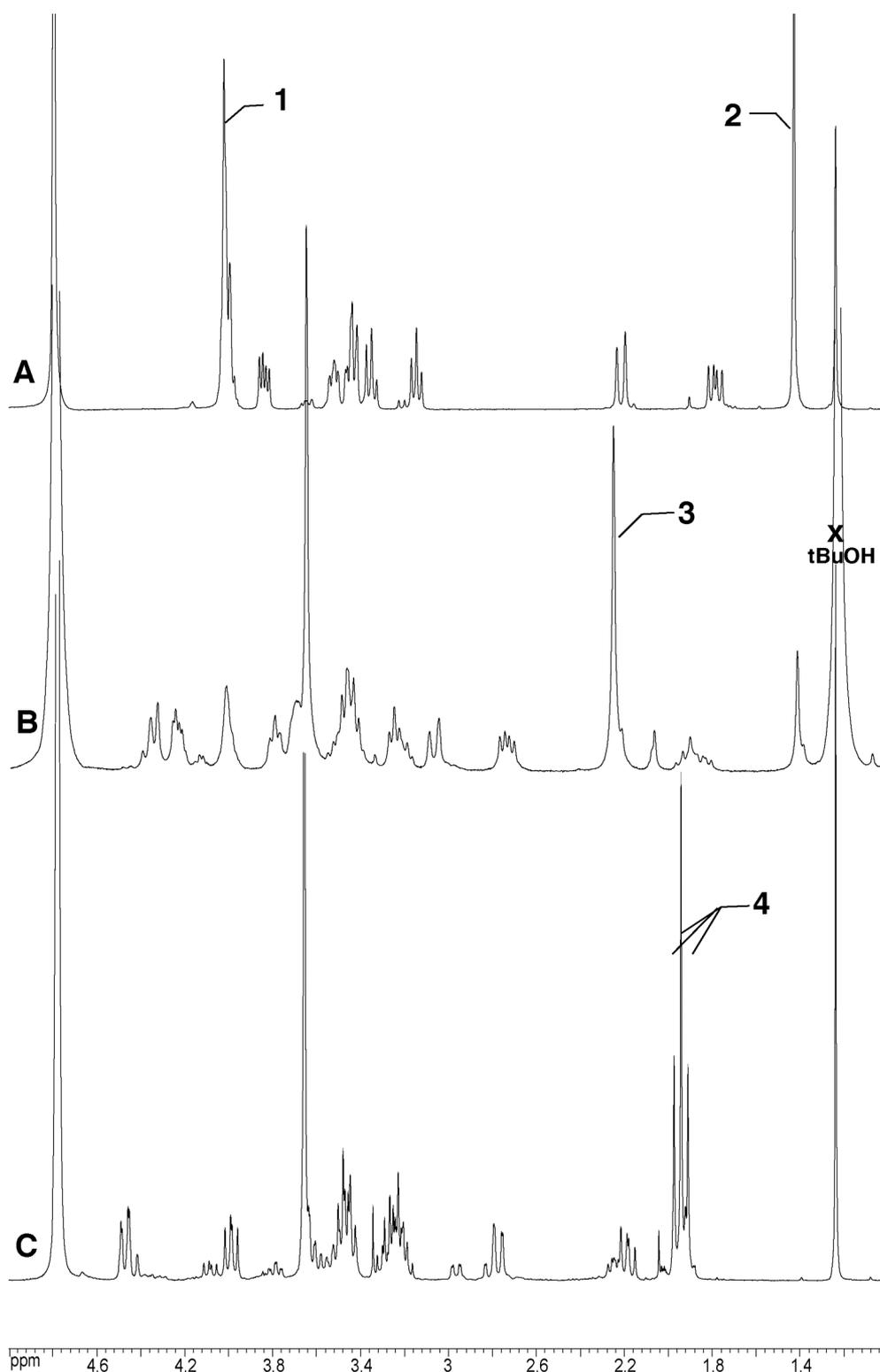


Figure IV25: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du composé protégé **30**, les signal 1 et 2 sont attribués aux protons du cycle dioxolane et méthyles du monomère protégé. **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'hydrolyse de à pD=1, le signal 3 est attribué aux signaux méthyles de la méthyle cétone déprotégée. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère dynamique **27** obtenu par déprotection du composé **30** (60mM) par hydrolyse (40 min à pD<1, à température ambiante) et neutralisation du pD à 5, les signaux 4 sont attribués aux oximes obtenus par polycondensation.

Lors de la remontée du pD à une valeur de 4 ou 5 on constate bien l'augmentation de l'intensité des signaux correspondants à la formation des isomères E et Z des oximes de **27**

(Figure IV25 signaux 4). La polymérisation a donc bien lieu pour former un polymère dynamique analogue des dextrans naturels **27**.

Application à la préparation d'analogues dynamiques de polysaccharides : Cellulose Dynamique

La cellulose naturelle

Les propriétés structurales et en tant que matériaux de ce biopolymère ont été discutées dans l'introduction page 43.

Analogues synthétiques par voie chimique et enzymatiques

Les différentes approches synthétiques pour la préparation de cellulose et de ses analogues sont décrites dans l'introduction page 54 Figure I42.

Conception et synthèse du monomère

Dans l'optique de préparer un analogue dynamique de la cellulose, le monomère **31** a été synthétisé. (Schéma IV4)

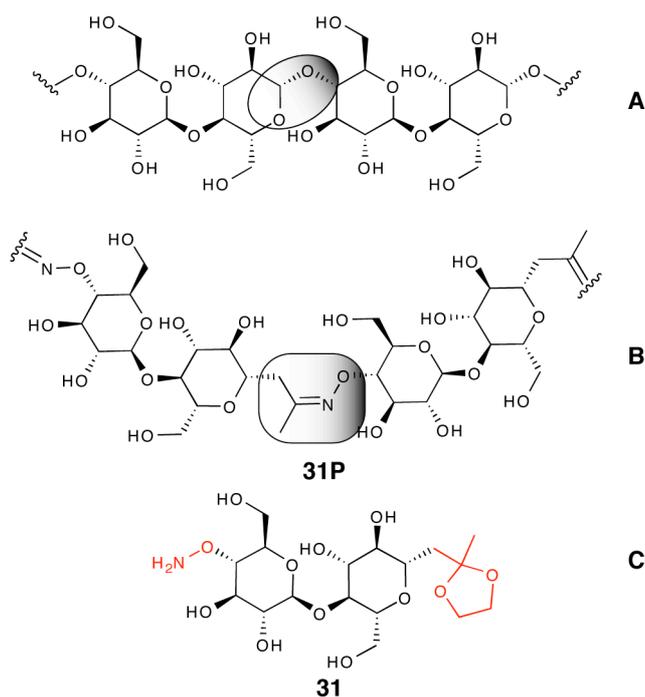


Schéma IV4: A Cellulose naturelle. B Analogue dynamique de cellulose **31P**. C Monomère **31** précurseur du polymère **31P**.

La stratégie établie pour la préparation de l'analogue dynamique de cellulose prend en compte le fait que les propriétés de la cellulose en tant que matériaux découlent en grande partie du réseau de liaisons hydrogènes intra- et inter-chaînes qui s'établit entre les groupements hydroxyles des résidus glucoses liés par une liaison glycosidique de type β - $(1\rightarrow4)$. La conservation de ce type de jonction dans la chaîne principale de notre polymère

dynamique **31P** nous a par conséquent semblé être un critère important si l'on vise d'éventuelles propriétés biomimétiques. Le monomère **31** que nous avons choisi de préparer consiste donc en un analogue du disaccharide qui constitue le motif monomérique de la cellulose : le cellobiose. Nous avons remplacé l'extrémité anomérique C1^I de ce disaccharide par une fonction cétone, et un groupement hydroxyle en position C4^{II} par une hydroxylamine. (Schéma IV4 C)

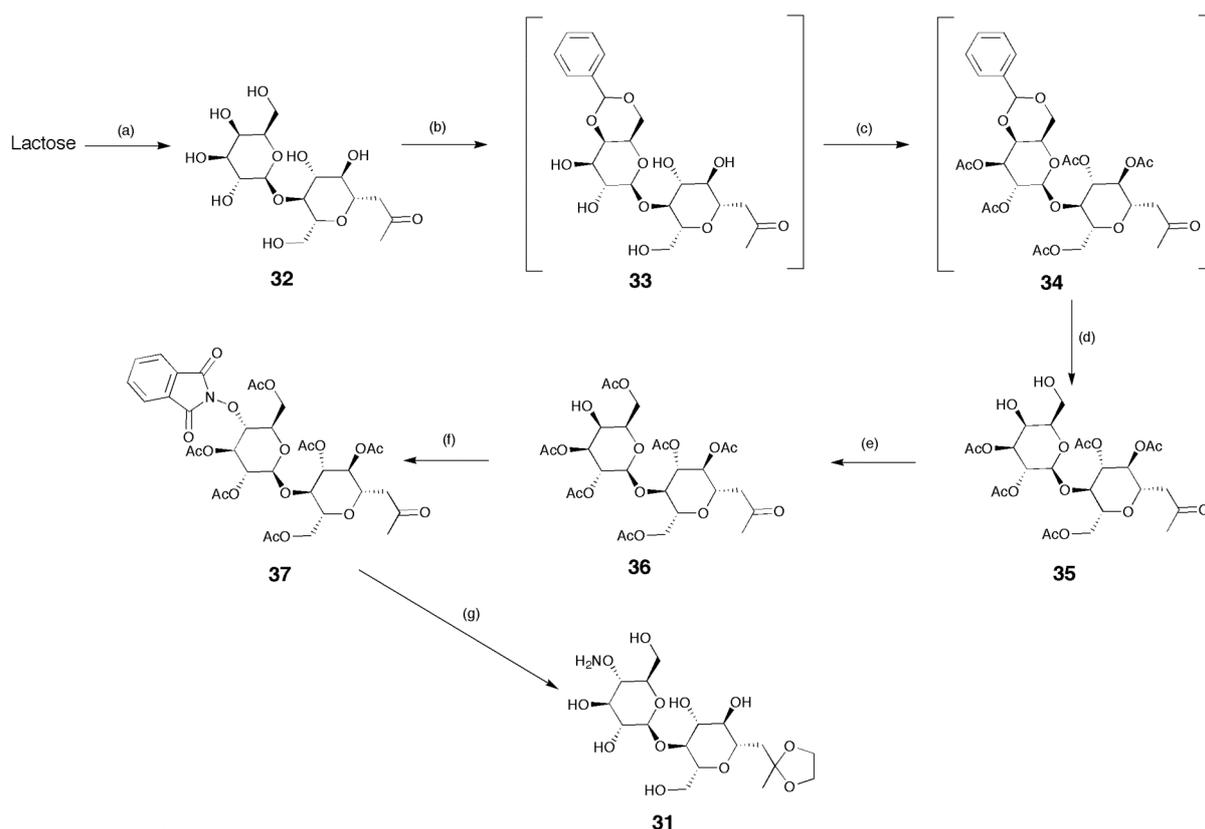


Figure IV26: Synthèse du monomère 31 précurseur de cellulose dynamique, réactifs et conditions réactionnelles.(a) 2,4-pentanedione, Na₂CO₃, H₂O, 80°C, 65% (b) benzaldéhyde diméthylacétal, acide *p*-toluène sulfonique, DMF, 50 mbar, 50°C (c) Ac₂O, pyridine (d) Acide acétique/H₂O 2/8, 90°C, 36% sur 3 étapes (e) Ac₂O, tamis moléculaire 4Å, 75% (f) (i) Anhydride triflique, pyridine, CH₂Cl₂ (ii) Sel de potassium de la N-hydroxyphthalimide, 18-Crown-6, DMF, 54% sur 2 étapes (g) (i) Ethylène glycol, triméthylorthoformate, acide *p*-toluène sulfonique, CH₂Cl₂ (ii) butylamine, MeOH, 71% sur 2 étapes.

La voie de synthèse qui est proposée permet l'obtention du monomère **31**, en 9 étapes à partir du lactose. Une séquence de protection et de déprotection dans des conditions standards¹⁷ permet d'obtenir le diol **35**. L'alcool primaire de **35** est ensuite protégé sélectivement dans des conditions d'acétylations douces en présence d'un catalyseur solide¹⁸ (le tamis moléculaire 4Å). L'alcool **36** qui est obtenu est converti en triflate qui est ensuite soumis à une réaction de substitution nucléophile dans des conditions neutres. Cette

¹⁷ Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. T. K. Lindhorst. Wiley-VCH 2003

¹⁸ An easy approach for the acetylation of saccharidic alcohols. Applicability for regioselective protections. M. Adinolfi, G. Barone, A. Iadonisi, @ M. Schiattarella. *Tetrahedron. Lett.* 2003, 44, 4661-4663.

méthodologie a été mise au point du fait que le triflate secondaire obtenu comme intermédiaire est un composé instable, et l'ajout d'une base dans le milieu réactionnel favorise l'élimination du groupe partant "triflate" par rapport à la substitution nucléophile.

Cette méthodologie nous permet d'accéder à l'alkoxylamine protégée **37** qui est ensuite transformée en monomère **31** par une séquence de protection de la fonction cétone, et de déprotection des groupements acétyles et du phtalimide.

Structure cristalline d'un intermédiaire et rationalisation de la conception du monomère:

Le dérivé du lactose **32** a donné des monocristaux à partir d'une solution aqueuse par diffusion lente d'acétone. La structure obtenue après diffraction de rayons X sur ces cristaux nous donne plusieurs renseignements sur la conformation du motif monomérique **31**.

Comme dans le lactose naturel¹⁹ on constate l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire (Figure IV27 **A** flèche 2) entre O(5^{II})...H-O(3^I) qui favorise une conformation rappelant celle du motif monomérique de la cellulose. On note également la présence de trois liaisons hydrogène latérales intermoléculaires (Figure IV27 **A** flèche 4) entre O(2^I)...H-O(6^I), O(2^{II})...H-O(2^I) et O(3^{II})...H-O(6^{II}). (Figure IV27 **B**) Du fait de l'existence de ces interactions latérales, les molécules de **32** s'orientent parallèlement et s'organisent côte à côte dans une structure en "escalier" où chaque molécule se trouve sous le plan médian de sa voisine. (Figure IV28 **A**) Ce réseau est renforcé par un deuxième réseau de liaisons hydrogènes latérales (Figure IV28 **A** flèche 1) impliquant O(6^{II})...H-O(3^{II}) et O(3^I)...H-O(2^{II}). (Figure IV27 **B**)

¹⁹ α -Lactose Monohydrate: a Redetermination at 150 K. J. H. Smith, S. E. Dann, M. R. J. Elsegood, S. H. Dale, C. G. Blatchford. *Act. Cryst.* **2005**, E61, o2499-o2501.

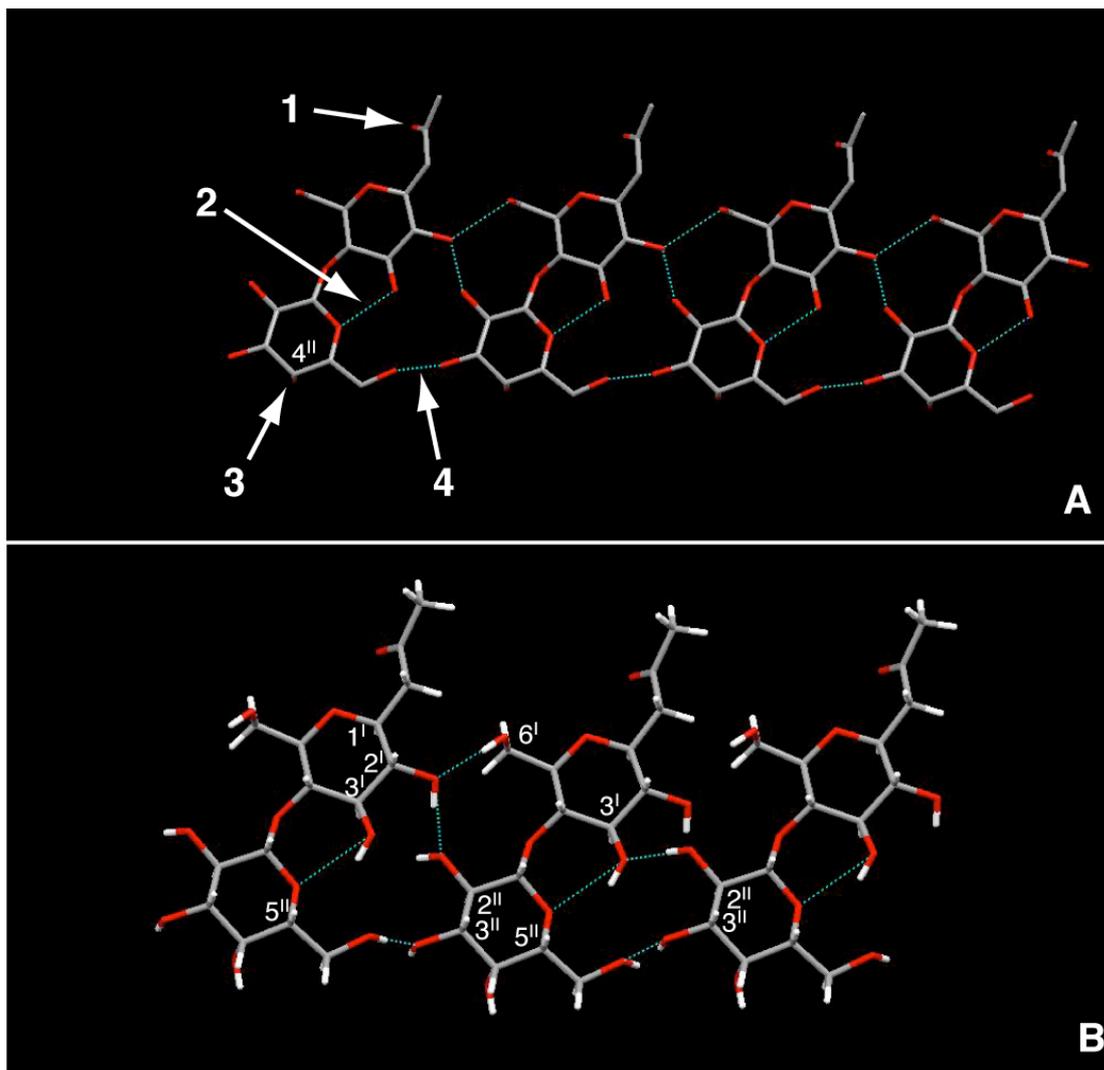


Figure IV27: Structure tridimensionnelle et réseaux de liaisons hydrogènes dans la maille cristalline de **32**.

A l'inverse de ce qui est observé pour le lactose naturel¹⁹, dans lequel l'alcool en C4'' et l'extrémité anomérique sont impliqués dans des réseaux de liaisons hydrogènes, la fonction cétone (Figure IV27 **A** flèche 1) et l'alcool en C4'' (Figure IV27 **A** flèche 3) de **32** ne sont pas impliqués dans des liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles du reste de la molécule. Par contre, ces deux fonctions établissent des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau contenues dans la maille cristalline et qui sont alignées en colonne. (Figure IV28 **B** flèche 2)

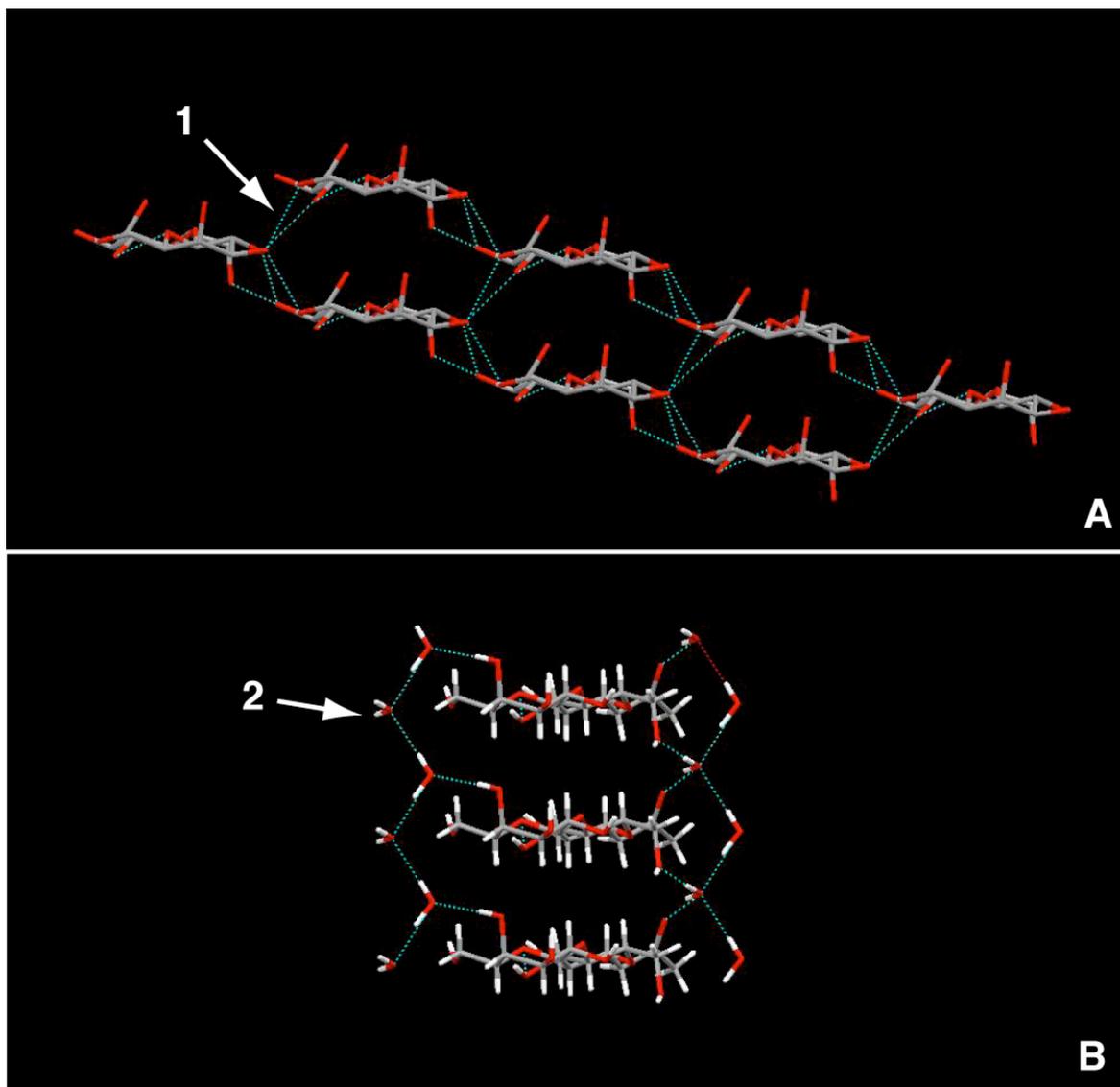


Figure IV28: Structure tridimensionnelle et réseaux de liaisons hydrogènes dans la maille cristalline de **32**.

La seule différence entre le monomère final **31** et ce composé **32** est le remplacement d'un alcool en position C4'' par une hydroxylamine. On peut constater que les deux réseaux de liaisons hydrogènes latérales, qui orientent les molécules de **32** les unes parallèles aux autres, n'impliquent ni la fonction cétone, ni l'alcool en C4'' remplacé par la fonction alkoxyamine dans le monomère final **31**. On peut également voir que le motif disaccharide, présent à la fois dans **32** et dans **31**, est rigidifié par une liaison hydrogène intramoléculaire et qu'il possède la même conformation que l'unité monomérique de la cellulose.(cf. introduction page 44)

On peut donc espérer que cette conformation et cette propension à former des liaisons hydrogènes latérales intermoléculaires se retrouvera dans notre analogue 31 et que des propriétés intéressantes en découleront pour le polymère 31P

(établissement de liaisons hydrogènes latérales entre les chaînes polymériques rigidifiées par les liaisons hydrogènes intramoléculaires identiques à celle de **32**).

Polymérisation :

Le monomère **31** porte à l'extrémité C1^I une fonction cétone protégée et à l'extrémité C4^{II} une fonction alkoxyamine. La déprotection par hydrolyse de la fonction dioxolane de **31** doit donc permettre de générer une fonction cétone *in situ* qui pourra ensuite réagir avec la fonction hydroxyamine d'un monomère **31** pour entraîner la polymérisation par polycondensation.

La déprotection de **31** s'effectue dans des conditions analogues à celle de **30**, c'est-à-dire dans le D₂O à pD<1 et à température ambiante pour une durée de 40 min. Cette réaction d'hydrolyse peut être suivie par RMN du ¹H par la diminution des signaux appartenant à la fonction dioxolane (Figure IV29 **A** signal 1) et au méthyle de **31** (Figure IV29 **A** signal 2). Après neutralisation et ajustement du pD à une valeur de 5 on constate bien l'apparition de signaux attribués aux oximes de **31P** (Figure IV29 **B** et **C** signal 5) ainsi que la diminution de l'intensité du singulet attribué aux méthyles des cétones (Figure IV29 **B** et **C** signal 4). La formation d'oximes a donc bien lieu et le polymère dynamique analogue de cellulose **31P** obtenu est soluble dans le D₂O.

Nous pouvons constater la présence d'une quantité résiduelle de cétone libre dans le mélange après la polymérisation à pD= 5. La réaction de formation d'oxime n'est donc pas complète et la polymérisation est réversible. Pour améliorer la conversion la concentration ou le pD peuvent être augmentés.

Nous avons constaté qu'à pD neutre (7) la formation d'oxime est lente. L'équilibre n'est pas atteint 12 h après neutralisation avec une résine échangeuse d'ions (*Dowex Marathon*). La polymérisation est donc plus rapide à un pD inférieur ou égal à 6.

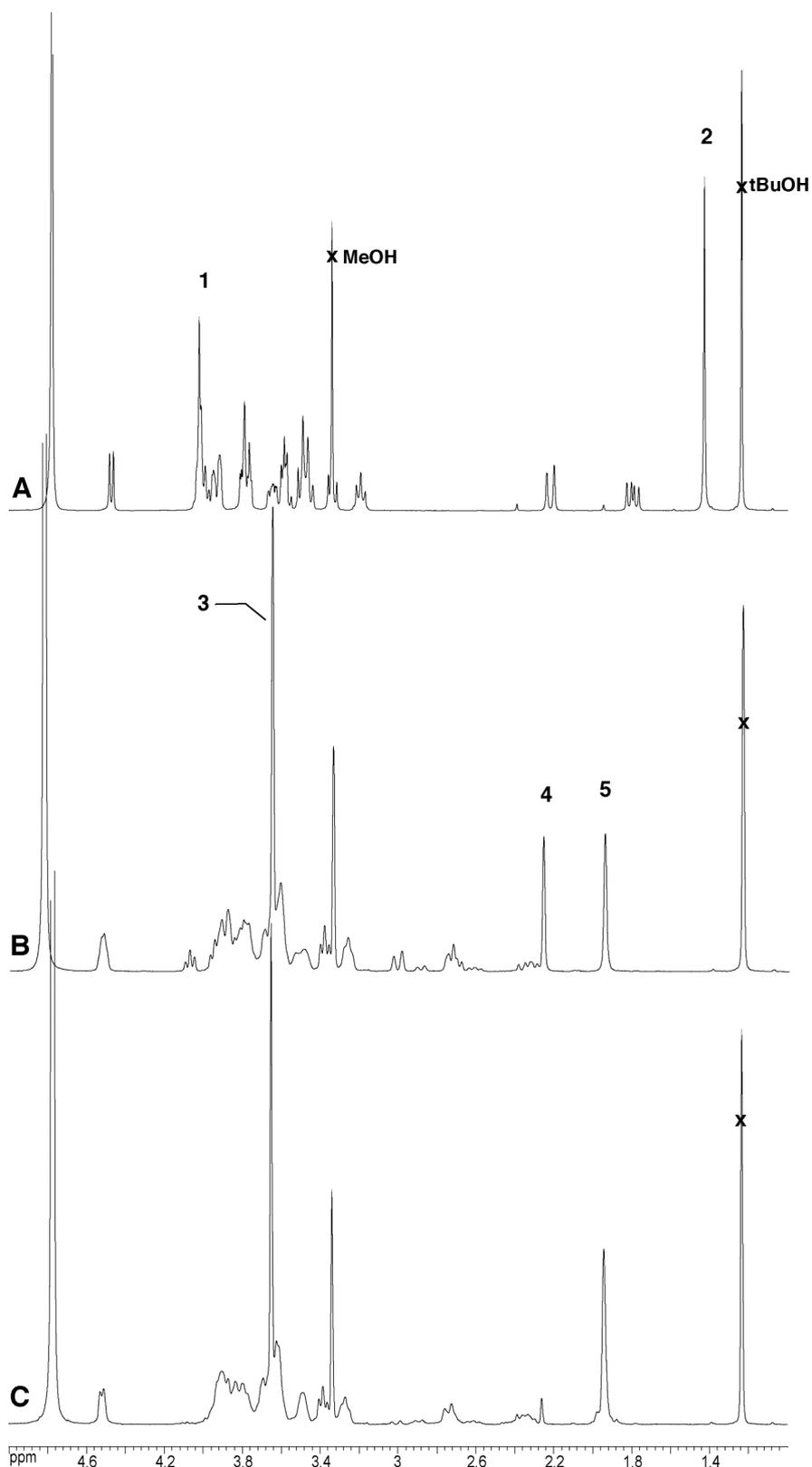


Figure IV29: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du composé protégé **31**. **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'hydrolyse de **31** à pD=1. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère dynamique **31P** obtenu par déprotection du composé **31** par hydrolyse composé (25mM) et neutralisation du pD à 5.

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de montrer l'applicabilité des motifs du type 1- β -C-glycosylpropan-2-one en chimie constitutionnelle dynamique des sucres. **Les cinétiques obtenues pour les réactions d'échange sont plus rapides que celle observées pour la combinaison aldéhyde-alkoxylamine**, ce qui est un argument en faveur de l'utilisation des fonctions méthylcétone pour la préparation d'analogues dynamiques d'oligosaccharides naturels. Il a de plus été démontré que cette réaction peut être appliquée à un grand nombre de sucres réducteurs, ce qui en fait **une méthode générale pour l'obtention de précurseurs de membres de bibliothèques combinatoires dynamiques, ou de monomères pour la préparation de polymères dynamiques analogues de polysaccharides.**

Dans notre cas cette jonction particulière a été mise à profit pour la **préparation d'analogues de dextrans et de cellulose**. Les deux polymères, qui ont été obtenus, demandent encore à être caractérisés plus en détails. Leur caractère dynamique reste notamment à établir.

Pour poursuivre l'étude du polymère **30P** analogue de dextrane, un criblage analogue à celui réalisé chapitre II pour la découverte d'analogues de cyclodextrines dynamiques serait intéressant. L'introduction d'une cible organique pourrait bien lier et favoriser la formation d'oligomères cycliques, tout comme cela a été observé chapitre II.

Dans le cas du polymère **31P** analogue de cellulose, on peut espérer des propriétés particulières de ce polymère en tant que matériaux par d'éventuelles interactions de type liaison hydrogènes inter-chaînes. Une étude au microscope électronique sur des échantillons de ce polymère pourrait, par exemple, mettre en évidence la formation d'agrégats structurés de chaînes (fibres par analogie avec la cellulose), ou de voir s'il y a ou non cristallisation de ce polymère.

CHAPITRE V
ANALOGUES DE POLYSACCHARIDES
NATURELS
LA JONCTION HYDRAZONE

Chapitre 5: Analogues de polysaccharides naturels: La jonction hydrazone

Nous avons vu au chapitre précédent que les jonctions de type oxime permettent de préparer des analogues de polysaccharides naturels solubles dans l'eau, et réversibles dans des conditions de pH acides (4-6). Dans le soucis d'étendre la gamme de pH dans laquelle nous pourrions utiliser les polymères dynamiques nous avons testé l'hypothèse selon laquelle une jonction de type hydrazone serait plus à même de subir des réactions d'échanges rapides à des pH proches de la neutralité.

La combinaison aldéhyde/Hydrazine: Cinétiques et modèles

D'après des études réalisées au laboratoire¹, on peut classer les différents types de jonctions imines selon leur réactivité vis-à-vis de l'hydrolyse et de la cinétique des échanges qui y est associée. Ce classement approximatif donne une idée de l'ordre de réactivité de ces jonctions imines. Dans l'ordre croissant de réactivité vis-à-vis de l'hydrolyse on trouve en premier lieu les oximes (-ON=R-), puis viennent les hydrazones (-NN=R-), puis les acylhydrazones (-CONHN=R-), puis les imines (-N=R-). Les oximes sont donc les imines les plus stables en conditions aqueuses, et les moins réactives pour les réactions d'échanges.

Si on se base sur les résultats obtenus au chapitre précédent, les jonctions oximes formées entre une fonction aldéhyde et une alcoxylamine (aldoxime) sont peu réactives à des pH proches de la neutralité. Le temps de demi-échange pour ce type de jonction a été mesuré comme étant de 13 h environ (777 min) à pD= 6. L'équilibration d'un mélange d'aldoximes, soit la formation d'une bibliothèque constitutionnelle dynamique, à ce pD requiert donc une équilibration de plusieurs jours avant l'on puisse considérer que l'on s'approche de l'équilibre thermodynamique. De telles durées ne sont premièrement pas pratiques du point de vue de l'expérimentateur, mais impliquent également un certain nombre de contraintes si on souhaite utiliser cette bibliothèque à des fins de découverte de ligands ou de récepteurs par des phénomènes d'évolution moléculaire dirigée en présence de cibles moléculaires sensibles.

Ce que nous avons cherché à faire, c'est d'identifier une jonction covalente qui permettrait d'accélérer les réactions d'échanges à des pH proches de la neutralité, afin que les bibliothèques dynamiques qui seraient basées sur cette jonction soit compatibles avec

¹ Sophie Lohmann 2003 Thèse de doctorat ULP Strasbourg.

des cibles biologiques sensibles, comme des cellules vivantes, ou des protéines (lectines, enzymes,...).

Nous avons vu au chapitre III que la jonction acylhydrazone pouvait être utilisée à cet effet pour la préparation de glycopolymères dynamiques avec des temps de demi-échange de l'ordre de 36 min à pD= 6. Par contre les problèmes de solubilité rencontrés au chapitre II lors de la préparation d'analogues de polysaccharides naturels basés sur la formation d'acylhydrazone a fait apparaître les limitations de ce type de jonction. Il a été également montré au chapitre IV que l'utilisation des 1- β -C-glycosylpropan-2-ones en combinaison avec les alkoxyamines donne également lieu à la formation d'oximes (cétoximes) suffisamment labiles pour être utilisées pour des applications en chimie dynamique constitutionnelle à des pH proches de la neutralité, avec un temps de demi échange de 106 min à pD= 6. Par contre l'utilisation de cétone peut causer d'autres problèmes lors d'une éventuelle réduction des fonctions oximes dans le but d'isoler certains composants de manière préparative. En effet, la réduction d'une oxime de cétone chirale peut donner lieu à la formation de 2 diastéréoisomères par fonction cétone réduite, ce qui pourrait grandement compliquer l'analyse d'une bibliothèque d'oxime après réduction. Il serait donc souhaitable d'étendre le nombre de liaisons covalentes potentiellement utilisables pour la préparation de polymères solubles en conditions aqueuses et utilisant comme fonction carbonyle les aldéhydes pour lesquels la réduction ne peut fournir qu'un seul isomère d'amine.

Une solution pourrait se trouver dans l'utilisation de la jonction hydrazone entre un aldéhyde aliphatique et une hydrazine. Comme au chapitre précédent, le 2,5-anhydro-D-mannose **1** a été choisi comme composé modèle pour l'étude des cinétiques d'échange des hydrazones dans le cadre de la chimie des sucres.(Figure V1)

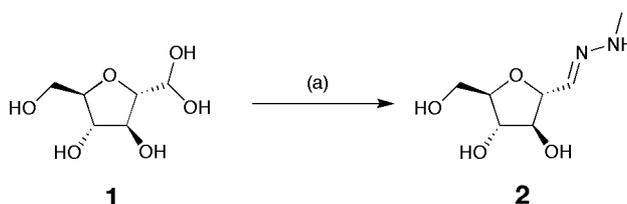


Figure V1: Préparation de l'hydrazone modèle **2** réactifs et conditions réactionnelles.(a) MeNHNH₂, H₂O, 60 %.

Après avoir préparé **2**, nous avons déterminé les cinétiques de la réaction d'échange de la methylhydrazine **5** par la *tert*-butylhydrazine **3** pour cette hydrazone modèle, à différents pH en solution aqueuse.(Figure V2) Cette réaction a été suivie par RMN du ¹H dans le D₂O avec une concentration initiale en réactif **2** et **3** de 20 mM. Le pD de la solution est fixé par une solution tampon acide acétique-*d*₄/acétate de sodium-*d*₃ (pD= 4 ou 5) ou phosphate (pD= 6, 7, et 8) 200mM.

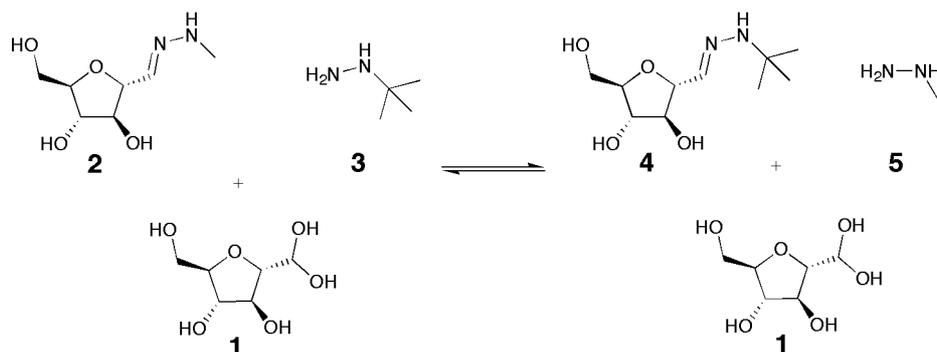


Figure V2: Modèle d'échange entre l'hydrazone **2** et l'hydrazine **3**. La réaction de dissociation des hydrazones **2** et **4** en aldéhyde libre **1** est observable dans certaines conditions de pH (voir plus loin).

La première différence de réactivité constatée entre **2** et sa version analogue le 2,5-anhydro-D-mannose methyloxime, décrit au chapitre précédent, est que **la dissociation de l'hydrazone par hydrolyse en aldéhyde et hydrazine libre est observée dans toute la gamme de pD étudiée.** (Figure V3) De plus, l'équilibre vers la forme hydrolysée de l'hydrazone **2** peut être facilement déplacé en faisant varier le pH. (Figure V4 et Tableau V1) Cette hydrolyse est visible grâce à la présence de l'hydrate de l'aldéhyde **1** (Figure V3 signal 2) et la libération de methylhydrazine **5** libre. (Figure V3 signal 3)

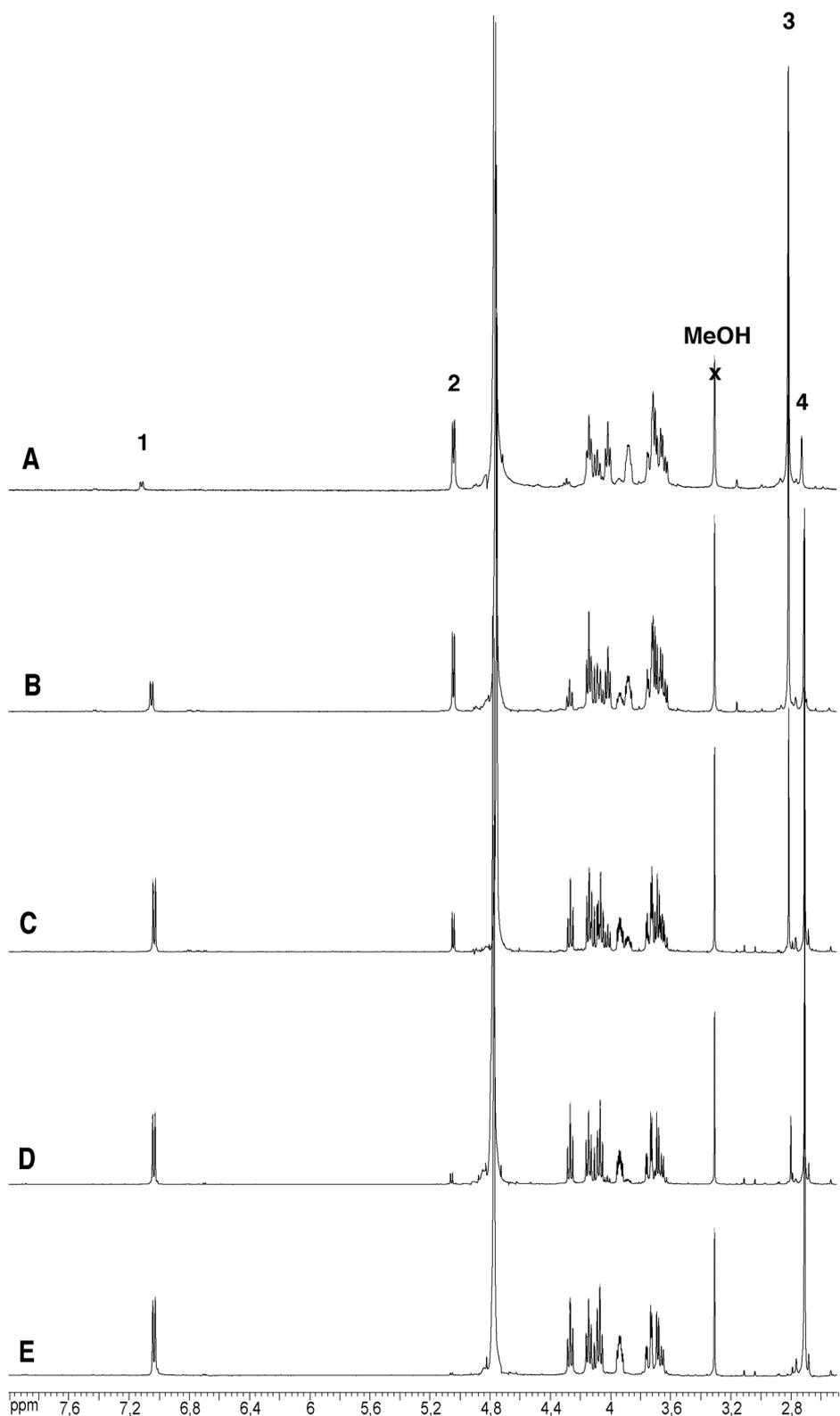


Figure V3: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) obtenu après dissolution du composé hydrazone modèle **2** (20mM) et équilibration 45 min à pD= 4. **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) obtenu après dissolution du composé hydrazone modèle **2** (20mM) et équilibration 50 min à pD= 5. **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) obtenu après dissolution du composé hydrazone modèle **2** (20mM) et équilibration 55 min à pD= 6. **D** Spectre RMN du ¹H (D₂O) obtenu après dissolution du composé hydrazone modèle **2** (20mM) et équilibration 1h à pD= 7. **E** Spectre RMN du ¹H (D₂O) obtenu après dissolution du composé hydrazone modèle **2** (20mM) et équilibration 1h à pD= 8. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans le texte.

Le graphique suivant montre l'évolution de la proportion d'hydrazone **2** par rapport à l'hydrate **1**, à l'équilibre, à une concentration de 20mM en fonction du pD. Connaissant le rendement de la réaction de formation d'hydrazone nous pouvons calculer la constante de formation de cette liaison $K=[2]/[1][5]=R/(100-R)([2]_T - [1]_T R/100)$ où R est le rendement de la formation d'hydrazone en %, $[1]_T$ est la concentration totale en **1** (20 mM) et $[2]_T$ la concentration totale en methylhydrazine (20 mM).²

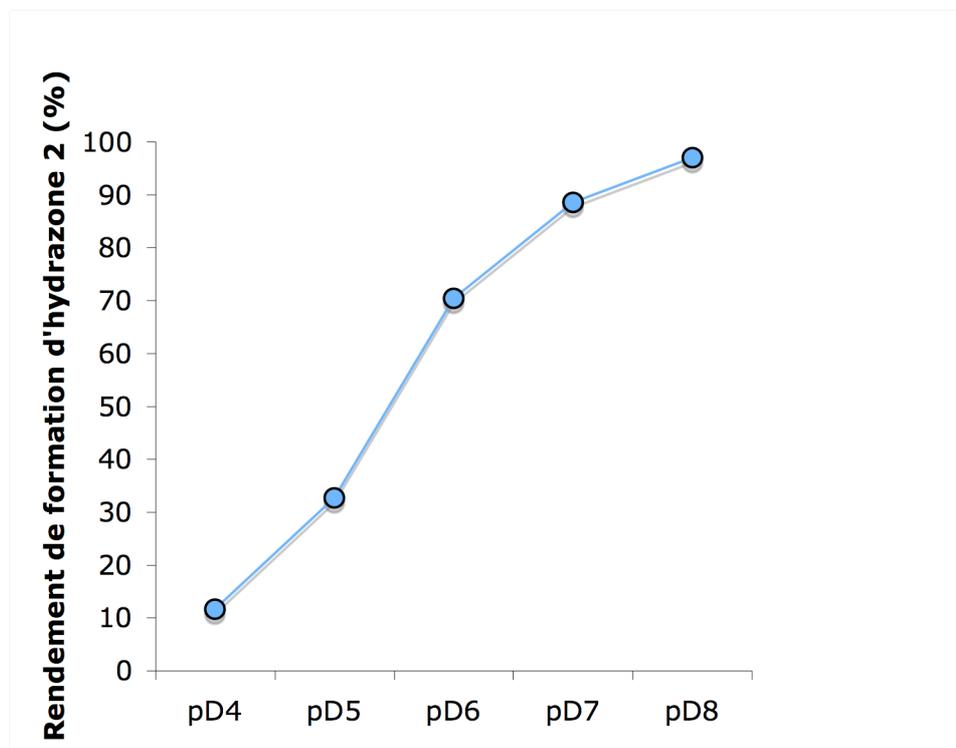


Figure V4: Evolution de la proportion d'hydrazone 2 par rapport à l'hydrate 1.

Tableau V1: Influence du pD sur la proportion d'hydrate **1** par rapport à la quantité d'hydrazone **2**, ou autrement dit sur le rendement de la réaction de condensation à 20 mM, et la constante de formation d'hydrazone K . Ce ratio a été déterminé par intégration relative des signaux d'imine de **2** et d'hydrate de **1** en fonction du pD de la solution, par RMN du $^1\text{H}(\text{D}_2\text{O})$.

	pD= 4	pD= 5	pD= 6	pD= 7	pD= 8
Rendement en 2 (%)	12	33	70	88	97
$K(\text{M}^{-1})$	7	36	401	3346	5389

Après addition de la *tert*-butylhydrazine **3**, la réaction d'échange de groupement hydrazine peut facilement être suivie par l'intégration du signal de l'imine de la nouvelle *tert*-butylhydrazone **4**.(Figure V5 signal 1) On peut également se baser sur l'intégration de la methylhydrazine **5** (Figure V5 signal 3) libérée lors de l'échange par rapport au signal du méthyle de l'hydrazone **2** (Figure V5 signal 4)

² cf. Chapitre II: Polysaccharides dynamiques Linéaires à Jonction Acylhydrazone référence 4 page 69.

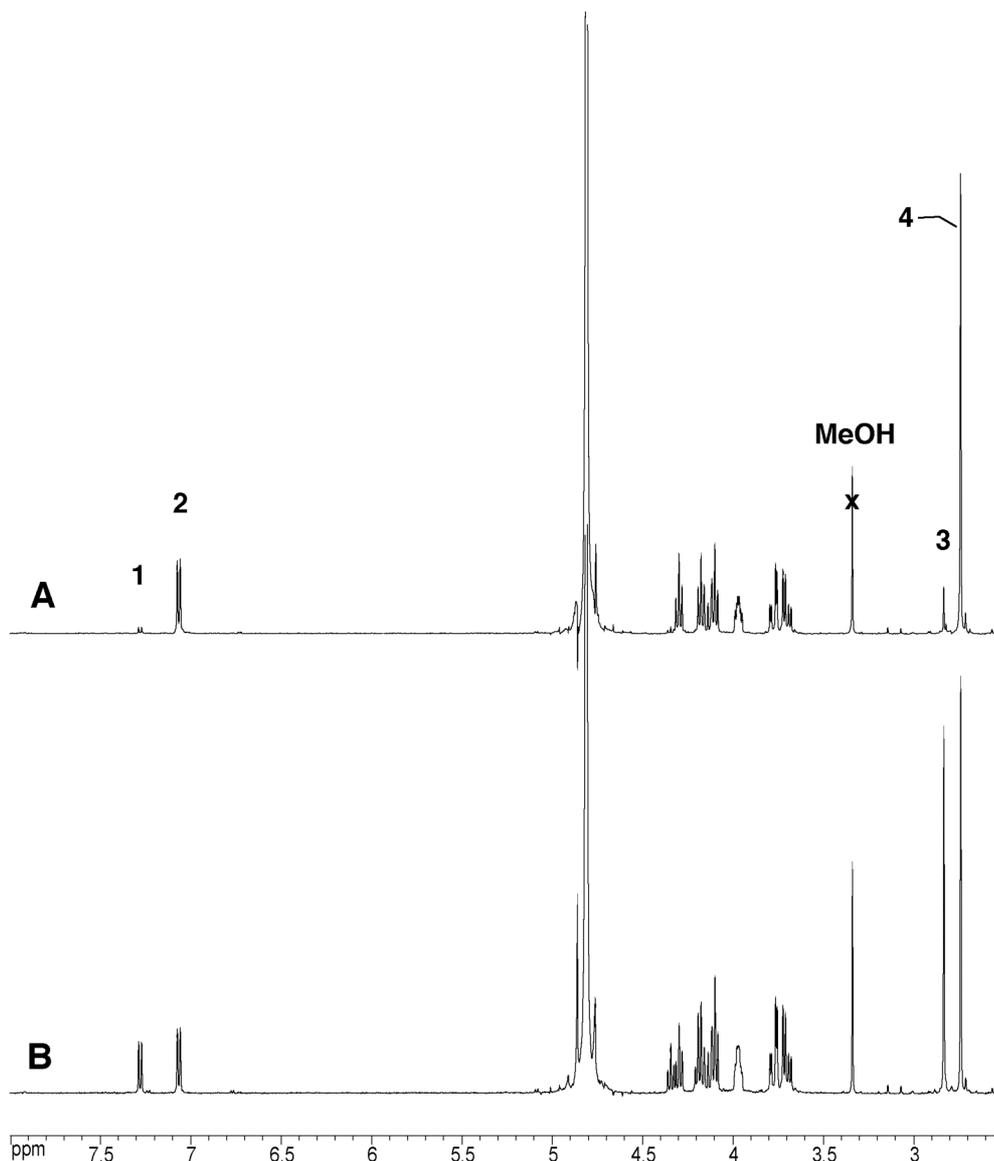


Figure V5: **A** Suivi par RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'échange entre le composé hydrazone modèle **2** (20mM) et la *tert*-butylhydrazine (20mM) **3** à pD=7 après 15 min de réaction. **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) de la réaction d'échange entre le composé hydrazone modèle **2** (20mM) et la *tert*-butyl hydrazine **8** (20mM) à pD=7 après 3 h 03 min de réaction. Les références pour l'attribution des signaux sont à rapporter dans le texte.

La figure V6 représente l'influence du pD sur la cinétique d'échange entre **2** et **3**. Le tableau V2 suivant résume les temps de demi-réaction (nécessaire pour arriver à 50% de la proportion de la nouvelle hydrazone **4** à l'équilibre).

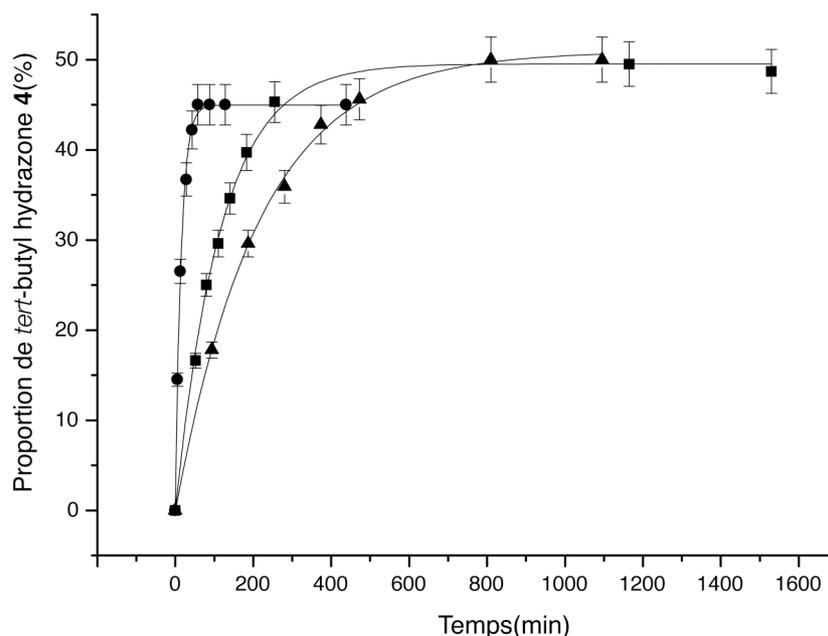


Figure V6: Influence du pD sur la cinétique d'échange entre 2 et 3. Evolution de la proportion de *tert*-butylhydrazone 4 par rapport à l'hydrazone 2 en fonction du pD. ● pD= 6; ■ pD= 7; ▲ pD= 8.

Tableau V2: Influence du pD sur le temps de demi-réaction d'échange entre 2 et 3 ($T_{1/2}$)

	pD= 6	pD= 7	pD= 8
$T_{1/2}$ (min)	10	80	150

Il ressort de ces études que **la constante de formation d'hydrazone K est fortement dépendante du pD (ou du pH) en milieu aqueux.** On pourrait donc contrôler le degré de polymérisation du polymère dynamique, celui-ci étant directement relié à K .³ Cela donnerait accès à un nouveau polymère dynamique polyhydrazone dont le degré de polymérisation serait facilement contrôlable en modifiant le pH.

Si on se place à un pH relativement bas, comme à pH 5 ou 6, le degré de polymérisation sera faible. L'introduction d'une cible moléculaire favorisant des interactions multivalentes pourrait ensuite induire un phénomène de reconnaissance moléculaire et une augmentation du degré de polymérisation du polymère dynamique. Ce polymère dynamique aurait alors un caractère virtuel, ce qui n'a pas encore été exploité.

Il a également été montré que la jonction hydrazone est également labile à des pH proches de la neutralité comme le montrent les temps de demi-échange à pD=6 (10 min), 7 (80 min), et 8 (150 min). Si on effectue une comparaison avec les oximes étudiées au chapitre précédent on constate que **les échanges entre hydrazone et hydrazine sont à pD= 6, 10 fois plus rapides que ceux entre cétoxime et alcoxylamine (chapitre IV page 193), et environ 80 fois plus rapides que ceux entre aldoxime et**

³ cf. Chapitre III: Glycopolymères dynamiques référence 39 page 150.

alkoxylamine (chapitre IV page 178). Cette jonction apporte donc une solution pratique pour accélérer les réactions d'échanges.

Application à la préparation d'analogues d'arabino-furanoses

Comme dans le chapitre II (page 83) et au chapitre précédent ce sont les oligoarabinofuranosides des mycobactéries qui ont été pris comme modèles. Si on remplace la liaison glycosidique α -(1 \rightarrow 5), dans le motif monomérique de ces polysaccharides, par une jonction hydrazone, on obtient un analogue dynamique d'oligoarabinanes. (Schéma V1)

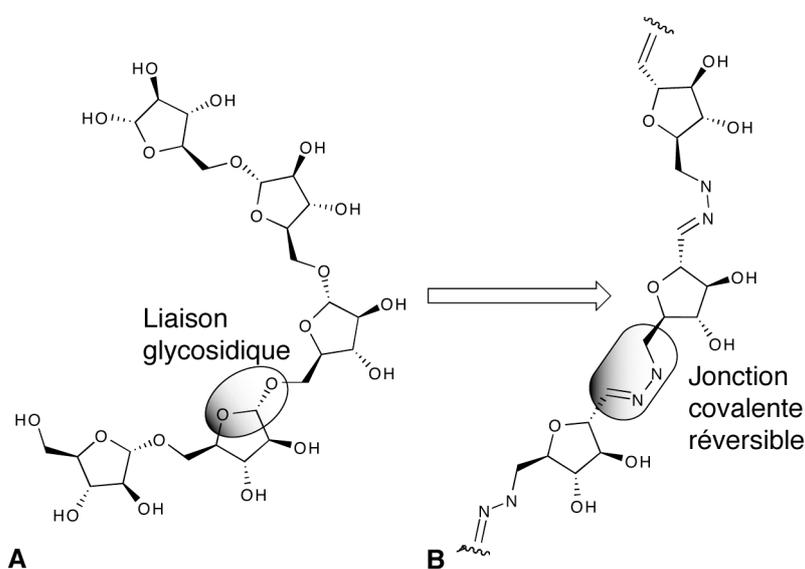


Schéma V1: A α -(1 \rightarrow 5)-D-Oligoarabinofuranoside naturel **B** Analogue dynamique de **A** obtenu en remplaçant la liaison glycosidique par une jonction réversible de type hydrazone.

Nous verrons plus loin que deux approches différentes ont été nécessaires pour synthétiser un polyhydrazone du type de **B** Schéma V1. (Figure IV10)

Synthèse des monomères:

Dérivés "hétéro"-bifonctionnalisés:

La solution la plus simple pour préparer un polymère par polycondensation est de synthétiser un monomère regroupant les deux fonctions chimiques complémentaires pour la réaction de polycondensation. Dans notre cas il s'agit des fonctions aldéhyde et hydrazine. Dans le chapitre IV nous avons déjà rencontré le tosylate **6** en tant qu'intermédiaire. Ce composé est décrit dans la littérature⁴ et possède une fonction aldéhyde protégée en position C1 et un groupe partant en position C6. Il est possible, en principe, de remplacer ce groupe

⁴ cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 7 page 180.

partant par une fonction hydrazine en effectuant une réaction de substitution nucléophile. (Figure V7)

Nous avons donc tenté de faire réagir l'hydrazine sous forme de monohydrate sur ce tosylate **6** en solution dans la DMF, mais sans succès. Par contre en utilisant l'hydrazine monohydrate directement comme solvant on obtient le composé aldéhyde-hydrazine **7**.

La réaction de la méthylhydrazine sur le tosylate **6** permet également d'obtenir un produit stable **8** pouvant être purifié sur gel de silice et identifié comme étant l'hydrazine **8**. (Figure V7)

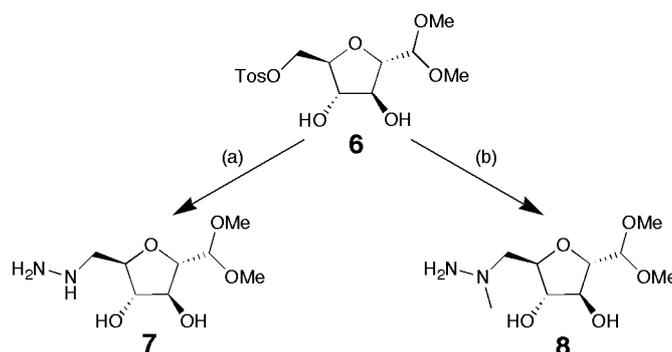


Figure IV7: Synthèse du monomère **6** et **7** réactifs et conditions réactionnelles. (a) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en tant que solvant, température ambiante, 52%; (b) MeNHNH_2 en tant que solvant, température ambiante, 63%.

On peut remarquer que pour la méthylhydrazine, l'alkylation est sélective pour l'azote substitué par un groupement méthyle. Cette plus grande réactivité des hydrazines substituées peut s'expliquer par une plus grande nucléophilie de l'atome d'azote substitué du fait de l'effet inductif donneur du groupement méthyle.

Dérivés "homo"-bifonctionnalisés

Pour préparer un copolymère alterné polyhydrazone, il nous faut le monomère dialdéhyde **9h** (Figure V8) déjà rencontré dans les chapitres précédents (chapitre II page 78, III page 147, et IV page 179) et des monomères bis-hydrazines **11** et **12**. (Figure V9)

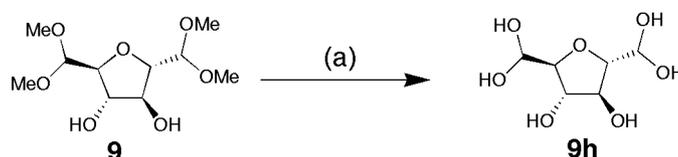


Figure V8: Synthèse du dialdéhyde **10h**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) DCl , $\text{pD} < 1$, D_2O , 50°C , 24 h.

La synthèse des monomères bis-hydrazines, et s'est faite de manière analogue à celle des précurseurs de monomères **7** et **8**, par substitution nucléophile des groupements tosylates de **10** qui est décrit dans la littérature.⁵ (Figure V9)

⁵ Cf. Chapitre IV: Analogues de polysaccharides naturels: La jonction oxime référence 6 page 180.

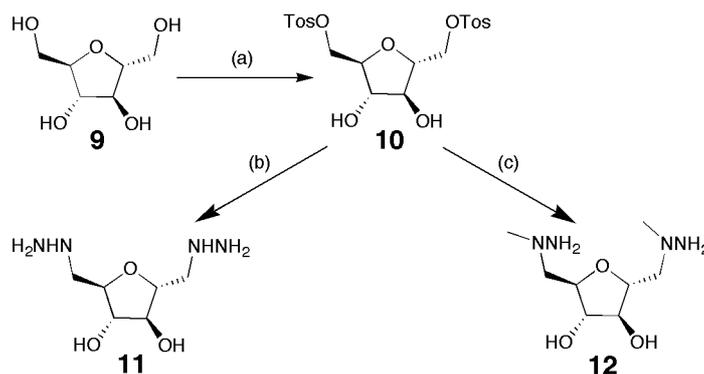


Figure V9: Synthèse des bis-hydrazines **11** et **12**, réactifs et conditions réactionnelles. (a) Chlorure de tosylo, pyridine ;(b) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en tant que solvant, température ambiante, 66%;(c) MeNHNH_2 en tant que solvant, température ambiante, 56%.

Polymérisation

Les monomères **9h**, **11**, **12** et précurseurs de monomères **7** et **8**, devraient permettre de préparer 4 polymères polyacylhydrazones différents.(Figure V10)

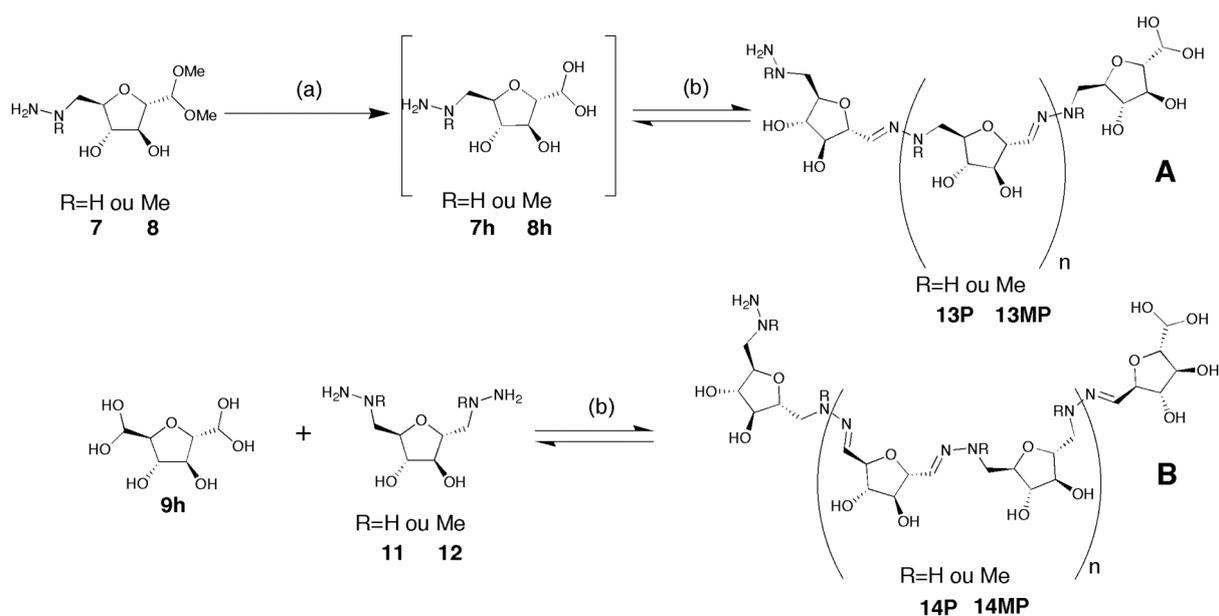


Figure V10: **A** Tentative de préparation des polyhydrazones **13P**, **13MP** par hydrolyse et polymérisation *in situ* de **7** ou **8**. **B** Préparation des copolymères alternés polyhydrazones **14P** et **14MP**. Réactifs et conditions réactionnelles. (a) DCl, $\text{pD} < 1$, D_2O , 50°C, 24 h. (b) D_2O , $\text{pD} = 5-8$.

La polymérisation des monomères aldéhyde-hydrazone **7** et **8** nécessite une déprotection par hydrolyse de la fonction acétal dans des conditions acides ($\text{pD} < 1$) à chaud (50°C) pendant une durée prolongée (24h) par analogie avec la déprotection du composé **9**. Lorsque cette réaction a été entreprise, nous avons très vite constaté que d'une solution incolore, la couleur de la réaction passe rapidement au jaune, ce qui laisse supposer que des réactions secondaires ont lieu. Lorsque la réaction d'hydrolyse des composés **7** et **8** a été suivie par RMN du ^1H , les spectres obtenus ont confirmé que les produits de

polycondensation, s'ils existent, se dégradent rapidement dans les conditions nécessaires à la déprotection de la fonction acétal. Comme l'hydrolyse se fait dans des conditions très acides, il ne devrait pas y avoir formation d'hydrazone. Connaissant l'évolution du rendement de formation de la jonction hydrazone avec le pD, on s'attendrait donc à observer **7h** et **8h** exclusivement sous forme d'hydrate, caractérisé par un doublet bien défini vers 5.1 ppm, et non un massif de pics. La région du spectre correspondant aux protons aromatiques montre également l'apparition d'impuretés, certainement des cycles aromatiques de type furane résultant de réactions de déshydratation du cycle furanose de **7** et **8**. Les spectres sont donc bien trop complexes pour pouvoir être attribués à la forme hydrolysée des composés **7** et **8**. (Figures V11 et V12)

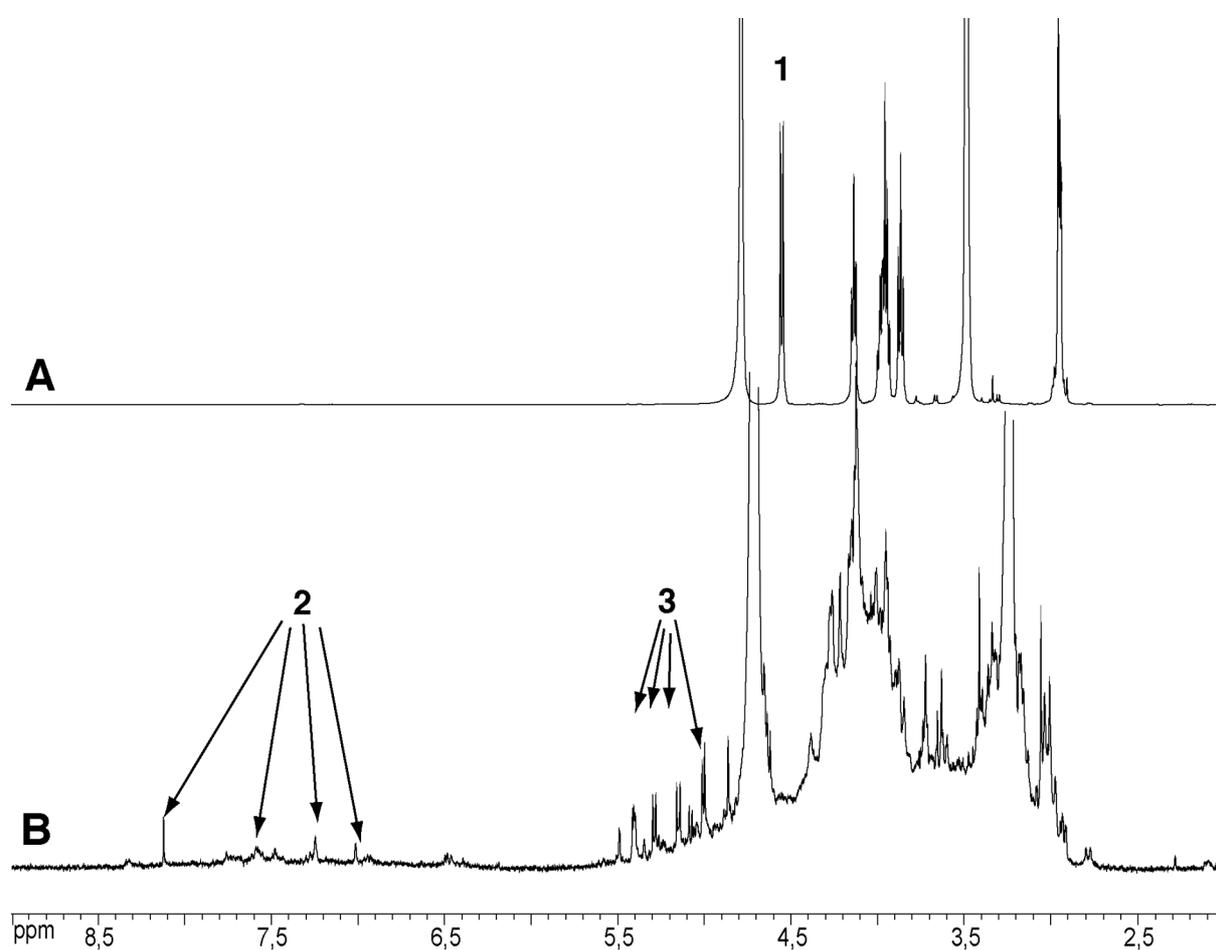


Figure V11: Spectre RMN du ¹H (D₂O) a) du monomère **7** b) de la réaction d'hydrolyse après 16h à 50°C et pD < 1. On constate que l'hydrolyse n'est pas complète mais que le mélange est constitué en majorité de produits de décomposition.

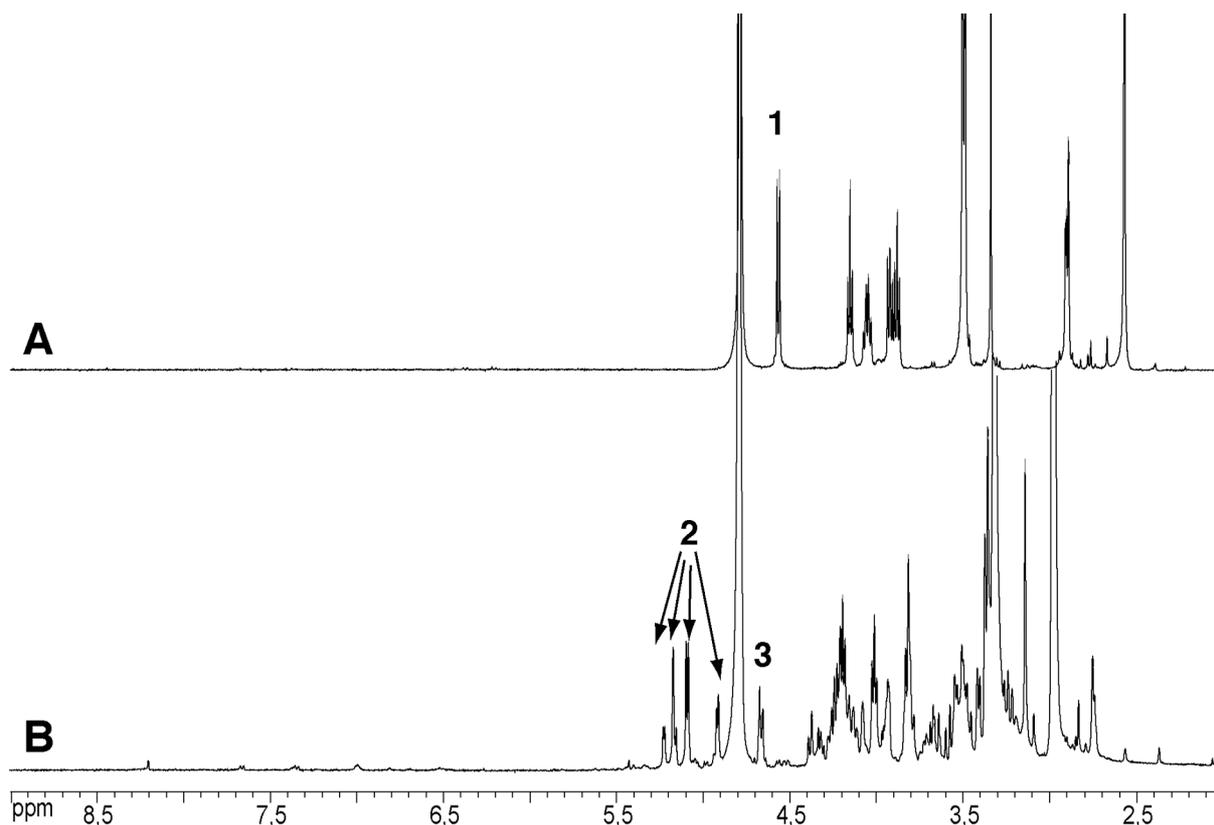


Figure V12: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du monomère **8** **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) de la réaction d'hydrolyse après 12h, à 50°C et $\text{pD} < 1$. On constate que l'hydrolyse n'est pas complète mais que le mélange est constitué en majorité de produits de décomposition.

Il semble donc que les produits de polycondensation **13P**, et **14P**, ou les fonctions hydrazines des précurseurs de monomères **7** et **8** ne soient pas compatibles avec les conditions réactionnelles nécessaires pour déprotéger leur fonction acétal. De fait il n'est pas possible d'obtenir un polymère à partir de ces précurseurs portant, à la fois une fonction diméthylacétal et une fonction hydrazone.

Par contre le composé hydrazone modèle **2** est, quand à lui, stable en solution, à température ambiante, puisqu'il a été possible d'en étudier la réactivité lors des réactions d'échange. Il doit donc être possible d'arriver à générer un polymère polyhydrazone si on réussit soit à éviter l'utilisation de conditions trop dures lors de la déprotection du précurseur de monomère, soit en utilisant les monomères **9h** en combinaison avec **11** ou **12**. Comme la déprotection dans des conditions acides, à chaud, de **9** peut se faire sans la présence simultanée du monomère bis-hydrazone **11** ou **12**, nous devrions éviter les réactions secondaires observées lors de la déprotection de **7** et **8**. Et en effet, après neutralisation et ajustement du pD à la valeur voulue on peut ensuite rajouter une quantité équivalente de **11** ou **12** au monomère dialdéhyde déprotégé **9h**. On observe alors la polycondensation qui se traduit par l'apparition de signaux attribués à la formation d'hydrazones, ce qui confirme la formation des polymères **14P** et **14MP**. (Figure V13 et V14)

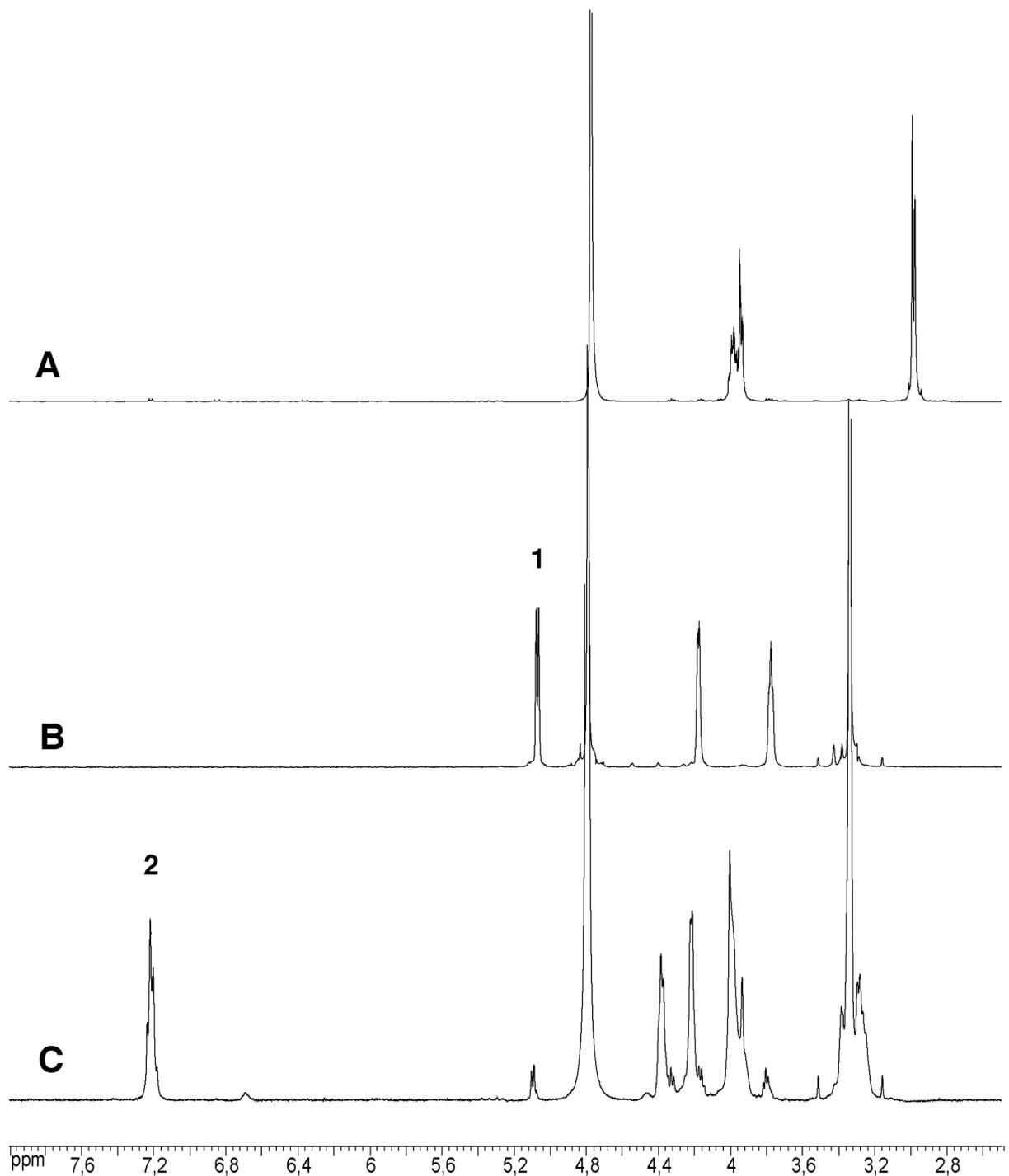


Figure V13: Spectre RMN du ^1H (D_2O): **A** du monomère bis-hydrazone **11**; **B** du monomère **9h**, le signal 1 correspondant aux protons de la forme hydrate des fonctions aldéhydes de **9h**; **C** du polymère dynamique **14P** obtenu par addition de **11** (concentration initiale 20 mM) à une solution de **9h** (concentration initiale 20mM) à $\text{pD}=7$. Le signal 2 est attribué aux imines des fonctions hydrazones du polymère.

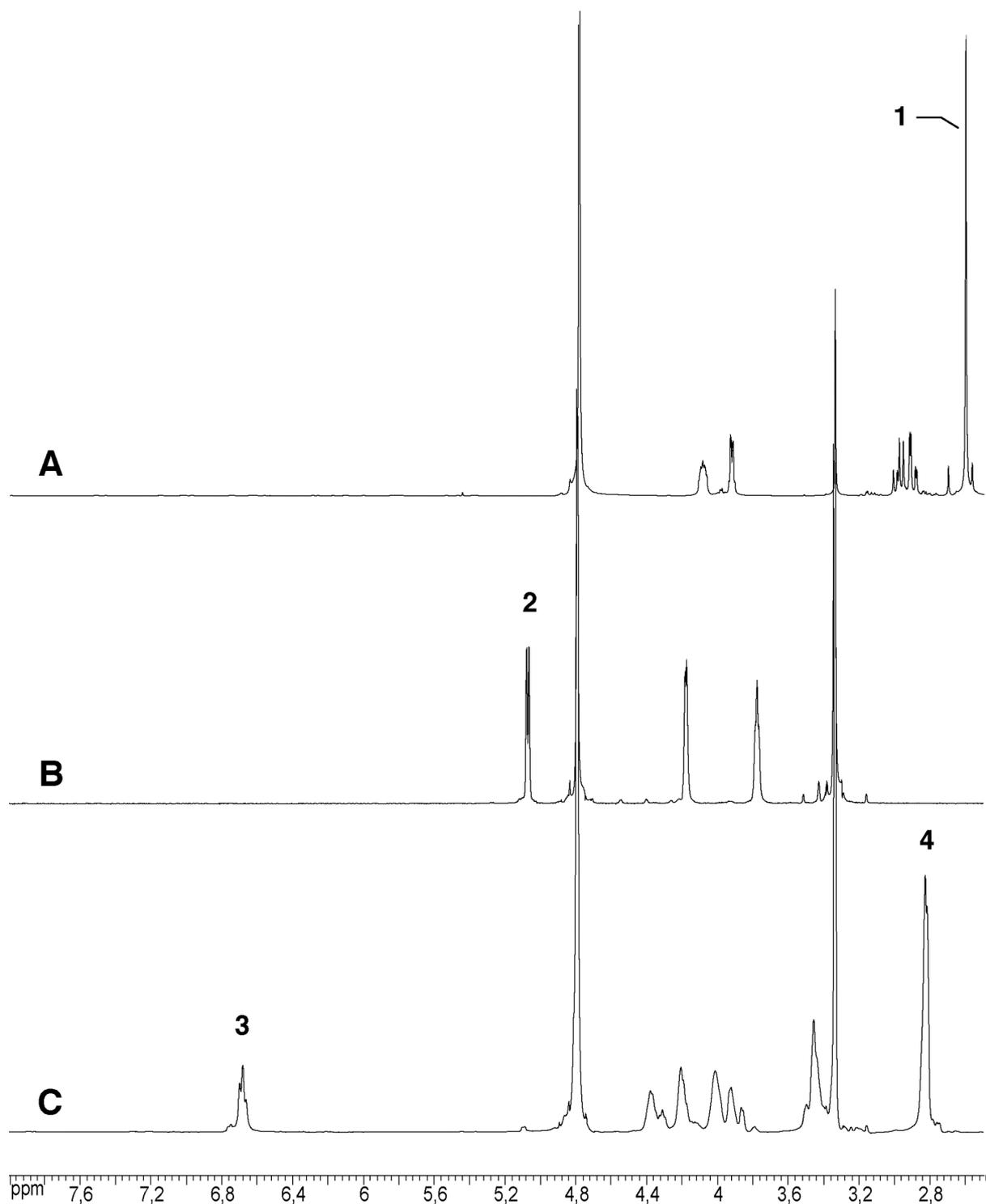


Figure V14: **A** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère bis-méthylhydrazine **12**, le signal 1 est attribué aux fonctions méthyles de **12**; **B** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du monomère **9h**, le signal 2 correspondant aux protons de la forme hydrate des fonctions aldéhydes de **9h**; **C** Spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère dynamique **14MP** obtenu par addition de **11** (concentration finale 20 mM) à une solution de **9h** (concentration finale 20mM) à pD=7. Le signal 3 est attribué aux imines des fonctions hydrazones du polymère. Le signal 4 est attribué aux méthyles des fonctions hydrazones du polymère.

Comparaison polyhydrazones-polyacylhydrazones: la question de la solubilité des polyacylhydrazones

Nous avons vu au chapitre II que les polymères basés sur la formation de jonctions du type acylhydrazone sont en général complètement insolubles dans l'eau. En particulier, nous avons tenté de préparer le polymère **14AP** dont la structure est essentiellement identique à celle du polymère **14P**, à l'exception des fonctions amides en positions C1 et C6 du bis-hydrazide **15**. (Figure V15) Le polymère polyhydrazone **14P** est totalement soluble en solution aqueuse alors que le polymère acylhydrazone **14AP** ne l'est pas du tout. Ce sont donc probablement les fonctions amides de **14AP** qui sont responsables de la précipitation, par la formation des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires.

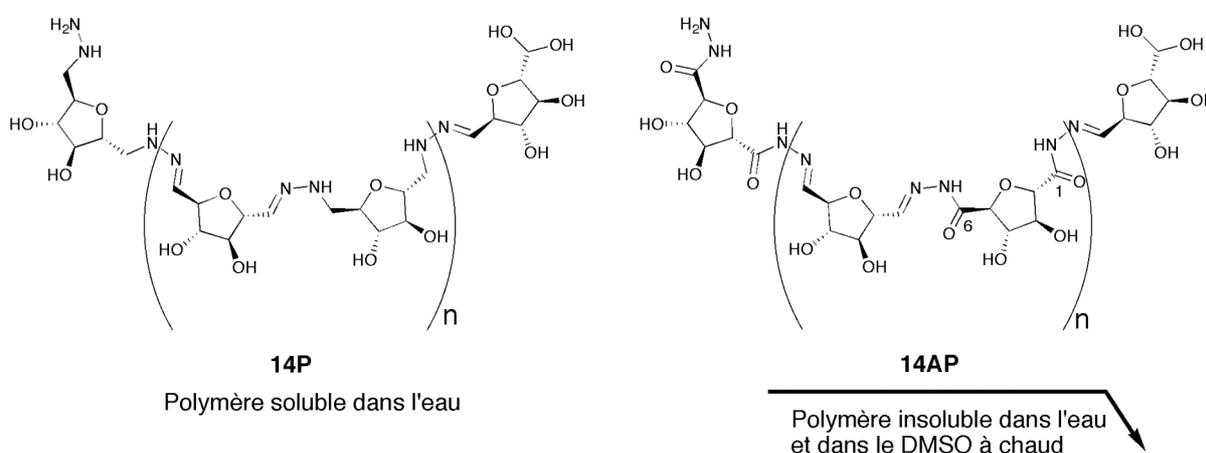


Figure V15: Comparaisons des structures moléculaires des polymères **14P** et **14AP** (préparé au chapitre II page 81). On peut noter que la seule différence réside dans la présence d'une fonction amide en position C1 et C6 du monomère bis-hydrazide de **14AP**.

Cette comparaison met en avant un avantage de la jonction hydrazone par rapport à la jonction acylhydrazone, du moins si on souhaite préparer des polymères solubles dans l'eau tout en conservant un caractère réversible significatif à des pH proches de la neutralité. Elle montre également qu'un changement minime dans la structure des polymères peut entraîner des propriétés de solubilité radicalement différentes, comme cela est le cas pour les polysaccharides naturels, si on compare la cellulose et l'amidon par exemple. (cf. introduction pages 44 et 48)

Caractérisation du polymère **14P** par RMN DOSY

La structure du polymère **14P** étant très proche des α -(1 \rightarrow 5)-D-oligoarabinofuranosides naturels (Schéma V1) il est donc raisonnable d'utiliser comme au chapitre IV (page 183) la technique de RMN DOSY pour la caractérisation de ces espèces.

Nous avons donc préparé des échantillons du polymère à différents pD et ensuite soumis ces échantillons à une mesure de RMN DOSY pour déterminer le coefficient de diffusion des produits de polycondensation.

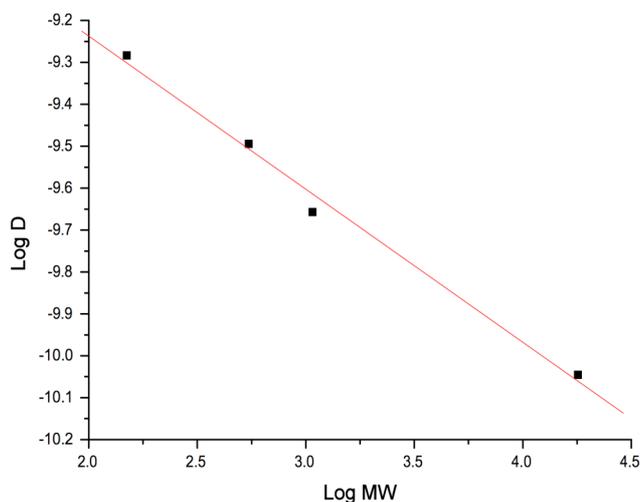


Figure V17: Représentation graphique du $\log D$ en fonction du $\log Mw$ pour une série d'oligoarabinanes: D-arabinofuranose, α -(1 \rightarrow 5)-L-arabinotetraose, α -(1 \rightarrow 5)-L-arabinoaoctose, α -(1 \rightarrow 5)-L-arabinane linéaire ($Mw=18000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Une régression linéaire donne la relation suivante $\log D = -(0,365)\log Mw - 8,506$ où D est exprimé en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ et Mw en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, avec un coefficient de corrélation $R = -0,99584$, la courbe de tendance est représentée en rouge.

En prenant l'échelle de calibration établie au chapitre IV (page 184) à partir d'oligoarabinanes naturels de différents poids moléculaire, on peut estimer les poids moléculaires et le degré de polymérisation du polymère **14P** en utilisant la relation suivante $\log D = -(0,365)\log Mw - 8,506$, où D est exprimé en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ et Mw en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. (Figure V17) Le coefficient de diffusion de translation D nous permet aussi de calculer le rayon hydrodynamique sphérique des polymères r_{sph} , en utilisant l'équation de Stokes-Einstein $D = k_B T / (6\pi\eta r_{\text{sph}})$ où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, et η la viscosité du milieu.

D'après ce qui avait été observé pour l'hydrazone modèle **2** (Figure V4), nous nous attendions à une forte influence du pD sur le coefficient de diffusion du polymère, et à une diminution de degré de polymérisation due à la baisse de la constante de formation d'hydrazone K en abaissant le pD. L'augmentation de la proportion d'hydrate par rapport à celle des hydrazones a bien été visible par RMN du ^1H (Figure V16), mais cette augmentation sensible (Tableau V2) n'a pas pu être corrélée dans tous les cas avec une augmentation du coefficient de diffusion des polymères D résultant d'une diminution de la taille et du degré de polymérisation.

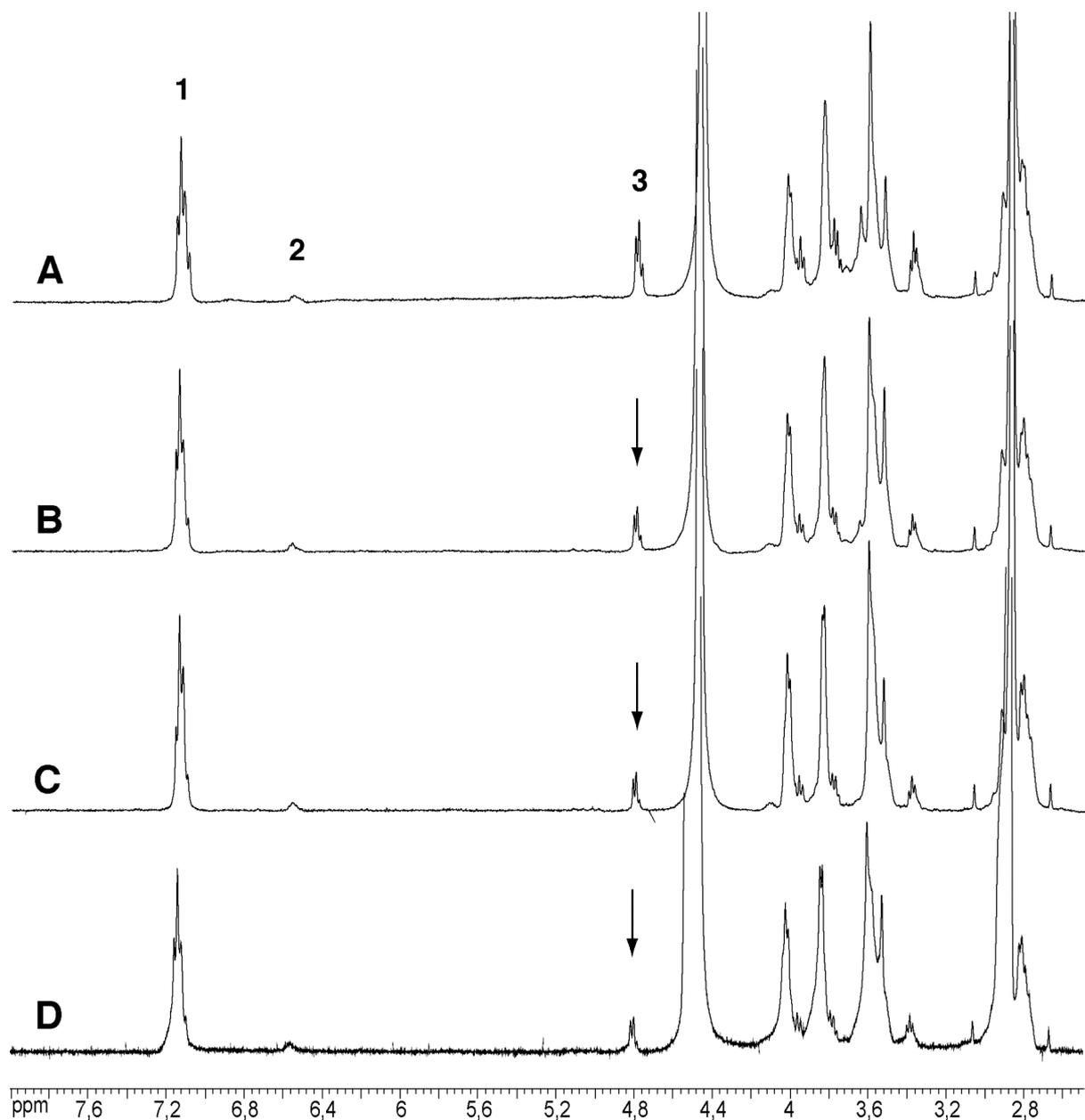


Figure V16: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) polymère dynamique **14P** à pD= 5 avec une concentration initiale en monomères de 20 mM. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) polymère dynamique **14P** à pD= 6 avec une concentration initiale en monomères de 20 mM. **C** Spectre RMN du ^1H (D_2O) polymère dynamique **14P** à pD= 7 avec une concentration initiale en monomères de 20 mM. **D** Spectre RMN du ^1H (D_2O) polymère dynamique **14P** à pD= 8,1 avec une concentration initiale en monomères de 20 mM.

Tableau V2: Influence du pD sur la proportion d'hydrates par rapport à celle des hydrazones dans le polymère dynamique **14P** avec une concentration initiale en monomères de 20 mM. Cette proportion a été calculée par rapport des intégrations relatives des signaux d'hydrazone (Figure V16 signaux 1 et 2) et des signaux d'hydrates (Figure V16 signal 3).

	Somme des intégrations des signaux attribués aux hydrazones (u. a.)*	Somme des intégrations des signaux attribués aux hydrates (u. a.)*	Proportion d'hydrates par rapport aux hydrazones (%)
pD= 5	1+0,03	0,34	25
pD= 6	1+0,05	0,16	13
pD= 7	1+0,05	0,13	11
pD= 8.1	1+0,05	0,13	11

*u.a.: unité arbitraire

Les échantillons de polymère **14P** à pD=5, 6, 7 et 8.1 ont été soumis à une analyse par RMN DOSY.⁶ Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau V3 suivant.

Tableau V3: Influence du pD sur le coefficient de diffusion D , le poids moléculaire M_w , le degré de polymérisation DP et le rayon sphérique hydrodynamique r_{SPH} de **14P**, avec une concentration initiale en monomères de 20mM.

	pD= 5	pD=7	pD= 8.1
$D(\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$	$270 > D > 200$	$280 > D > 200$	$480 > D > 120$
$M_w(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	$800 < M_w < 1800$	$700 < M_w < 1800$	$170 < M_w < 7300$
DP	$2 < DP < 6$	$2 < DP < 6$	$1 < DP < 23$
$r_{SPH}(\text{Å})$	$7 < r_{SPH} < 10$	$7 < r_{SPH} < 10$	$4 < r_{SPH} < 17$

On constate bien une influence du pD sur la taille et la polydispersité du polymère **14P**. Bien que les échantillons à pD= 4 et pD= 7 soient quasiment identiques en DOSY, à pD= 8.1 on constate une très nette diminution du coefficient de diffusion des espèces les plus grandes. On passe d'un coefficient de diffusion minimum de 270 et 280 pour pD= 4 et pD= 7 respectivement, à 120 pour pD= 8.1. L'échantillon à pD= 8.1 est également beaucoup plus polydispersé, les produits de polycondensation ayant un coefficient de diffusion compris entre 480 et 120. Sachant que le poids moléculaire de l'unité monomérique de **14P** est de $316.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, on peut estimer le degré de polymérisation du polymère selon le pD. **Le polymère 14P peut contenir jusqu'à 23 unités monomériques, ce qui correspond à environ 46 unités sucres de type furanoses. Il s'agit donc bien d'un analogue de polysaccharide.**

Si on se contente de comparer les échantillons à pD= 7 et pD= 8.1 nous pouvons en conclure que l'augmentation du pD entraîne une augmentation du degré de polymérisation moyen, comme nous pouvions nous y attendre d'après l'effet du pD sur la constante de formation K de la jonction hydrazone de **2**. (voir plus haut) Par contre les échantillons à pD= 5 et pD= 7 sont quasiment identiques en DOSY, ce qui est surprenant au vu de la différence de proportion d'hydrate dans ces 2 échantillons (25% à pD= 5 contre 13% à pD= 7).

Bibliothèque constitutionnelle dynamique en présence de pyrene-1,3,6,8-tetrasulfonate de sodium

Des expériences préliminaires d'évolution moléculaire dirigée des polymères **14P** et **14MP** en présence d'une cible organique amphiphile ont été entreprises. Ces expériences découlent des résultats obtenus au chapitre II dans lequel le pyrene-1,3,6,8-tetrasulfonate a permis d'identifier, et d'amplifier un analogue dynamique de cyclodextrine à partir d'une bibliothèque constitutionnelle dynamique préparée à partir d'un polyacylhydrazone analogue d'oligoarabinofuranosides.

⁶ Les spectres RMN DOSY du polymère **14P** à différents pD sont présentés en annexe 7.

De manière analogue à ce qui a été fait lors du criblage de cible moléculaire au chapitre II, nous avons mis en présence les polymères **14P**, et **14MP** avec le pyrène-1,3,6,8-tetrasulfonate **15**. Si la cible **15** interagit avec un ou plusieurs composés du mélange d'oligomères en équilibre que constituent les polymères **14P** et **14MP**, cela doit en principe se traduire par des modifications du spectre RMN du ^1H du mélange par comparaison avec le spectre de la bibliothèque sans la cible.

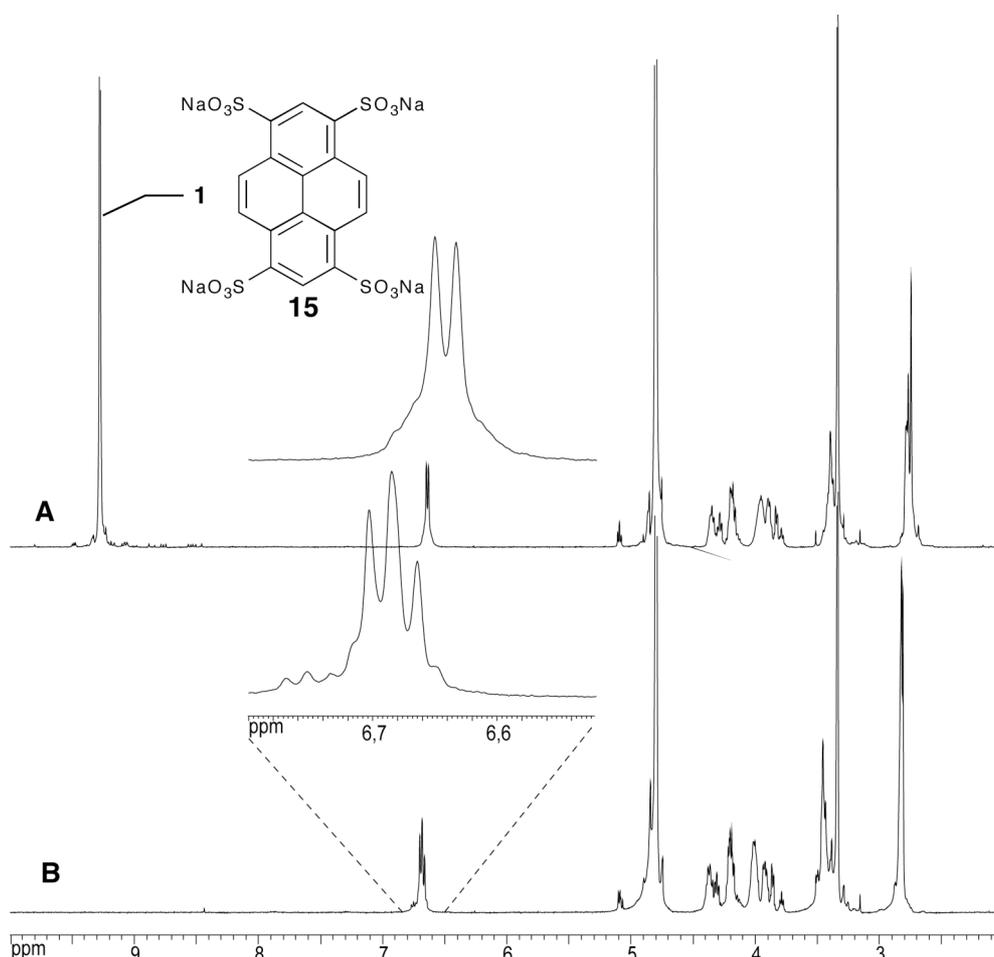


Figure V17: **A** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère dynamique **14MP** avec une concentration initiale en monomères de 20 mM après 30 min d'équilibration en présence de pyrene-1,3,6,8-tetrasulphonate de sodium (50 mM) à pD=7. **B** Spectre RMN du ^1H (D_2O) du polymère dynamique **14MP** avec une concentration initiale en monomère de 20 mM à pD= 7.

Si on compare les spectres RMN du ^1H du polymère **14MP** après équilibration avec ou sans cible **15** (2.5 équivalents par rapport aux monomères de **14MP**) on constate une simplification des signaux dans la région du spectre correspondant aux pics des protons imines des hydrazones du polymère équilibré avec **15**. (Figure V17)

Un doublet émerge très nettement, ce qui pourrait correspondre à l'amplification d'une espèce cyclique symétrique.

Aucun effet similaire n'a pu être observé sur le polymère **14P** par RMN du ^1H .

Il s'agit là d'un résultat préliminaire qui demande encore à être vérifié par des expériences de réduction de la bibliothèque avec ou sans cible **15** suivies par des séparations par HPLC des mélanges réduits pour tenter de déterminer si il y a ou non amplification d'une ou plusieurs espèces en présence de **15**.

Limitations: Stabilité du polymère 14MP.

Une des limitations de cette combinaison aldéhyde-hydrazine, est la stabilité des polymères qui en résultent. Dans le cas du polymère **14P** aucun problème de décomposition n'ait été observé après 2 jours en solution et à température ambiante à pD=7. Le polymère **14MP**, quant à lui se décompose progressivement.(Figure V18) Cette décomposition se traduit par l'apparition de signaux dans la zone correspondant aux substituants méthyles de la fonction hydrazone du polymère. On constate également l'émergence de signaux aromatiques et l'apparition d'une couleur brun-rouge, qui laisserait à penser que les produits de décomposition pourraient contenir les fonctions chimiques du type diazo (-N=N-) dont la couleur caractéristique est le rouge justement.

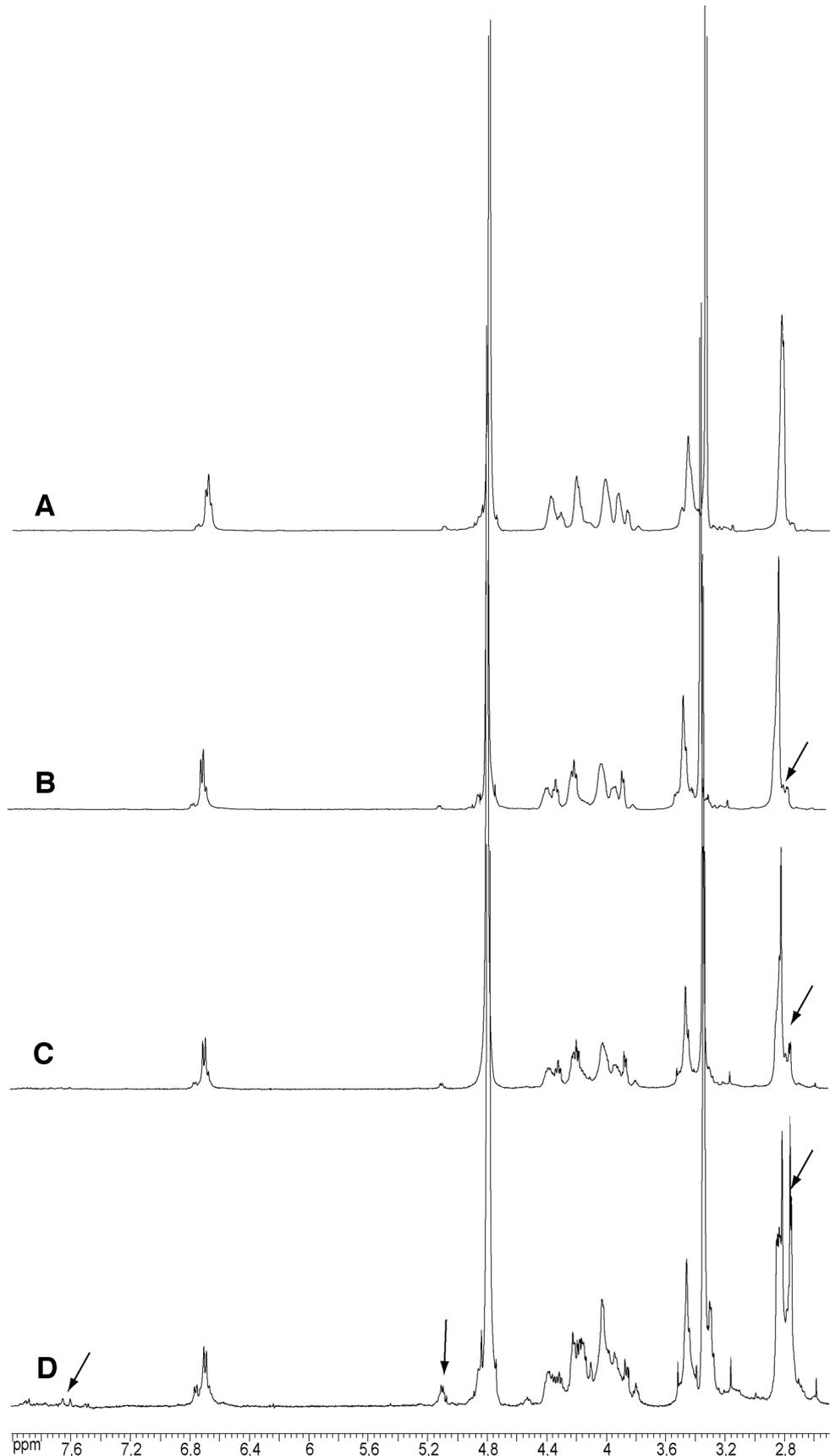


Figure V18: Evolution du spectre RMN du ¹H (D₂O) du polymère **14MP**, avec une concentration initiale de 20 mM en monomères, au cours du temps **A** après 1 h ; **B** après 24 h ; **C** après 48 h ; **D** après 120 h à pD= 7. Les flèches indiquent l'apparition de signaux correspondant aux produits secondaires issus de la dégradation de **14MP**.

Conclusion et perspectives

La première partie de ce chapitre porte sur l'étude des propriétés de réversibilité de la jonction hydrazone formée entre un aldéhyde de type sucre, le 2,5-D-anhydromannose, et une hydrazine. Pour cette étude le composé aldéhyde qui a été choisi est le même que celui qui a servi de modèle pour l'étude de la jonction oxime au chapitre IV. De ce fait on peut faire une comparaison directe de la réactivité de ces deux fonctions. Alors que la jonction aldoxime du 2,5-D-anhydromannose methyl oxime est stable vis-à-vis de l'hydrolyse dans une gamme de pH allant de 4 à 7, **l'hydrolyse de la jonction hydrazone du 2,5-anhydro-D-mannose methylhydrazone 2 est observable de pH= 4 à pH= 8**. A des pH inférieurs à 6, la forme hydrolysée de l'hydrazone devient majoritaire, et il faut remonter le pH de la solution à des valeurs entre 7 et 8 pour atteindre un taux de conversion en hydrazone supérieur à 90%. **Cette tendance à l'hydrolyse facilite grandement les échanges et les recombinaisons entre hydrazone et hydrazine en solution, même à des pH proches de la neutralité. Ce type de jonction peut être utilisé pour des applications où les cinétiques d'échanges doivent être rapides dans des conditions neutres.** Par rapide, nous entendons un temps de demi-échange de l'ordre de quelques dizaines de minutes, ou moins. Cela permet d'envisager d'atteindre l'équilibre thermodynamique du mélange en quelques heures, et non en quelques jours, comme cela était le cas au chapitre précédent pour la jonction oxime du 2,5-anhydro-D-mannose methyl oxime avec un temps de demi échange de 777 min à pD=6. **La jonction hydrazone utilisée ici permet d'atteindre des temps de demi-échange de 10 min à pD=6, ce qui est environ 80 fois plus rapide que pour son équivalent en fonction aldoxime. Ce point est crucial si l'on veut travailler avec des cibles biologiques notamment.**

Après avoir démontré le caractère dynamique de la jonction hydrazone, celle ci a été appliquée à la préparation d'analogues d' α -(1 \rightarrow 5)-D-oligoarabinofuranosides naturels. **Les polyhydrazones obtenus ont ensuite été caractérisés par RMN DOSY, ce qui a permis de mettre en évidence leur caractère polymérique et l'influence du pH sur le degré de polymérisation. Des valeurs de pH légèrement basique (pH= 8) permettent d'atteindre un degré de polymérisation de 23 ce qui correspond à un polymère contenant environ 46 unités sucres dérivées de l'arabinose.**

Des expériences préliminaires de RMN ont ensuite révélé des interactions entre un des polymères polyhydrazones préparés, le polymère **14MP**, et une molécule organique amphiphile, le pyrène-1,3,6,8-tetrasulfonate de sodium **15**. D'après les changements du spectre RMN du ^1H , après l'ajout de la cible **15**, on peut suggérer que celle-ci favorise l'expression d'une molécule cyclique symétrique, ce qui ferait alors des solutions de **14MP**

une nouvelle bibliothèque constitutionnelle dynamique d'analogues de cyclodextrines. Il reste encore à démontrer que ces modifications du spectre RMN du ^1H du polymère **14MP** se traduisent bien par un changement de constitution, et qu'il ne s'agit pas seulement d'un déplacement chimique associé à la présence de la cible. Cela devrait être possible en utilisant des techniques de séparation comme l'HPLC couplée avec la spectrométrie de masse pour identifier les différents composants du mélange.

RÉSUMÉ

Les polymères dynamiques résultent de l'association de monomères par le biais d'interactions réversibles covalentes (polymères dynamiques covalents) ou non-covalentes (polymères dynamiques supramoléculaires). Du fait de leur caractère réversible, la structure, le poids moléculaire, ainsi que la composition de tels polymères peuvent évoluer en réponse à des stimuli externes, ce qui en fait des matériaux dits adaptatifs. Nous avons appliqué ces principes à la préparation d'analogues de polysaccharides naturels.

Les Polysaccharides sont formés par des séquences de saccharides connectés entre eux par des liaisons glycosidiques. Si on remplace cette liaison glycosidique par un lien covalent réversible, comme la fonction imine, on obtient alors un analogue dynamique d'un polysaccharide. Ce nouveau type de polymère combinerait les propriétés de matériaux et de biorecognition des polysaccharides avec un caractère adaptatif. En effet, comme les monomères sont connectés de manière réversible, la structure, la composition, ainsi que la longueur du polymère sont susceptibles d'évoluer même après que la polymérisation ait eu lieu. Des stimuli externes comme le pH, la température ou l'introduction de nouveaux monomères peuvent être utilisés pour induire ces changements constitutionnels.

La préparation de ces nouvelles structures polymériques a impliqué la conception et l'optimisation de synthèses organiques multi-étapes. Généralement la préparation des monomères a utilisé comme produit de départ des sucres naturels comme le D-glucose, D-lactose, ou l' α -cyclodextrine. Ensuite les fonctions chimiques polymérisables ont été sélectivement introduites sur l'unité sucre par des séquences de protection-déprotection sélectives, des glycosylations ou d'autres réactions spécifiques aux centres anomériques.

Cette stratégie a été mise à profit pour la préparation d'analogues dynamiques d'oligoarabinofuranosides, basés sur la jonction acylhydrazone, à partir desquels des bibliothèques constitutionnelles dynamiques d'analogues de cyclodextrines ont été obtenues. Lorsque les produits majoritaires résultants de la polycondensation ont été des oligomères cycliques, en équilibre les uns avec les autres, il a été montré que l'introduction d'une molécule organique peut influencer sur la composition du mélange. La formation d'un complexe entre certains membres de ces bibliothèques constitutionnelles dynamiques a été étudiée par RMN 2D. L'amplification de certaines espèces peut alors s'expliquer par le fait que la présence d'une cible moléculaire, entraîne une modification des proportions relatives des différents macrocycles en sélectionnant le meilleur récepteur, c'est-à-dire la bonne taille de cycle. Cette approche pourrait amener à la découverte de nouveaux récepteurs pour de petites molécules organiques dans le domaine de la catalyse ou la formulation de médicaments.

Résumé

Toujours en utilisant la formation d'acylhydrazones, des analogues dynamiques de glycopolymères ont été conçus. Il s'agit de polymères fluorescents, qui du fait de la présence de longues chaînes latérales d'oligosaccharides greffées sur leur chaîne principale adoptent une conformation en goupillon. Dans certains cas des poids moléculaires très élevés (supérieurs à 10^6 Daltons) ont été atteints et il a été montré par diffusion des neutrons aux petits angles et microscopie électronique cryogénique que, dans l'eau, les chaînes d'un de ces polymères peuvent être assimilés à des cylindres rigides décorés par des saccharides d'environ 65 nm de long et d'un diamètre d'environ 5 nm. La dynamique de ces édifices moléculaires a été mise en évidence par échanges de constituants et suivi de la composition des polymères par RMN du ^1H et spectroscopie de fluorescence. Du fait de la présence de chaînes latérales du type lactose, ces polymères peuvent être potentiellement utilisés dans la détection ou la reconnaissance des galectines.

Des études ont exploré d'autres types d'imines. Il a été démontré que la jonction oxime formée à partir d'aldéhydes aliphatiques directement greffés sur des noyaux saccharides est suffisamment labile pour pouvoir être appliquée en chimie constitutionnelle dynamique des sucres. Des analogues d'oligoarabinofuranosides basés sur cette jonction ont été préparés et caractérisés par RMN DOSY et spectrométrie de masse MALDI. Leur caractère dynamique en milieu aqueux a également été mis en évidence par l'incorporation d'un agent de terminaison après la réaction de polymérisation, démontrant ainsi le caractère "vivant" de ces polymères.

Nous nous sommes également intéressés à l'utilisation de cétones dérivées de sucres, les 1- β -C-glycosylpropan-2-ones, pour lesquelles les cinétiques d'échanges d'oximes se sont révélées plus rapides que dans le cas des oximes dérivés d'aldéhydes, et ceci dans des conditions proches de la neutralité. Ce nouveau type de jonction réversible a également été appliqué à la synthèse d'autres analogues de polysaccharides linéaires comme les dextrans, et la cellulose.

Finalement la jonction de type hydrazone formée par condensation d'un aldéhyde aliphatique dérivé de sucre et les hydrazines a permis d'atteindre des cinétiques d'échanges rapides dans des conditions neutres. Cette liaison réversible a été utilisée pour la préparation d'analogues d'oligoarabinofuranosides caractérisés par RMN DOSY et comportant jusqu'à 46 unités furanoses.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur Jean-Marie Lehn, qui m'a donné l'opportunité, ou plutôt fait l'honneur de travailler dans son laboratoire.

Je pense que cette expérience aura été pour moi bien plus qu'une formation scientifique, et qu'elle a radicalement changé non seulement ma façon de travailler, mais également celle d'aborder la recherche. Je le remercie notamment pour l'aide qu'il m'a apporté pour me permettre de finir ma thèse et pour la suite.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, les professeurs Jean-Marie Beau, Patrick Pale, Stéphane Vincent et le docteur Andreas Herrmann. Leurs remarques pertinentes et l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit ont grandement contribué à son amélioration.

Je tiens ensuite à remercier les personnes avec qui j'ai collaboré, les physiciens Eric Buhler et le professeur Jean Sauveur Candau pour leur aide pour les expériences de diffusion de neutrons, entre autres. Leur point de vue différent de celui de mes collègues chimistes, leurs conseils et leur compétence ont été indispensables à la valorisation de mes résultats. Cela m'a également permis d'apprécier tous les bienfaits de la collaboration scientifique entre partenaires de disciplines différentes. Ce sont eux en particulier qui m'ont permis de travailler avec un des pionniers de la microscopie électronique cryogénique, le professeur Ishi Talmon, que je remercie pour les analyses qu'il a effectuées pour moi.

Le Service commun de RMN de la Faculté de Chimie m'a également été d'un grand secours pour caractériser certains de mes mélanges ou produits et à ce titre je remercie Lionel Allouche et Roland Graff.

Je remercie ensuite le docteur Augustin Madalan pour la résolution des structures par diffraction des rayons X, sans oublier Daniel Moser pour l'assistance technique, Patrick Maltese et Jean Louis Schmitt pour la RMN et Aurélie Meme pour la Spectrométrie de masse.

Je remercie également les relecteurs de ma thèse sans qui elle ne serait pas ce qu'elle est: Nicolas Giuseppone, Sébastien Ulrich, Eric Buhler, Loïc Jerry, Philippe Reutenauer, Gaël Schaeffer et mon père.

Sur le plan plus personnel, je remercie toutes les personnes qui m'ont supporté dans

Remerciements

tous les sens du terme. En premier lieu celle sans qui je n'aurais certainement pas survécu à l'épreuve de la rédaction: mon épouse Antonia, qui est également sans aucun doute le plus beau résultat de ma thèse. Ensuite mes parents Marie-Claire et Pascal Ruff, mon frère Nicolas et Elodie pour un soutien familial sans faille malgré mon caractère.

Je remercie également tous les membres passés et présents du labo Lehn, ils sont trop nombreux pour tous les citer ici, mais je leur dis merci pour m'avoir permis d'évoluer dans l'atmosphère unique tant du point de vue scientifique que multiculturel de ce labo supranational.

Finalement je remercie les lecteurs de ce travail en espérant qu'il leur sera utile.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie Expérimentale
Méthodes Générales

PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes générales

Solvants et réactifs commerciaux

Tous les réactifs commerciaux ont été obtenus par le biais des sociétés *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, ou *Lancaster*. Les α -(1→5)-D-oligoarabinofuranosides de différents poids moléculaires ont été obtenus auprès de l'entreprise *Megazyme International Ireland Ltd*. Les résines échangeuse d'ions *Amberlite IR-120 H+ form*, et *Dowex 21K Cl-form* ont été obtenus par le biais de *Fluka* et lavées au minimum trois fois à l'eau distillée avant utilisation.

Les solvants anhydres ont été distillés par des méthodes classiques ou obtenus par le biais des sociétés *Fluka* (DMF, pyridine, MeOH). Le THF a été séché par distillation à partir d'une solution de complexe sodium/acetophenone. Le CH_2Cl_2 a été séché par distillation après traitement par du PCl_5 .

Méthodes chromatographiques

Les chromatographies sur gel de silice ont été réalisées par la technique de "flash" chromatographie.¹ Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur support de verre (*Merck TLC plates Silica gel 60 F254*) et révélées par chauffage après trempage dans un mélange *p*-anisaldéhyde/éthanol/ H_2O /acide acétique/acide sulfurique 15/530/28/6.2/20.5 (addition du *p*-anisaldéhyde au mélange des autres composants après refroidissement), ou trempage dans une solution de ninhydrine (300 mg dans 100 ml) dans un mélange éthanol/acide acétique 97/3.

Méthodes analytiques et instrumentation

Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire: Les spectres RMN du ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre *Bruker Advance 400 MHz*. Les déplacements chimiques sont rapportés par référence au pic résiduel du solvant (7.26 ppm, 77.16 ppm) dans le CDCl_3 , et *t*BuOH (1.24 ppm, 70.36 ppm, 30.29 ppm) ou le MeOH (3.34 ppm, 49.5 ppm) dans le D_2O ; les constantes de couplage sont données en Hz.

Spectrométrie de Masse: Les mesures par la technique d'ionisation par Electrospray (ESI-MS) ont été effectuées sur un spectromètre *Bruker Micro-TOF* couplé à un appareil de chromatographie liquide HPLC. Les mesures par la technique d'ionisation par desorption et ionisation assistée par laser (MALDI) ont été effectuées sur un spectromètre *Brucker MALDI-TOF*.

Spectroscopie de fluorescence: Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un spectromètre *Jobin-Yvon Horiba Fluorolog 3.22*.

Mesures de pD et solutions tampons deutérées

Le pD des solutions dans le D_2O et des solutions tampons a été mesuré à l'aide d'une électrode classique au calomel en verre calibrée à l'aide de tampons à pH= 4 et 7 pour les

¹ Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. W. Clark Still, M. Kahn, A. Mitra. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2924.

mesures en pD acide, et de tampons 7 et 10 pour les mesures en pD basique. La valeur du pD est obtenue après ajout de 0.4 unités à la valeur donnée par lecture après mesure à l'aide de l'électrode en verre.²

Les solutions tampons pour les pD acides entre 4 et 5 ont été obtenues par préparation d'une solution d'acide acétique- d_4 à la concentration voulue, puis ajustement du pD de la solution à la valeur souhaitée par ajout d'une solution concentrée (40%) de NaOD dans le D_2O .

Les solutions tampons pour les pD entre 6 et 8 ont été obtenues par préparation d'une solution d'acide phosphorique- d_3 à la concentration voulue, puis ajustement du pD de la solution à la valeur souhaitée par ajout d'une solution concentrée (40%) de NaOD dans le D_2O .

Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le service de microanalyse de l'institut de chimie de l'université Louis Pasteur à Strasbourg.

Mesures de diffraction des rayons X sur monocristaux

Les analyses cristallographiques ont été effectuées par le docteur Augustin Madalan au service de cristallographie de l'université Louis Pasteur à Strasbourg. Les cristaux ont été suspendus dans de l'huile, sélectionnés et placés sur une fibre de verre sous flux d'azote refroidi. Les données de diffraction ont été collectées sur un diffractomètre *Nonius-Kappa-CCD* utilisant une source du type "graphite monochromatized Mo- K_α " ($\lambda = 0.71071 \text{ \AA}$).

Analyses GPC (gel permeation chromatography)

Les analyses GPC ont été réalisées au service d'analyse de l'institut Charles Sadron de l'université Louis Pasteur à Strasbourg. L'eau a été utilisée comme solvant pour tous les échantillons.

Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)

Ces expériences ont été conduites sur le spectromètre PACE au laboratoire Léon Brillouin à Saclay (LLB). La longueur d'onde, λ , des neutrons du faisceau incident dépend de la gamme du vecteur de diffusion q étudiée, qui elle est déterminée par la distance D entre l'échantillon et le détecteur. (Schéma III3 page 136) Trois configurations ont été utilisées afin de couvrir la gamme des grands vecteurs de diffusion ($4.23 \cdot 10^{-2} \leq q \leq 4.35 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, $\lambda = 4.5 \text{ \AA}$, $D = 1 \text{ m}$), des vecteurs q intermédiaires ($1.7 \cdot 10^{-2} \leq q \leq 1.79 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, $\lambda = 6 \text{ \AA}$, $D = 1.85 \text{ m}$), et celle des petits vecteurs de diffusion ($3.2 \cdot 10^{-3} \leq q \leq 3.4 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$, $\lambda = 13 \text{ \AA}$, $D = 4.67 \text{ m}$). L'intensité mesurée a été mesurée en valeur absolue (cm^{-1}) après normalisation selon la méthode classique d'atténuation du faisceau direct. Les procédures standard pour la correction des données de transmission, l'efficacité du détecteur, et du bruit de fond (solvant, cellule vide, bruit de fond électronique et neutronique) ont été prises en compte.

² Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. P. K. Glasoe, F. A. Long. *J. Org. Chem.* **1959**, *64*, 188-190.

SYNTHESES ET POLYMERISATIONS

Chaque composé est décrit de la façon suivante:

Nom officiel selon la nomenclature anglaise IUPAC¹ ou référence:

Mode opératoire pour la synthèse. ¹H RMN (solvant, 400 MHz), ¹³C RMN (solvant, 100 MHz). La numérotation indiquée sur le composé et utilisée pour l'attribution des signaux RMN correspond à celle utilisée dans la nomenclature anglaise IUPAC. Analyse du composé par spectrométrie de masse. Analyse élémentaire.

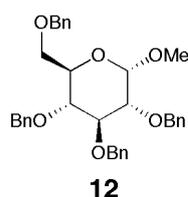
Un spectre RMN du ¹H et du ¹³C sont donnés pour servir de référence.

Lorsque la structure tridimensionnelle d'un composé a été déterminée par diffraction des rayons X celle-ci est donnée ainsi que les principales données cristallographiques.

CHAPITRE II: Section expérimentale

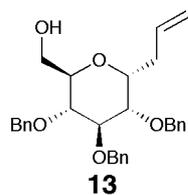
Synthèse des monomères et précurseurs de monomères

Synthèse du composé 12:



Le α -D-glucopyranoside de méthyle **11**² (3.1 g; 16 mmol) est ajouté par petites portions à une suspension de bromure de benzyle (13.683 g, 9.5 ml, 80 mmol) et d'hydruure de sodium (dispersion à 60 % dans la paraffine, 3.2 g, 80 mmol) dans de la DMF (30 ml) maintenue à 0°C par un bain de glace. Le milieu réactionnel est réchauffé lentement jusqu'à température ambiante et est agité à cette température pendant 4 heures. La réaction est neutralisée par l'ajout d'eau. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'éther (200 ml). Cette solution est lavée à l'eau (200 ml) et la phase aqueuse extraite avec de l'éther (200 ml). Les phases organiques sont rassemblées, puis lavées à la saumure et séchées sur sulfate de magnésium. Le solvant est évaporé pour obtenir le produit brut qui est chromatographié sur silice (Hexane/AcOEt 1/0→3/1). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile de couleur jaune pâle (8.762 g, 98 %). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 7.4-7.1 (*m*, 20H), 5.05-4.44 (*m*, 9 H), 4.03-3.94 (*m*, 1H), 3.8-3.5 (*m*, 5H), 3.38 (*s*, 3H, -OCH₃).

Synthèse du 3-(2',3',4'-Tri-O-benzyl- α -D-glycopyranosyl)-1-propene **13**:



Le composé **12**³ (3.326 g, 6 mmol, 1 equiv.) est dissous dans de l'acétonitrile. L'allyltriméthylsilane (1.37 g, 1.9 ml, 12 mmol, 2 equiv.) est ajouté à la seringue au milieu réactionnel refroidit à 0°C par un bain de glace. L'acide de Lewis TMSOTf (0.67 g, 0.54 ml, 3 mmol, 0.5 equiv.) est ajouté goutte-à-goutte à la solution. Après l'ajout de l'acide de Lewis, le milieu réactionnel est agité à température ambiante 12 heures. De l'anhydride acétique (9 ml) est ajouté lentement au milieu réactionnel refroidit par un bain de glace ce qui le fait passer d'un jaune brillant au brun. Après 10 minutes, le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane. La réaction est arrêtée par l'ajout précautionneux de méthanol suivi d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase aqueuse est extraite deux fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées puis lavées par une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase organique est lavée avec de la saumure puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée. Le résidu est

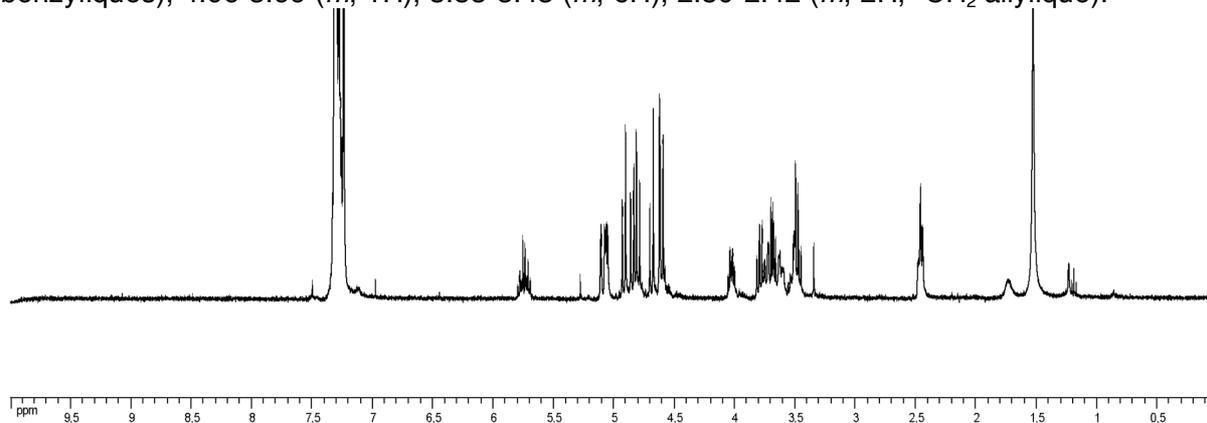
¹ Nomenclature of Carbohydrates (Recommendations 1996). A. D. McNaught. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919.

² Inactivation of two D-gucosyltransferases from Serotype *c* *Streptococcus mutans* 103220T by 1,2-epoxy-3-(α -D-glucopyranosyl)propane. S. Bombard, M. Maillet, M.-L. Capmau. *Carbohydr. Res.* **1995**, 275, 433-440.

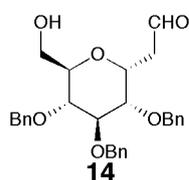
³ Chapitre II: Polysaccharides Dynamiques Linéaires à Jonction Acylhydrazone référence 6 page 70.

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

dissous dans du méthanol. Une solution de méthanolate de sodium (30 % en masse) est ajoutée goutte-à-goutte (0.12 ml) jusqu'à ce que le milieu réactionnel passe du brun foncé au beige clair. Cette solution est agitée à température ambiante pendant une heure. Une solution diluée d'acide chlorhydrique (1 N) est ajoutée. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée successivement avec une solution saturée de NaHCO₃ et de la saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est chromatographié sur silice (CH₂Cl₂/Et₂O 99/1 → 98/2). L'huile jaune ainsi obtenue se solidifie lentement. Le solide est ensuite trituré dans l'hexane. Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (975 mg, 2.1 mmol, 35 %). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 7.35-7.24 (*m*, 15H, H aromatiques des benzyles), 5.80-5.69 (*m*, 1H, H vinylique), 5.03-5.13 (*m*, 2H, H vinyliques terminaux), 4.92 (*d*, *J* = 11, 1H, OCH₂- benzyliques), 4.85 (*d*, *J* = 11, 1H, OCH₂- benzyliques), 4.80 (*d*, *J* = 11, 1H, OCH₂- benzyliques), 4.69 (*d*, *J* = 11, 1H, OCH₂- benzyliques), 4.63-4.58 (*m*, 2H, OCH₂- benzyliques), 4.06-3.99 (*m*, 1H), 3.83-3.43 (*m*, 6H), 2.50-2.42 (*m*, 2H, -CH₂ allylique).

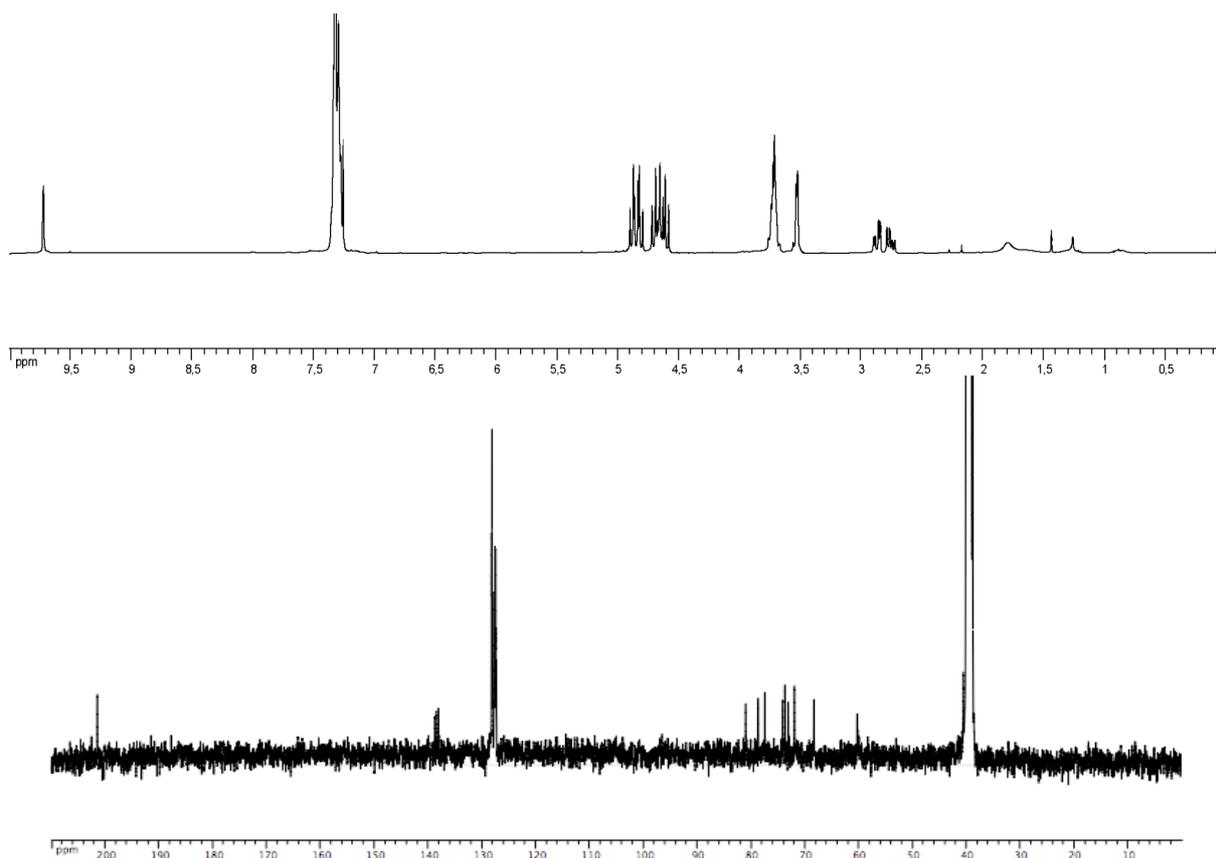


Synthèse du composé 14:

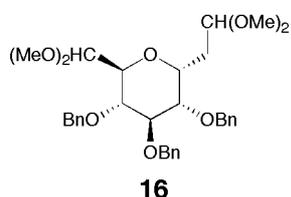


Le composé **13** (475 mg, 1 mmol, 1 equiv.) est dissous dans un mélange de dichlorométhane (32 ml) et de méthanol (8 ml). On fait buller un flux d'ozone dans cette solution, refroidie à -78°C par un bain d'acétone contenant de la carboglace, jusqu'à apparition d'une couleur bleu ciel, qui indique que la solution est saturée en ozone. L'excès d'ozone est évacué en dégazant le milieu réactionnel à l'argon, puis de la triphénylphosphine (0.6 g, 2.3 mmol, 2 equiv.) est ajoutée. On laisse revenir la réaction à température ambiante et on l'agite à cette température 2 heures. Après ce délai, le milieu ne contient plus de peroxydes (test de la présence de peroxydes: 2 gouttes du mélange réactionnel, 5 gouttes d'acide acétique dans une solution de KI 10 % dans l'eau). Le milieu réactionnel est alors concentré sous vide. Le résidu est chromatographié sur silice (Et₂O/CH₂Cl₂ 99/1 → 95/5) et le produit obtenu sous la forme d'un solide blanc (396 mg, 0.8 mmol, 83 %). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 9.75 (*s*, 1H, CHO), 7.41-7.26 (*m*, 15H, H aromatiques des benzyles), 4.96-4.58 (*m*, 6H, 3 OCH₂- benzyliques), 3.83-3.66 (*m*, 4H), 3.61-3.5 (*m*, 2H), 2.9 (*dd*, 1H, *J* = 16, 5, 1H en α de l'aldéhyde), 2.79 (*dd*, 1H, *J* = 16, 8, 1H en α de l'aldéhyde). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 201.47, 138.77, 138.48, 138.12, 128.23, 127.76, 127.60, 127.51, 127.44, 127.34, 81.03, 78.72, 77.47, 74.15, 73.75, 73.13, 71.97, 68.36, 60.32, 40.58. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₂₉H₃₂NaO₆ [*M*+Na]⁺ 499.2091 observée *m/z*: 499.2070.

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale



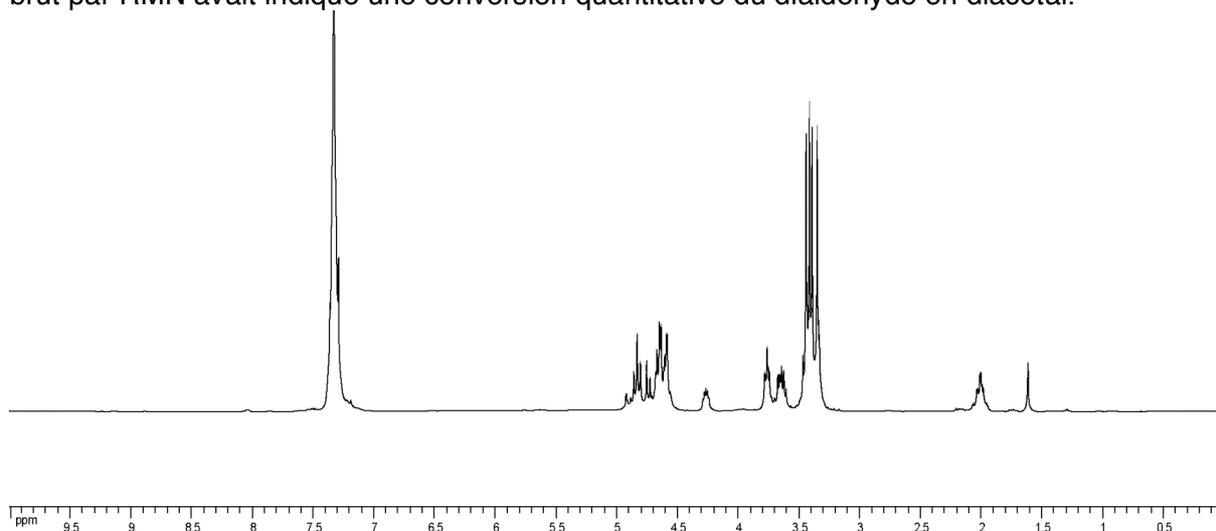
Synthèse du composé **16**:



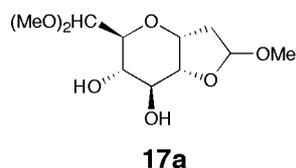
L'aldéhyde **14** (200 mg, 0.4 mmol, 1 equiv.) est dissous dans du dichlorométhane (2 ml). Le radical libre TEMPO est ajouté à cette solution en quantité catalytique (0.6 mg, 0,004 mmol, 0.01 equiv.). L'oxydant, l'acide trichloroisocyanurique (166 mg, 0.7 mmol, 1.7 equiv.) est ajouté par petites portions étalées sur une demi-heure. Le milieu réactionnel prend alors une teinte rouge vif et passe progressivement au jaune pâle. Le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane, filtré sur célite et lavé successivement par une solution saturée de NaHCO₃ et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous vide. Le résidu est dissous dans une solution de CeCl₃*7H₂O dans du méthanol (0.4 M, 1 ml). Du triméthylorthoformate (0.155 ml, 1.41 mmol) est ensuite ajouté à cette solution qui est agitée à température ambiante pendant 24 heures. La solution est diluée avec du chloroforme puis lavée plusieurs fois avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5%. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide. L'analyse RMN du résidu montre la formation d'un nouveau produit possédant encore une fonction aldéhyde libre. Le résidu est donc retraité par une solution de CeCl₃*7H₂O dans du méthanol (0.4 M, 0.5 ml) et du triméthylorthoformate (1 ml) pendant trois jours. Le même traitement permet d'isoler le composé protégé brut. Une purification sur TLC préparative fournit le diacétal sous la forme d'une huile jaune pâle (70 mg, 0.12 mmol, 30%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 7.41-7.25 (*m*, 15H, H aromatiques des benzyles), 4.88-4.53 (*m*, 8H, 3 OCH₂- benzyliques + 2H), 4.30-4.23 (*m*, 1H), 3.81-3.56 (*m*, 4H), 3.44, 3.41, 3.39, 3.35 (chacun est *s*, 3H, -OCH₃), 2.08-1.93 (*m*, 2H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): 138.49, 138.29, 138.04, 128.42, 128.37, 128.36, 128.20, 128, 127.98, 127.82, 127.73, 127.63, 102.21, 102.07, 80.45, 78.37, 77.21, 74.78, 74.33, 72.64, 72.23, 70.07, 55.17, 55.01, 54.06, 52.43, 29.68. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₃₃H₄₂LiO₈ [M+Li]⁺ 573.3035 observée *m/z*.

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

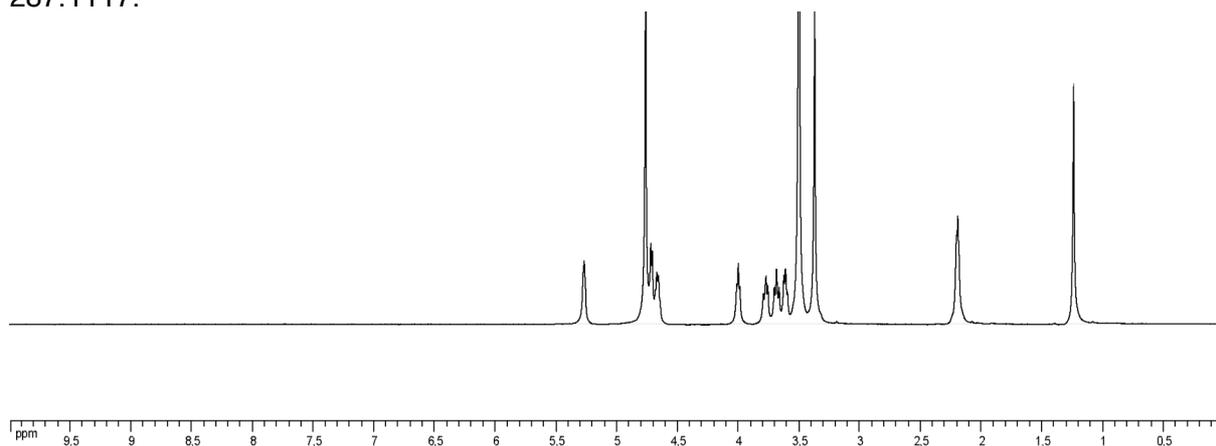
573.3095. Le faible rendement provient d'un problème de purification. L'analyse du produit brut par RMN avait indiqué une conversion quantitative du dialdéhyde en diacétal.

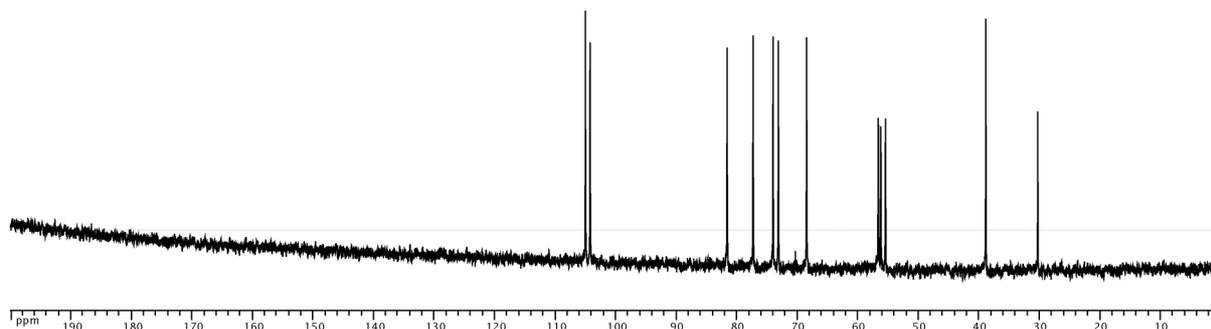


Synthèse du composé **17a**:

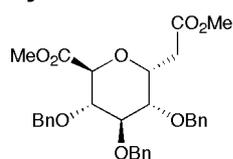


Le composé **16** (350 mg, 0.62 mmol) est dissous dans du méthanol (20 ml) et une quantité catalytique de palladium sur charbon (85 mg) est ajoutée à cette solution. Le milieu réactionnel est purgé avec de l'hydrogène pendant quelques minutes et la réaction agitée à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène pendant 24 heures. Passé ce délai la suspension est filtrée sur célite et le filtrat concentré sous vide. Après chromatographie sur gel de silice (AcOEt) le composé déprotégé **17a** est obtenu sous la forme d'un sirop incolore (70 mg, 43%). ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): 5.31-5.22 (*m*, 1H), 4.72 (*d*, $J=5$, 1H), 4.66 (*d*, $J=5$, 1H), 4-3.97 (*m*, 1H), 3.82-3.58 (*m*, 3H), 3.50 (*s*, 6H, 2 $-\text{OCH}_3$), 3.37 (*s*, 3H, 1- OCH_3), 2.25-2.14 (*m*, 2H). ^{13}C RMN (D_2O , 100 MHz): 105.02, 104.25, 81.61, 77.32, 74.02, 73.14, 68.48, 56.64, 56.22, 55.44, 38.87. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NaO}_7$ [$M+\text{Na}$] $^+$ 287.1101 observée m/z : 287.1117.





Synthèse du composé 18:



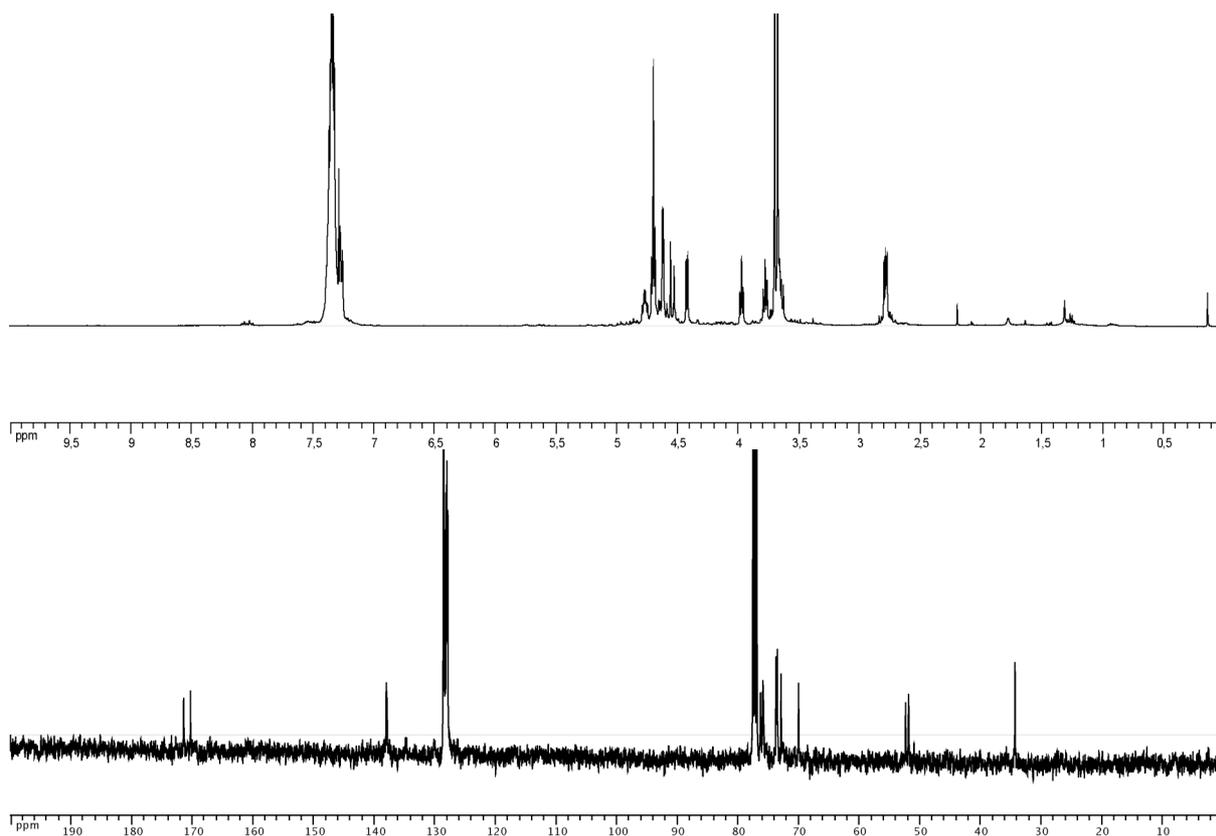
18

L'aldéhyde **14** (200 mg, 0.4 mmol, 1 equiv.) est dissous dans du dichlorométhane (2 ml). Le radical libre TEMPO est ajouté à cette solution en quantité catalytique (0.6 mg, 0,004 mmol, 0.01 equiv.). L'oxydant, l'acide trichloroisocyanurique (166 mg, 0.7 mmol, 1.7 equiv.) est ajouté par petites portions étalées sur une demi-heure. Le milieu réactionnel prend alors une teinte rouge vif et passe progressivement au jaune pâle. Le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane, filtré sur célite et lavé successivement par une solution saturée de NaHCO₃ et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous vide.

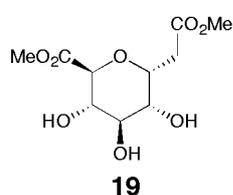
Le résidu est dissous dans de l'acetonitrile (3 ml). Une solution de NaH₂PO₄ (92 mg, 0.8 mmol, 1.9 equiv.) dans l'eau (1.15 ml) et de l'eau oxygénée (290 µl) sont ajoutés au milieu réactionnel. Une solution de NaClO₂ (457 mg, 5 mmol, 12 equiv.) dans l'eau (4 ml) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel maintenu à température ambiante par un bain d'eau. L'addition se fait goutte-à-goutte pendant une heure. La réaction est agitée une heure supplémentaire puis arrêtée par l'ajout d'une solution d'hydrogénosulfite de sodium (30% en masse, 1 ml). Le milieu réactionnel est ensuite acidifié par l'ajout d'une solution aqueuse 1N d'acide chlorhydrique. Cette solution est extraite 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous vide.

Le résidu jaunâtre est ensuite dissous dans de la DMF sèche (2.5 ml). Du carbonate de potassium (328 mg, 1 mmol, 2.4 equiv.) est ajouté à cette solution, suivie par de l'iodure de méthyle (0.142 g, 63 µl, 1 mmol, 2.4 equiv.). Cette suspension est agitée à température ambiante toute la nuit. Elle passe du jaune clair au rouge. Le milieu réactionnel est ensuite concentré sous vide est le résidu chromatographié sur silice (CHCl₃/AcOEt:99/1). Le diester est obtenu sous la forme d'une huile orange pâle (155 mg, 0.29 mmol, 69%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 7.44-7.16 (*m*, 15 H, H aromatiques des benzyles), 4.82-4.31 (*m*, 8H, 6H -CH₂ benzyliques + 2H), 3.97 (*t*, J = 5, 1H), 3.98 (*t*, J = 6, 1H), 3.74-3.61 (*m*, 7H, 2-OCH₃ + 1H), 2.84-2.72 (*m*, 2H, -CH₂ en α du carbonyle). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): 171.29, 170.14, 137.86, 137.81, 137.70, 128.68, 128.43, 128.40, 128.17, 128.02, 127.87, 127.79, 127.70, 76.02, 75.66, 75.52, 73.56, 73.47, 73.37, 72.71, 69.80, 52.21, 51.70, 34.17. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₃₁H₃₄LiO₈ [M+Li]⁺ 541.2409 observée *m/z*: 541.2406.

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

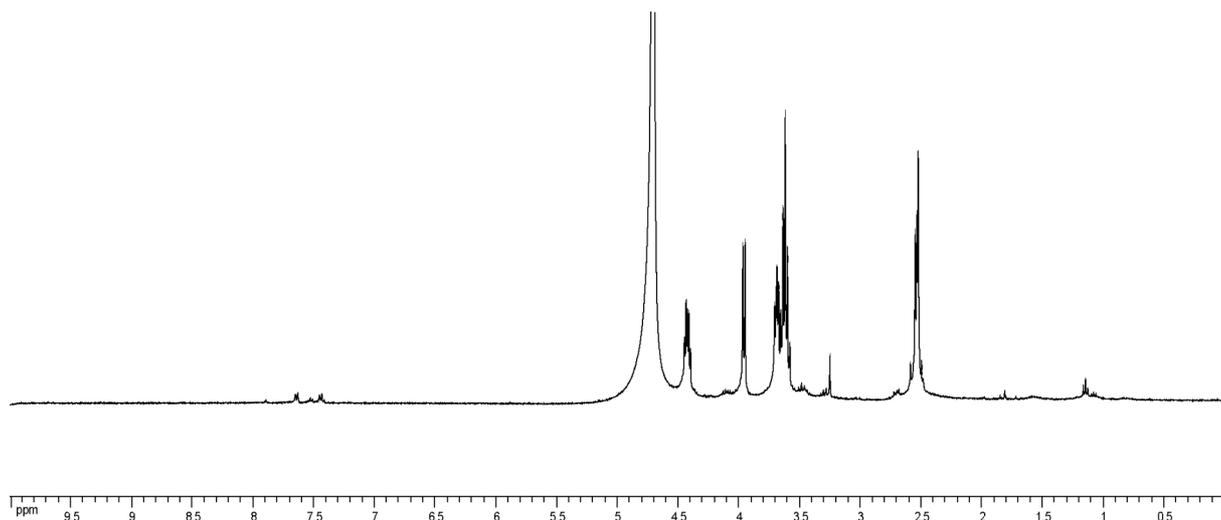


Synthèse du composé **19**:

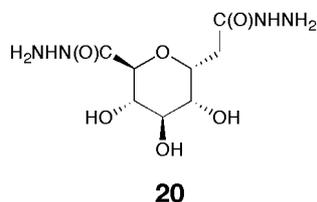


Le diester **18** (155 mg, 0.29 mmol) est dissous dans un mélange méthanol/eau 4/1 (30 ml) et une quantité catalytique de palladium sur charbon (78 mg) est ajoutée à cette solution. Le milieu réactionnel est purgé avec de l'hydrogène pendant quelques minutes et la réaction agitée à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène pendant 24 heures. Passé ce délai la suspension est filtrée sur célite et le filtrat concentré sous vide. Le diester deprotégé est obtenu sous la forme d'un solide incolore (90 mg), contenant probablement une quantité importante d'eau ou de méthanol, qui est utilisé directement lors de l'étape suivante. $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz): 4.58-4.51 (*m*, 1H), 4.23 (*d*, $J = 7$, 1H), 3.84-3.63 (*m*, 9H), 2.76-2.65 (*m*, 2H, $-\text{CH}_2$ en α du carbonyle). Ce composé est utilisé directement pour l'étape suivante. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NaO}_8$ [$M+\text{Na}$] $^+$ 287.0737 observée m/z : 287.0757.

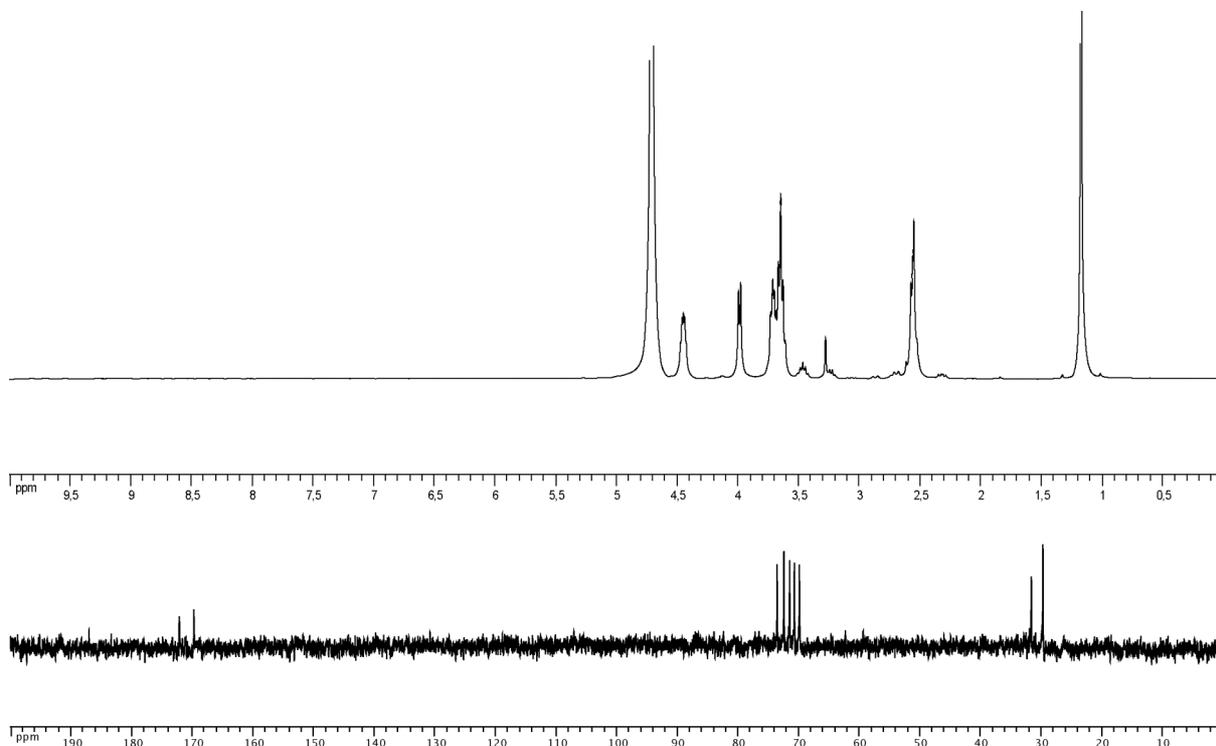
Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale



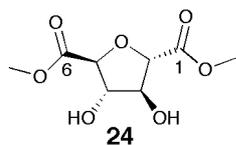
Synthèse du dihydrazide 20:



Le diester déprotégé **19** (90 mg) est dissous dans du méthanol (7.5 ml). De l'hydrazine monohydrate (155 μ l, 2,5 mmol, 8 equiv.) est ajouté à cette solution. La réaction est agitée durant la nuit pour donner une suspension blanche. Le précipité est filtré puis séché sous vide. Le dihydrazide est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (54 mg, 0.2 mmol, 70% par rapport à **19**). ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): 4.52-4.33 (*m*, 1H), 3.96 (*d*, $J = 7$, 1H), 3.78-3.39 (*m*, 3H), 2.64-2.33 (*m*, 2H, $-\text{CH}_2$ en α du carbonyle). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 172.71, 170.31, 74.15, 73.02, 72.06, 71.28, 70.46, 32.20. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{LiO}_6$ [$M+\text{Na}$] $^+$ 271.1225 observée m/z : 271.1215.

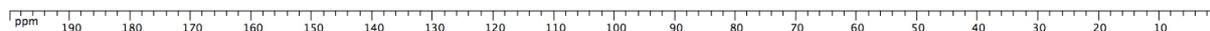
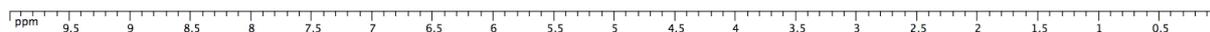
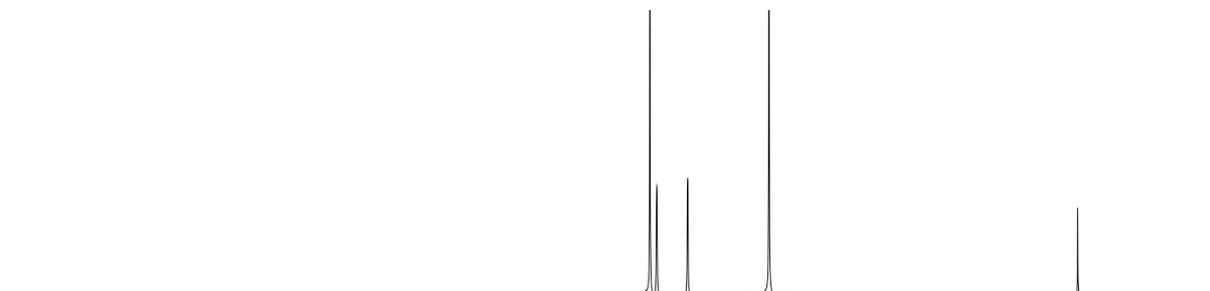


Synthèse du 1,6-diméthyl 2,5-anhydro-mannarate **24**:

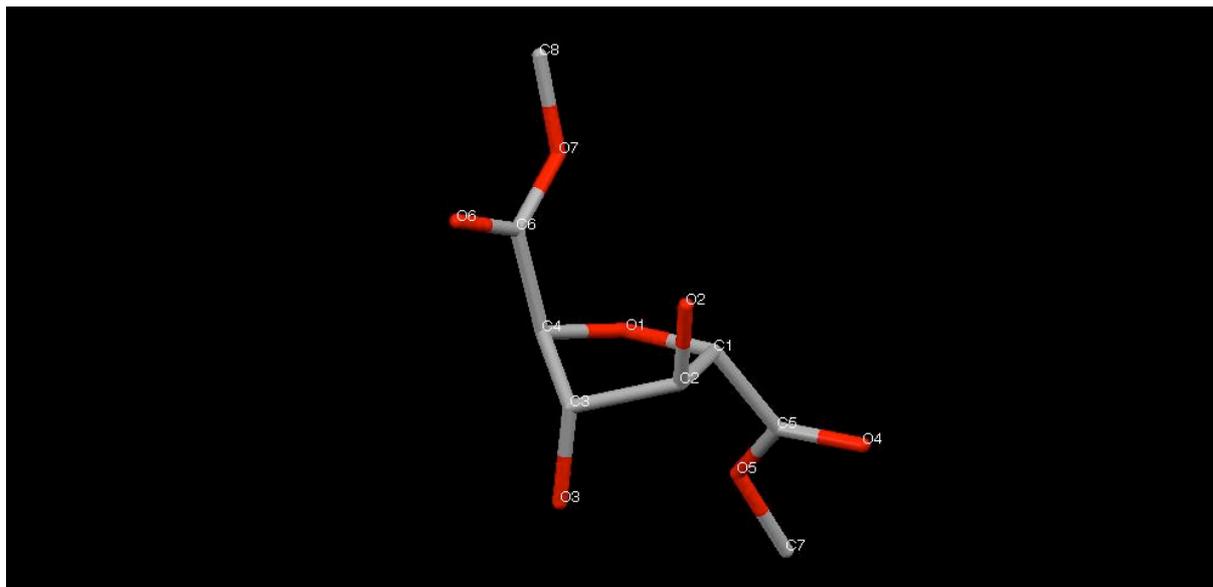


De la glucosamine sous forme d'hydrochlorure (30 g, 139 mmol) est dissoute dans une solution d'acide nitrique HNO₃ à 34% (82 ml) puis chauffée goutte-à-goutte à l'aide d'un bain marie jusqu'à une température de 80°C. L'élévation de la température doit être progressive et le ballon posséder un volume mort suffisamment important pour laisser la place à l'ébullition qui résulte d'important dégagements gazeux (fumée orange d'HNO₂) aux alentours de 60-70°C. La réaction étant exothermique et libérant un grand volume de gaz toxique il n'est pas conseillé de mettre en œuvre cette réaction à plus grande échelle sans précautions particulières.

Après 4 heures à 80°C cette solution verdâtre est concentrée à sec sous pression réduite à 45°C. Le résidu ainsi obtenu est dissous dans 60 ml d'eau puis cette solution est à nouveau concentrée à sec sous pression réduite à 45°C. Ce processus est répété 3 fois. Le résidu (une mousse blanche) est séché à la rampe à vide pendant 12 h puis dissous dans 250 ml de MeOH. L'acide résiduel contenu dans le produit brut suffit à catalyser l'estérification. Après 48 h à température ambiante le solvant est évaporé en même temps que le produit brut est adsorbé sur silice. Une chromatographie sur gel de silice (AcOEt) fournit le diester **24** sous la forme d'une huile incolore qui cristallise après plusieurs jours (6.15 g, 20%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) : 4.715 (s, 2H, H-C(2, 5)), 4.463 (s, 2H, H-C(3, 4)), 3.790 (s, 6H, 2-COOCH₃). ¹³C (100 MHz, D₂O) 172.858 (-COOMe), 84.012 (C(2, 5)), 79.054 (C(3, 4)), 53.618 (2-COOCH₃). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₈H₁₃O₇ [M+H]⁺ 221.0656 observée m/z: 221.0690.



Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale



Structure tridimensionnelle de **24** obtenue par diffraction des rayons X sur des monocristaux obtenus par diffusion lente de diisopropylether dans une solution de **24** dans le méthanol.

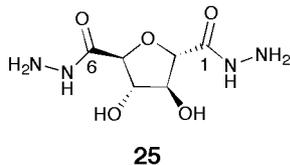
Composé	24
Formule chimique	C ₈ H ₁₂ O ₇
<i>M</i> (g.mol ⁻¹)	220.18
Température (K)	173(2)
Longueur d'onde (Å)	0.71073
Groupe d'espace	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> (Å)	5.23500(10)
<i>b</i> (Å)	6.8190(2)
<i>c</i> (Å)	24.9830(10)
α (°)	90.00
β (°)	90.00
γ (°)	90.00
<i>V</i> (Å ³)	891.83
<i>Z</i> , <i>Z'</i>	<i>Z</i> : 4 <i>Z'</i> : 0
<i>R</i> (%)	5.9

Informations sur les données cristallographiques et les paramètres de résolution de la structure de **24**.

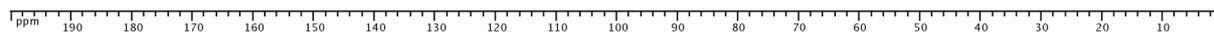
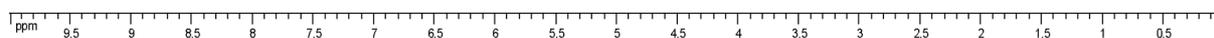
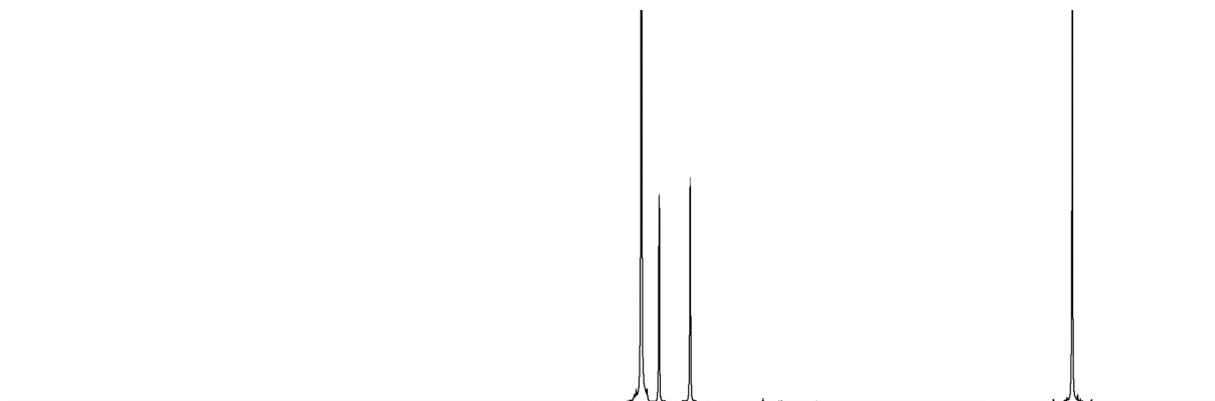
Atome 1	Atome 2	Length(Å)	SybylType	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle(°)
C1	H1	0.980	1	C8	O7	C6	120.04
C1	C2	1.548	1	O6	C6	O7	124.36
C1	C5	1.518	1	O7	C6	C4	114.92
C1	O1	1.443	1	O6	C6	C4	120.52
C2	H2	0.980	1	C6	C4	O1	112.51
C2	C3	1.533	1	C6	C4	C3	113.26
C2	O2	1.412	1	C3	C4	O1	104.84
C3	H3	0.980	1	C4	C3	O3	106.37
C3	C4	1.523	1	C4	C3	C2	101.74
C3	O3	1.424	1	O3	C3	C2	110.00
C4	H4	0.981	1	C3	C2	O2	107.82
C4	C6	1.535	1	C3	C2	C1	102.06
C4	O1	1.428	1	O2	C2	C1	111.88
C5	O4	1.236	2	C4	O1	C1	108.36
C5	O5	1.330	1	O1	C1	C2	107.46
C6	O6	1.225	2	O1	C1	C5	110.43
C6	O7	1.337	1	C2	C1	C5	112.90
C7	H7A	0.961	1	C1	C5	O4	119.44
C7	H7B	0.960	1	O4	C5	O5	123.85
C7	H7C	0.959	1	C1	C5	O5	116.69
C7	O5	1.413	1	C5	O5	C7	122.05
C8	H8A	0.959	1				
C8	H8B	0.960	1				
C8	H8C	0.960	1				
C8	O7	1.425	1				
O2	H2A	0.819	1				
O3	H3A	0.820	1				

Mesures des longueurs et des angles de liaisons dans la maille cristalline de **24**.

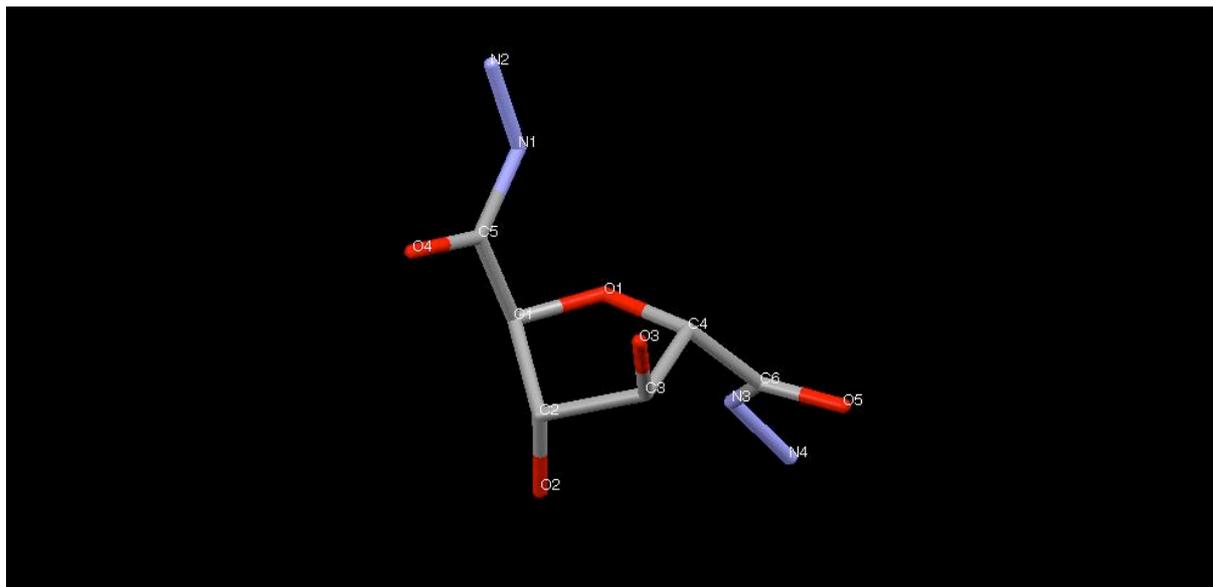
Synthèse du 2,5-anhydro-mannaric acid dihydrazide **25**:



Le diester **24** (4 g, 18 mmol) est dissous dans du méthanol puis refroidit à 0°C à l'aide d'un bain de glace. L'hydrazine monohydrate en excès (3.5 ml, 6.6 g, 72 mmol) est alors ajoutée goutte-à-goutte à cette solution. La réaction est ramenée à température ambiante et agitée pendant 12 h. La suspension blanche que l'on obtient est filtrée pour récupérer le solide qui est ensuite lavé par du MeOH. Ce solide est ensuite recristallisé dans de l'éthanol contenant un minimum d'eau pour donner **25** sous la forme de petites aiguilles incolores (2 g, 50%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 4.613 (s, 2H, H-C(2, 5)), 4.357 (s, 2H, H-C(3, 4)). ¹³C (100 MHz, D₂O) 170.402 (-CONHNH₂), 84.525 (C(2, 5)), 78.651 (C(3, 4)). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₆H₁₂LiN₄O₅ [*M*+Li]⁺ 227.0962 observée *m/z*. 227.0963.



Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale



Structure tridimensionnelle de **25** obtenue par diffraction des rayons X sur des monocristaux obtenus par recristallisation dans l'éthanol.

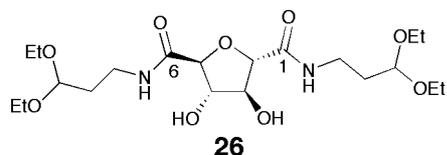
Composé	25
Formule chimique	$C_8H_{12}N_4O_5$
M (g.mol ⁻¹)	220.18
Température (K)	173(2)
Longueur d'onde (Å)	0.71073
Groupe d'espace	$P 2_1 2_1 2_1$
a (Å)	5.2334(2)
b (Å)	6.8176(3)
c (Å)	24.9772(13)
α (°)	90.00
β (°)	90.00
γ (°)	90.00
V (Å ³)	891.167
Z, Z'	$Z: 4 Z': 0$
R (%)	4.23

Informations sur les données cristallographiques et les paramètres de résolution de la structure de **25**.

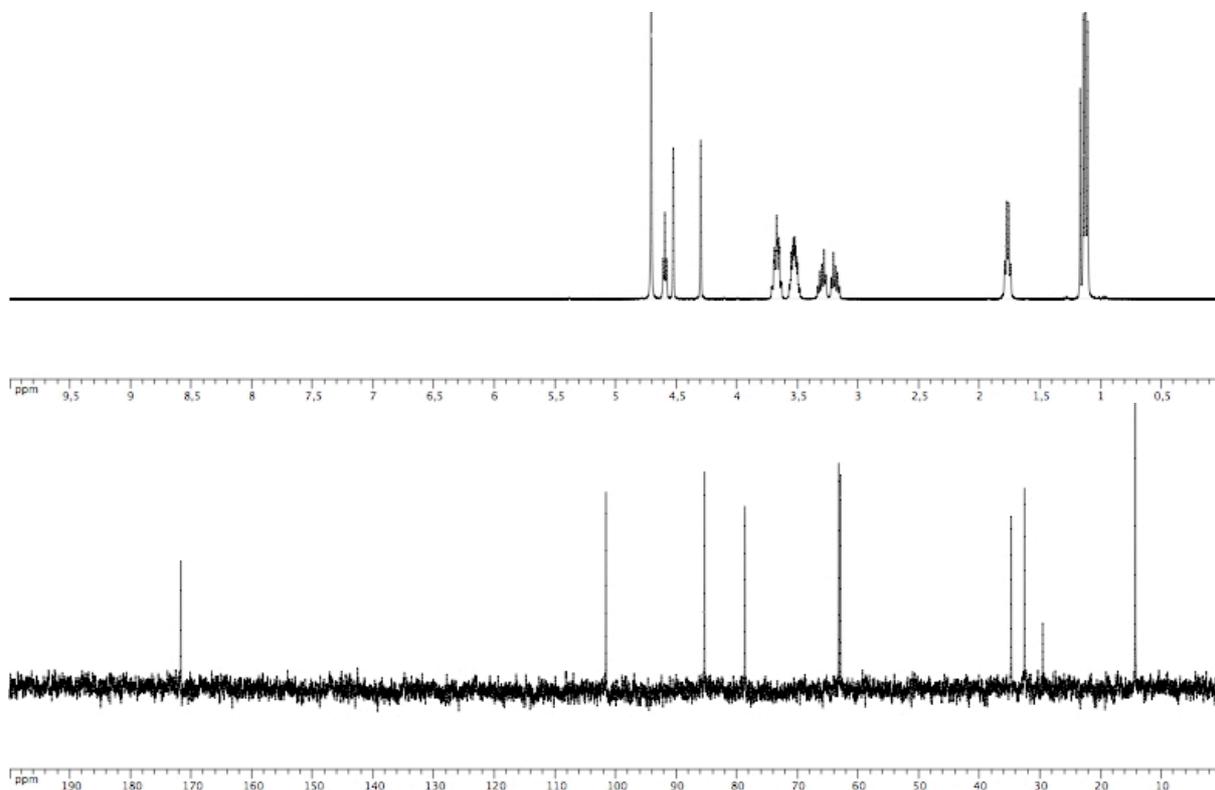
Atome 1	Atome 2	Longueur (Å)	SybylType	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle(°)
C1	H1	0.980	1	N4	N3	C6	122.97
C1	C2	1.526	1	O5	C6	N3	123.81
C1	C5	1.512	1	O5	C6	C4	118.67
C1	O1	1.439	1	N3	C6	C4	117.49
C2	H2	0.980	1	O5	C6	C4	118.67
C2	C3	1.529	1	C4	C6	O5	118.67
C2	O2	1.420	1	C6	C4	C3	113.41
C3	H3	0.981	1	C6	C4	O1	110.48
C3	C4	1.550	1	C3	C4	O1	106.56
C3	O3	1.417	1	C3	C2	C1	101.64
C4	H4	0.980	1	C2	C1	O1	104.22
C4	C6	1.507	1	C4	O1	C1	108.89
C4	O1	1.447	1	C4	C3	C2	102.81
C5	N1	1.332	un	C4	C3	O3	111.82
C5	O4	1.241	2	O3	C3	C2	107.76
C6	N3	1.314	un	C3	C2	O2	109.88
C6	O5	1.245	2	O2	C2	C1	106.60
N1	N2	1.423	1	C2	C1	C5	114.13
N1	H1N	0.802	1	C5	C1	O1	112.23
N2	H2M	0.843	1	C1	C5	O4	120.61
N2	H2N	0.948	1	O4	C5	N1	122.85
N3	N4	1.416	1	C1	C5	N1	116.41
N3	H3N	0.870	1	C5	N1	N2	121.52
N4	H4N	1.002	1				
N4	H4M	0.885	1				
O2	H2A	0.820	1				
O3	H3A	0.819	1				

Mesures des longueurs et des angles de liaisons dans la maille cristalline de **25**.

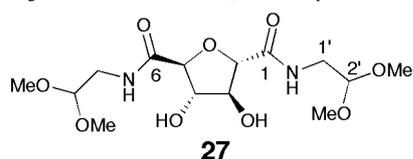
Synthèse du N,N'-di(3-diéthoxypropyl) 2,5-anhydro-mannaramide 26:



Le diester **24** (3 g, 13.6 mmol) est dissous dans du MeOH en présence de 3,3-diéthoxy-propylamine (4.55 g, 5 ml, 30.1 mmol). Cette solution est mise sous reflux pendant 3 h. Après refroidissement, le solvant et l'excès d'amine sont éliminés sous pression réduite. Le produit brut est chromatographié sur gel de silice (AcOEt/MeOH 1/0→9/1 puis CH₂Cl₂/MeOH 1/0→9/1) pour donner le dialdéhyde protégé sous la forme d'une huile incolore (1.193 g, 20%) qui cristallise après plusieurs jours au réfrigérateur. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 4.679 (t, J=11.3, 2H, H-C(OEt)₂), 4.595 (s, 2H, H-C(2, 5)), 4.369 (s, 2H, H-C(3, 4)), 3.74-3.62 (m, 4H, -OCH₂CH₃), 3.54-3.46 (m, 4H, -OCH₂CH₃), 3.36-3.13 (m, 4H, -NHCH₂CH₂) 1.81-1.73 (m, 4H, -NHCH₂CH₂), 1.196 (t, 12H, -OCH₂CH₃ J=14.2). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 171.736 (C(1, 6), -CON), 101.632 (C(3'), -C(OEt)₂), 85.384 (C(2, 5)), 78.727 (C(3, 4)), 63.240, 62.945 (2-C(OCH₂CH₃)₂), 34.820 (C(2')), 32.587 (C(1')), 14.355 (4-OCH₂CH₃). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₂₀H₃₈NaN₂O₉ [M+Na]⁺ 473.247 observée m/z: 473.240.



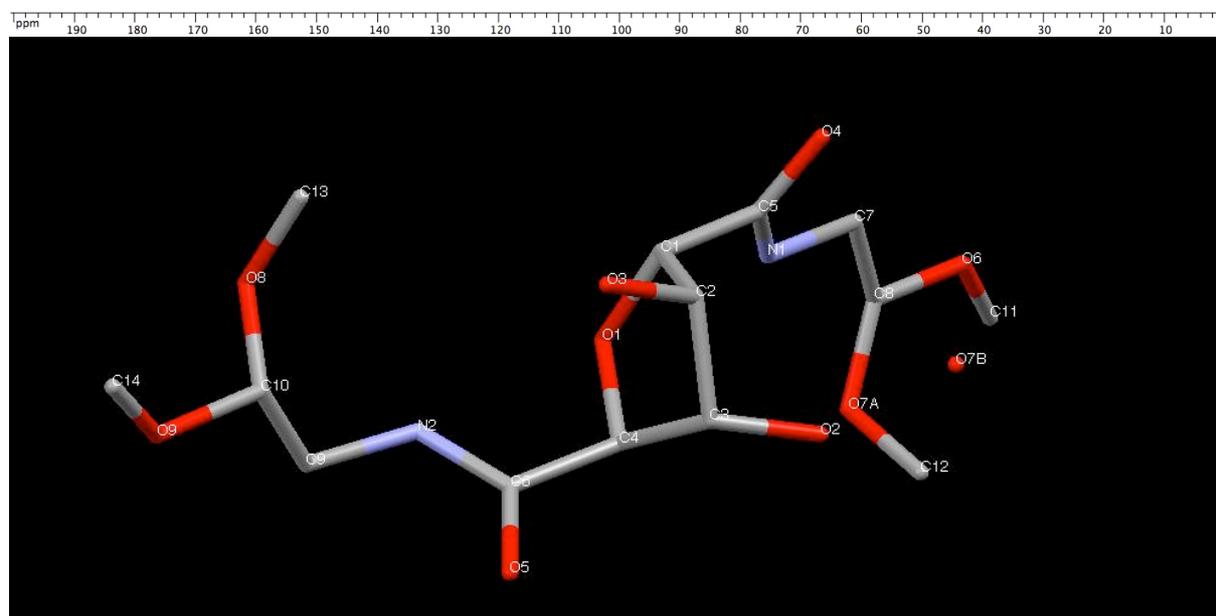
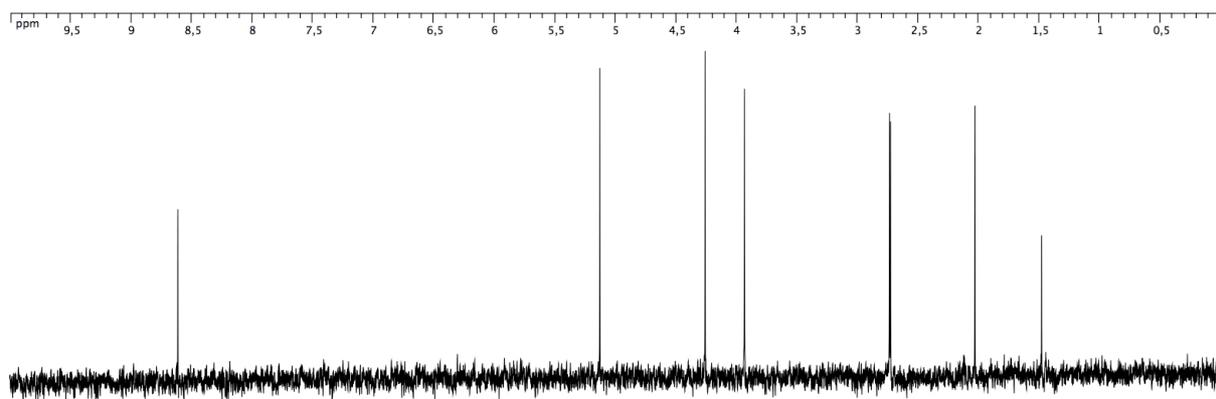
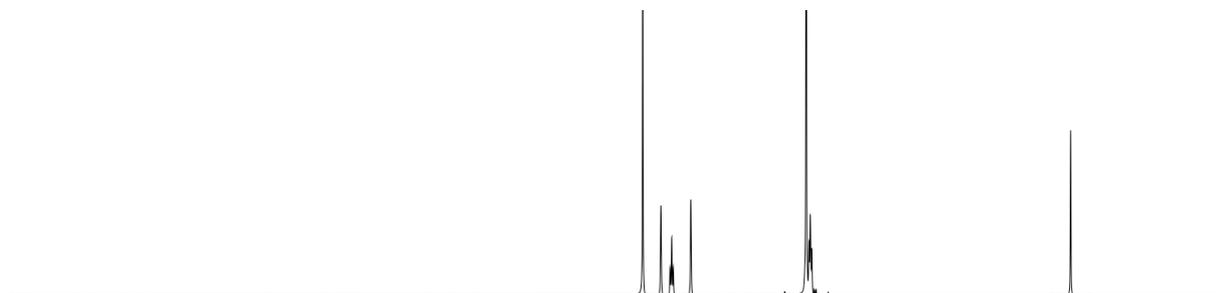
Synthèse du N,N'-di(2-méthoxypropyl) 2,5-anhydro-mannaramide 27:



Le diester **24** (1.5 g, 6.8 mmol) est dissous dans du méthanol et la 2,2-diméthoxy-éthylamine (2.88 g, 3 ml, 27 mmol). Cette solution est mise sous reflux pendant 3 h. Après refroidissement le solvant et l'excès d'amine sont éliminés sous pression réduite. Le produit brut est recristallisé dans un mélange MeOH/Et₂O donner le dialdéhyde protégé sous la forme de cristaux plats (1.109 g, 44%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) :4.62 (s, 2H, H-C(2, 5)), 4.54 (t, J=5.5, 2H, H-C(OMe)₂), 4.38 (s, 2H, H-C(3, 4)), 3.42 (s, 12H, 4-OCH₃), 3.39 (t, J=5.5, 2H, H-C(1')). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 172.99 (C(1, 6), -CON), 103.28 (C(2')), -C(OMe)₂, 85.89 (C(2, 5)), 79.39 (C(3, 4)), 55.43 (2-OCH₃), 55.26 (2-OCH₃), 41.31 (C(1')). ESI-MS(pos.): m/z: 243.05

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

$[M+Na]^+$, 227.077 $[M+Li]^+$; analyse élémentaire calculée (%) pour $C_{14}H_{26}N_2O_9$: C 45.9, H 7.15, N 7.65; valeurs obtenues: C 44.91, H 7.30, N 7.59.



Structure tridimensionnelle de **27** obtenue par diffraction des rayons X sur des monocristaux obtenus par recristallisation dans le MeOH. Un oxygène supplémentaire est présent sur une des fonctions acétal, cela est dû au fait que dans la maille cristalline ces deux positions sont occupées dans un ratio de 60/40.

Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

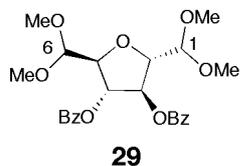
Composé	27
Formule chimique	C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₉
<i>M</i> (g.mol ⁻¹)	366.36
Température (K)	173(2)
Longueur d'onde (Å)	0.71073
Groupe d'espace	P 2 ₁
<i>a</i> (Å)	11.9148(6)
<i>b</i> (Å)	5.1265(3)
<i>c</i> (Å)	15.5996(11)
α (Å)	90.00
β (Å)	109.130(2)
γ (Å)	90.00
<i>V</i> (Å ³)	900.224
<i>Z</i> , <i>Z'</i>	<i>Z</i> : 2 <i>Z'</i> : 0
<i>R</i> (%)	5.22

Informations sur les données cristallographiques et les paramètres de résolution de la structure de 27.

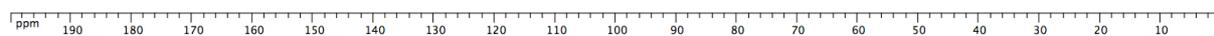
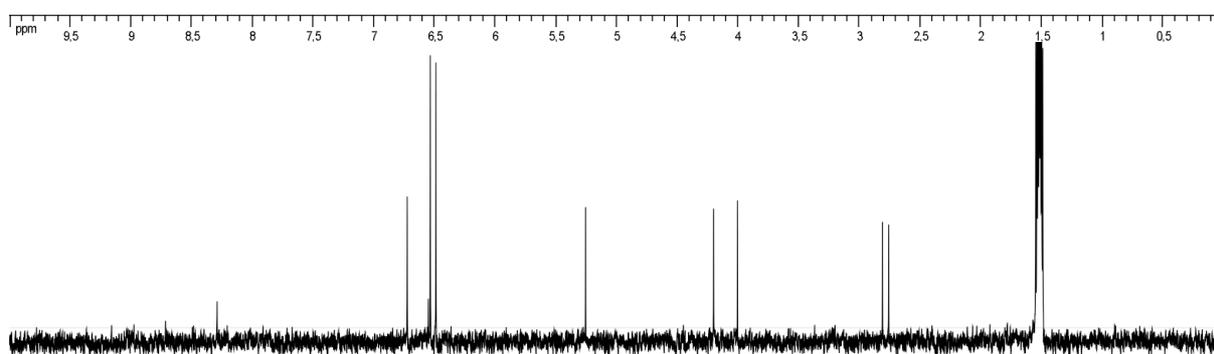
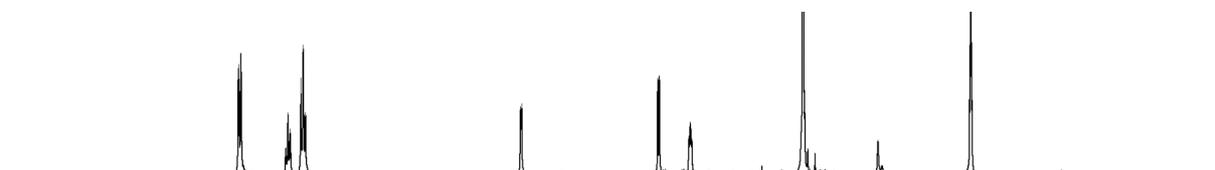
Atome 1	Atome 2	Longueur (Å)	SybylType	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle(°)
C1	H1	0.980	1	C14	O9	C10	113.59
C1	C2	1.541	1	O9	C10	O8	110.19
C1	C5	1.511	1	O8	C10	C9	108.67
C1	O1	1.427	1	O9	C10	C9	106.95
C2	H2	0.980	1	C13	O8	C10	116.45
C2	C3	1.522	1	C10	C9	N2	111.92
C2	O3	1.429	1	C9	N2	C6	123.41
C3	H3	0.980	1	N2	C6	O5	123.68
C3	C4	1.528	1	O5	C6	C4	119.73
C3	O2	1.424	1	N2	C6	C4	116.53
C4	H4	0.979	1	C6	C4	O1	110.95
C4	C6	1.509	1	C6	C4	C3	114.78
C4	O1	1.431	1	O1	C4	C3	106.14
C5	N1	1.325	un	C4	C3	C2	102.89
C5	O4	1.239	2	C4	C3	O2	112.20
C6	N2	1.331	un	C2	C3	O2	106.71
C6	O5	1.244	2	O3	C2	C3	107.93
C7	H7A	0.971	1	C1	C2	C3	101.67
C7	H7B	0.970	1	O3	C2	C1	111.32
C7	C8	1.442	1	O1	C1	C2	105.98
C7	N1	1.449	1	C4	O1	C1	110.72
C8	H8	0.980	1	C2	C1	C5	113.93
C8	O6	1.358	1	O1	C1	C5	111.39
C8	O7A	1.358	1	C1	C5	O4	120.53
C9	H9A	0.970	1	C1	C5	N1	116.19
C9	H9B	0.970	1	N1	C5	O4	123.20
C9	C10	1.489	1	C5	N1	C7	122.31
C9	N2	1.447	1	N1	C7	C8	114.73
C10	H10	0.980	1	C8	O6	C11	120.41
C10	O8	1.406	1	C8	O7A	C12	113.35
C10	O9	1.403	1	C7	C8	O7A	123.19
C11	H11A	0.960	1	C7	C8	O6	109.81
C11	H11B	0.961	1				
C11	H11C	0.960	1				
C11	O6	1.385	1				
C12	H12A	0.960	1				
C12	H12B	0.960	1				
C12	H12C	0.960	1				
C12	O7A	1.489	1				
C13	H13A	0.960	1				
C13	H13B	0.961	1				
C13	H13C	0.959	1				
C13	O8	1.380	1				
C14	H14A	0.960	1				
C14	H14B	0.958	1				
C14	H14C	0.961	1				
C14	O9	1.404	1				
N1	H1A	0.861	1				
N2	H2A	0.861	1				
O2	H2B	0.820	1				
O3	H3A	0.820	1				

Mesures des longueurs et des angles de liaisons dans la maille cristalline de 27.

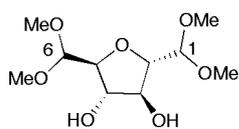
Synthèse du 2,5-anhydro-3,4-*O*-dibenzoyl-1,6-diméthylacetal-D-manno-hexodialdose **29**:



Le diol **28** est préparé selon une procédure décrite dans la littérature. Celui-ci (3.09 g, 8.29 mmol) est dissous dans du dichlorométhane sec (50 ml) puis refroidit à 0°C à l'aide d'un bain de glace. L'acide trichloroisocyanurique (4.24 g, 18.24 mmol) est ajouté sous atmosphère d'azote. Le catalyseur TEMPO est alors ajouté en quantité catalytique (5 mg). Il s'en suit une coloration rouge intense qui vire rapidement au jaunâtre lorsque la réaction est réchauffée à température ambiante. Après 15 min à cette température, la suspension obtenue est filtrée. Le filtrat est alors lavé successivement par une solution saturée de NaHCO₃, 1N HCl, de la saumure, et finalement séchée sur MgSO₄. Après filtration, la phase organique est concentrée jusqu'à la moitié de son volume initial (pas à sec !), puis diluée avec du méthanol sec (50 ml). Du triméthylorthoformate (25 ml) est ajouté suivit d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluène sulfonique (100 mg). Après une nuit à température ambiante la réaction est concentrée jusqu'au quart de son volume initial puis diluée avec de l'AcOEt. Cette solution est lavée par une solution saturée de NaHCO₃, puis de la saumure, et séchée sur MgSO₄. Après filtration et concentration sous pression réduite on obtient le produit brut qui est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) pour fournir le produit voulu sous la forme d'une huile incolore (2.02g, 53%).¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ 8.14-8.04 (m, 4H, arom.), 7.74-7.65 (m, 2H, arom.), 7.61-7.53 (m, 4H, arom.), 5.78 (dd, 2H, *J*=3, 1.2, H-C(3, 4)), 4.65 (d, 2H, *J*=5.4, H-C(1, 6)), 4.41-4.36 (m, 2H, H-C(2, 5)), 3.46 (s, 3H, -OCH₃), 3.45 (s, 3H, -OCH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, (CD₃)₂CO): δ 165.80 (C quaternaires benzoyl), 134.39 (arom. benzoyl), 130.91 (arom. benzoyl), 130.57 (arom. benzoyl), 129.66 (arom. benzoyl), 104.95 (C(1, 6)), 83.77 (C(2, 5)), 79.84 (C(3, 4)), 55.90 (-OCH₃ acetal), 54.87 (-OCH₃ acetal). MALDI-MS(pos.): *m/z*: 483.1338 [*M*+Na]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₄H₂₈NO₉: C 62.60, H 6.13; valeurs obtenues: C 62.70, H 5.95.

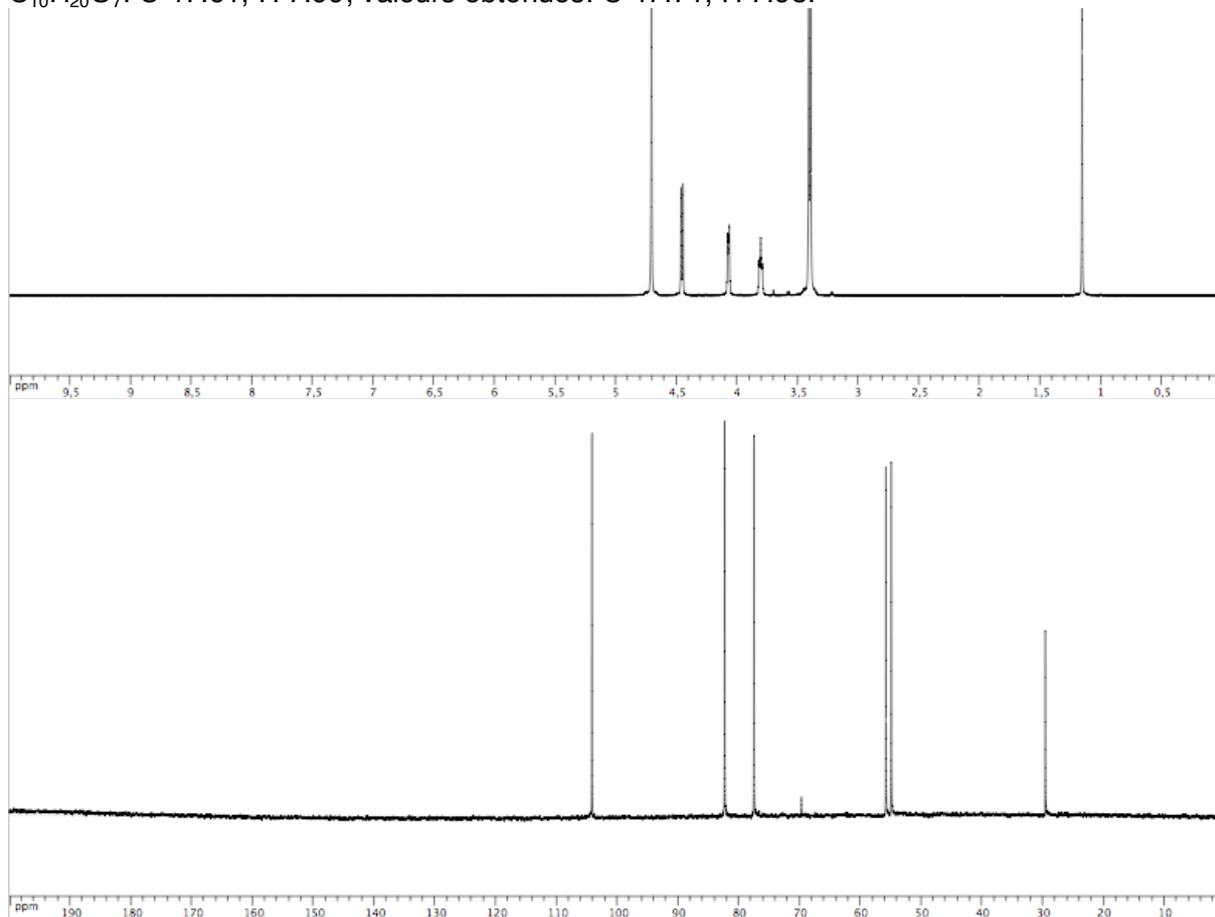


Synthèse du 2,5-anhydro-1,6-diméthylacétal-D-manno-hexodialdose **30**:



30

Le dialdéhyde protégé **29** (2.02 g, 4.38 mmol) est dissous dans du méthanol (100 ml). Du méthanolate de sodium (100 mg) est ajouté. La réaction est alors agitée à température ambiante toute la nuit. La réaction est neutralisée par l'ajout d'une résine échangeuse d'ion du type *Amberlite IR-120 H⁺form* puis filtrée. Le filtrat est concentré sous pression réduite pour donner le produit brut qui est ensuite purifié sur gel de silice (AcOEt) pour fournir le produit voulu sous la forme d'un liquide incolore (875 mg, 80%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 4.46 (*d*, J=6.11 Hz, H-C(1, 6)), 4.09-4.07 (*m*, H-C(2, 5)), 3.85-3.79 (*m*, H-C(3, 4)), 3.416 (*s*, -OCH₃), 3.402 (*s*, -OCH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 104.806 (-C(OMe)₂), 82.982 (C(2, 5)), 78.150 (C(3, 4)), 56.450 (2-OCH₃), 55.571 (2-OCH₃).). ESI-MS(pos.): *m/z*: 275.1123 [*M*+Na]⁺, 259.132 [*M*+Li]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₁₀H₂₀O₇: C 47.61, H 7.99; valeurs obtenues: C 47.71, H 7.98.



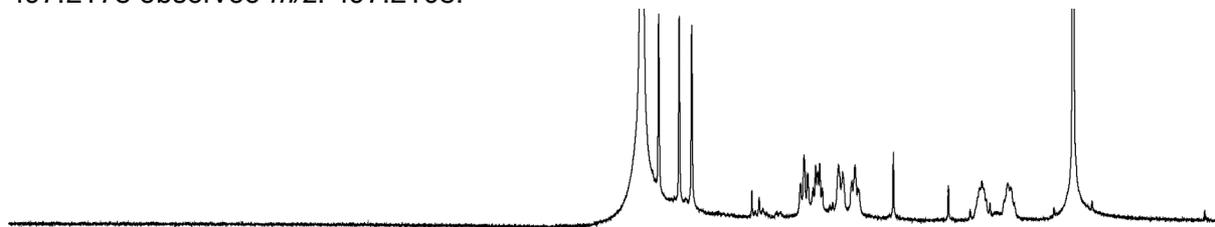
Synthèse des macrocycles **40** et **41**; exemple de procédure pour la synthèse du polymère **33**:

Du TFA (20 μ L d'une solution préparée en diluant 48 μ L de TFA dans 1 ml d'eau) est ajouté à une solution de **26** (113 mg, 0.25 mmol) dans l'eau (8 ml). Cette solution est agitée à température ambiante pendant 20 h puis le pH de la solution est ajusté à une valeur de 5 par l'ajout d'une solution concentrée de tampon acétate de sodium/acide acétique à une concentration de 500 mM (2 ml). Le monomère bis-hydrasid **33** (55 mg, 0.25 mmol) est ensuite ajouté à la solution, suivi du pyrène-1,3,6,8-tétrasulfonate de sodium (300 mg, 0.49 mmol). Après équilibration pendant 12 h les acylhydrazones de la bibliothèque constitutionnelle dynamique sont réduites par ajout d'un excès de borohydrure de sodium NaBH₄ (100 mg) par petites portions à la solution refroidie par un bain de glace. Après deux

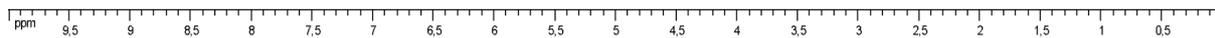
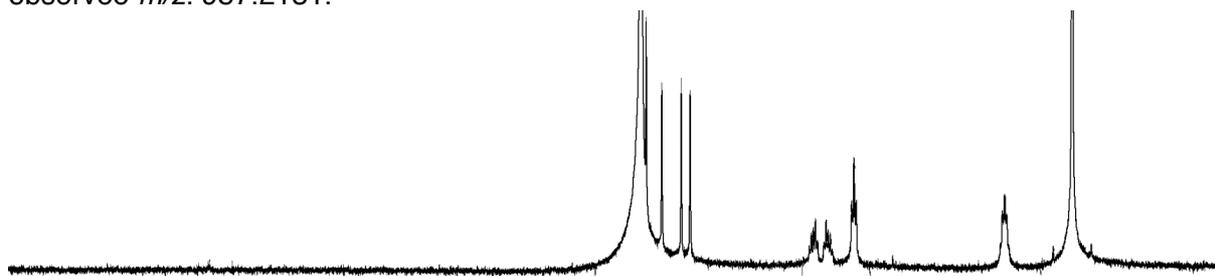
Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale

heures d'agitation à température ambiante la solution est refroidie à nouveau, puis neutralisée par l'ajout d'acide acétique (300 μ L) pour détruire l'agent réducteur en excès. Après une heure d'agitation à température ambiante la réaction est concentrée sous pression réduite, puis dissoute dans un minimum d'eau. Cette solution est ensuite déposée sur une colonne de résine échangeuse d'ion *Dowex 21K Cl-*. Après élution, on concentre sous pression réduite les fractions contenant les membres réduits de la bibliothèque. Ces fractions sont identifiées par révélation d'une goutte de chaque échantillon sur plaque de silice par de la ninhydrine. Le mélange obtenu est purifié par HPLC préparative (Gilson) à l'aide d'une colonne de type C18 (Eclipse XFB-C18 9,4mm x 25 cm). Le gradient appliqué utilise un mélange eau(0,5% TFA)/acétonitrile qui va de $t= 0$ à $t= 3$ min 1/0 \rightarrow 95/5; $t= 3$ min à $t= 6.9$ min 95/5 \rightarrow 60/40; $t= 6.9$ min à $t= 10$ min 60/40 \rightarrow 60/40; $t= 10$ min à $t= 12.1$ min 60/40 \rightarrow 99/1; $t= 12.1$ min à $t= 14.1$ min 99/1 \rightarrow 99/1. La lecture de l'absorption UV à 260 nm permet de collecter différentes fractions qui sont ensuite analysées par HPLC-MS et RMN du ^1H on isole ainsi les macrocycles **40** et **41** en quantité analytiques.

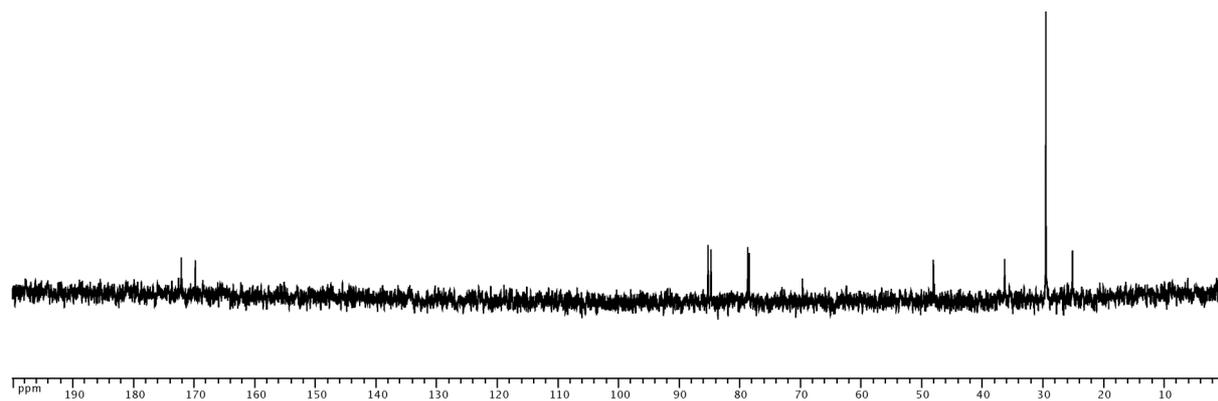
Composé macrocyclique 40: Temps de rétention= 3 min 40 s. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) 4.65 (s, 4H), 4.48 (s, 4H), 4.38 (s, 4.38), 3.54-3.27 (m, 8H), 3.21-2.95 (m, 8H), 2.10-1.66 (m, 8H); un singulet est masqué par le pic du solvant, l'enregistrement d'un spectre dans un autre solvant est donc nécessaire. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{LiN}_6\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{Li}]^+$ 497.2178 observée m/z : 497.2108.



Composé macrocyclique 41: Temps de rétention= 6 min 15 s. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) 4.75 (s, 4H), 4.62 (s, 4H), 4.46 (s, 4H), 4.39 (s, 4H), 3.42-3.20 (m, 8H), 3.04 (t, $J= 7, 8\text{H}$), 1.85-1.74 (m, 8H). ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O) 172.16, 169.84, 85.28, 84.78, 78.71, 78.49, 48.11, 36.37, 25.17. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{LiN}_{12}\text{O}_{20}$ $[\text{M}+\text{Li}]^+$ 987.4202 observée m/z : 987.2131.



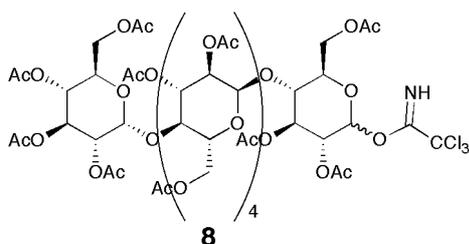
Partie Expérimentale
Chapitre II: Section Expérimentale



CHAPITRE III: Section expérimentale

Synthèse des monomères et précurseurs de monomères

Synthèse du 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl- [(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl)]₄-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate **8**:

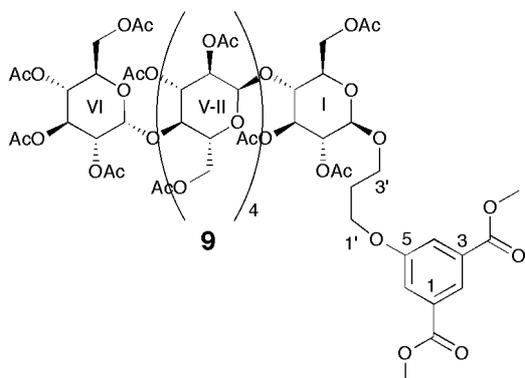


Cette molécule a été préparée en 4 étapes en se basant sur des procédures décrites dans la littérature.¹ L' α -cyclodextrine (5.0 g, 5.1 mmol) est mise en suspension dans l'anhydride acétique (50 ml) et agitée sous atmosphère d'azote à température ambiante. Une quantité catalytique d'iode² (500 mg) est ensuite ajoutée à cette suspension. Après quelques minutes, une réaction exothermique s'engage et après une nuit à température ambiante on obtient une solution rouge d'hexakis-(2,3,6-tri-*O*-acetyl) cyclomaltohexaose. Cette solution est diluée avec de l'anhydride acétique jusqu'à un volume de 270 ml puis refroidie à 0°C par un bain de glace. Une solution aqueuse à 70% en masse d'acide perchlorique HClO₄ (3.7 ml) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte toujours sous atmosphère d'azote. La température de la réaction est maintenue à 0°C pendant 20h, puis réchauffée à température ambiante pendant 2 h. Lorsque l'acétolyse est complète la réaction est de nouveau refroidie à 0°C pour être neutralisée par l'ajout goutte-à-goutte de 220 ml d'une solution aqueuse à 10% de NaHCO₃ à l'aide d'une canule. Ce mélange est alors concentré sous pression réduite pour atteindre ¼ de son volume initial. On obtient une suspension qui est diluée avec de l'AcOEt puis lavée à l'eau. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées puis lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ et de la saumure. Après séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation, on obtient l'icosa-*O*-acetylmaltohexaose **6** sous forme brute (9.35 g, 5.1 mmol). Ce produit brut est directement utilisé pour la déacétylation sélective de l'acétate anomérique par traitement avec de la pipéridine (2.8 ml, 2.41 g, 28.3 mmol) dans le THF sec (90 ml) à température ambiante pendant 24 h sous atmosphère d'azote. L'évaporation du solvant sous pression réduite est suivie d'une dilution par l'AcOEt. La phase organique est lavée par une solution d'acide chlorhydrique 1 N, de l'eau puis de la saumure. Après séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation, on obtient le produit mono déacétylé sous forme brute. Après chromatographie sur gel de silice (toluène/acétone 4/1 \rightarrow 1/1) on obtient l'2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-[(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl]₄-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α,β -D-glucopyranose **7** (6.45 g, 70%) sous la forme d'un solide blanc. Cet alcool (2 g, 1.1 mmol) en solution dans du CH₂Cl₂ sec (10 ml) est traité par un excès de trichloroacetonitrile (1.9 g, 1.35 ml, 13.4 eq.) et une quantité catalytique de DBU (3 gouttes, 56 mg, 0.36 mmol, 0.3 eq.). Après évaporation du solvant et de l'excès de trichloroacetonitrile, le produit brut est chromatographié sur gel de silice (toluène/acétone 4/1) pour donner **8** sous la forme d'un solide jaunâtre (1.369 g, 64%).

¹ Cf. Chapitre III: Glycopolymères Dynamiques références 18-21 page 110.

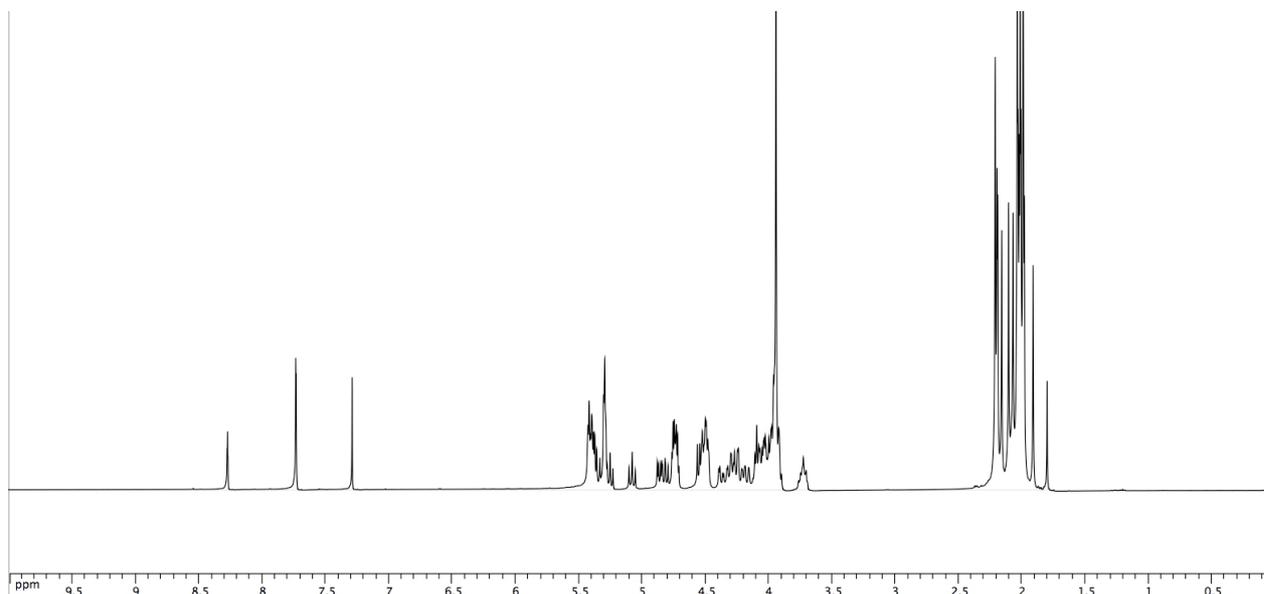
² Iodine: A Versatile Reagent in Carbohydrate Chemistry IV. Per-*O*-Acetylation, Regioselective Acylation and Acetolysis. K. P. Ravindranathan Kartha, R. A. Field. *Tetrahedron* **1997**, 53, 11753-11766.

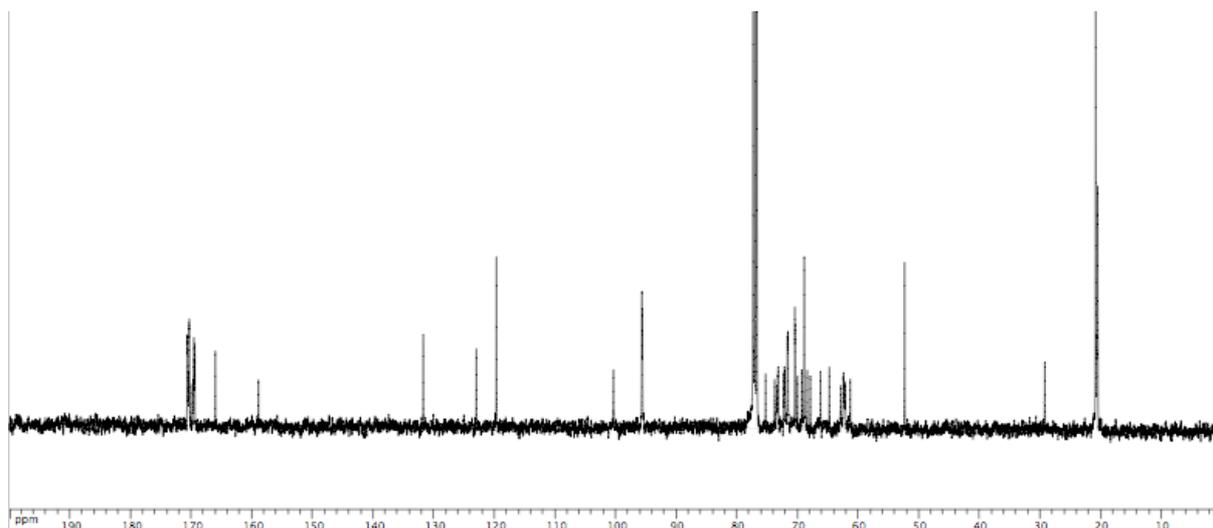
Synthèse du dimethyl 5-(3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-[(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl]₄-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)propoxy) isophthalate **9:**



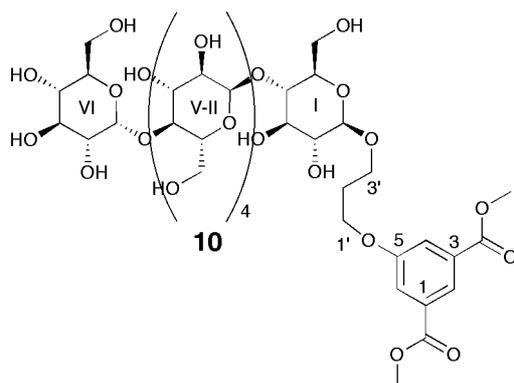
Le trichloroacetimidate **8** (2 g, 1 mmol) et l'alcool **12** (555 mg, 2 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane sec (10 ml) sous atmosphère d'azote. Cette solution est refroidie à -20°C puis du tamis moléculaire activé (2 g) est ajouté à ce mélange. Après 1 h d'agitation à cette température l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (140 mg, 110 μl , 1 mmol, 1 eq) est ajouté goutte-à-goutte. La réaction est ensuite amenée doucement (3 h) à une température de 0°C. De la pyridine (1 ml) est alors ajoutée pour neutraliser le catalyseur. La réaction est diluée dans 200 ml de CH_2Cl_2 puis

filtrée. La phase organique est lavée par une solution d'acide chlorhydrique 1 N, de la saumure, et séchée sur MgSO_4 . Après filtration et concentration sous pression réduite on obtient le produit brut qui est chromatographié sur gel de silice (toluène/acétone 4/1 \rightarrow 3/1) pour finalement obtenir **9** (875 mg, 39,5%) sous la forme d'un solide incolore. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , assignation basé sur une expérience COSY) : 8.22 (s, 1H), 7.68 (d, $J=1.46$, 2H), 5.40-5.22 (m, 11H, H-C(1^{II-VI}), 3^{II-VI}), 5.2 (t, $J=9$, 1H, H-C(3^I)), 5.03 (t, $J=9.88$, 1H, H-C(4^{VI})), 4.81 (dd, $J=1.31, 15.51$, 1H, H-C(2^{VI})), 4.79-4.74 (m, 1H, H-C(2^I)), 4.073-4.64 (m, 4H, H-C(2^{II-V})), 4.50 (d, $J=7.82$, 1H, H-C(1^I)), 4.49-4.40 (m, 6H, H-C(6a^{I-V}), 6a^{VI}), 2-O-CH₃, O-CH₂-), 3.75-3.61 (m, 2H, arom.O-CH₂-), 2.2-1.83 (m, 59H, 19 -COCH₃, -C-CH₂-C). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3 , assignation basée sur une expérience HSQC) 170.779-169.533 (m, 19 acétyles), 166.146 (2COOMe), 159.053 (-O-C(5)arom.), 131.888 (arom.C(1, 3)-COOMe), 123.110 (C(2)arom.), 119.813 (C(4, 5)arom.), 100.491 (C1^I), 95.813-95.730 (m, C(1^{II, III, IV, V, VI})), 75.404 (C(3^I)), 73.938, 73.596, 73.436, 73.384, 72.487, 72.318, 72.256, 71.818, 71.720, 70.584, 70.528, 70.151, 69.462, 69.053, 68.556, 68.063 (C(4^{IV})), 66.344, 64.915, 63.017, 62.639, 62.582, 62.471, 62.289, 61.480, 52.478 (arom.O-C), 29.367 (arom.O-C-C-C), 20.961-20.586 (m, 19 -COOCH₃). HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{87}\text{H}_{114}\text{NaO}_{55}$ [$M+\text{Na}$]⁺ = 2061.6016; valeur obtenue 2061.5926.; analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{87}\text{H}_{114}\text{O}_{55}$: C 51.23, H 5.63; valeurs obtenues: C 50.61, H 5.67.

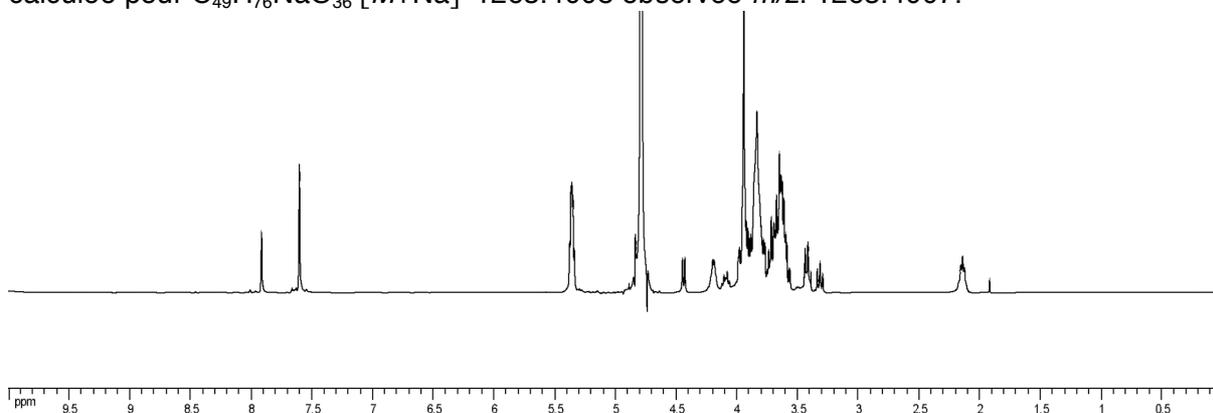


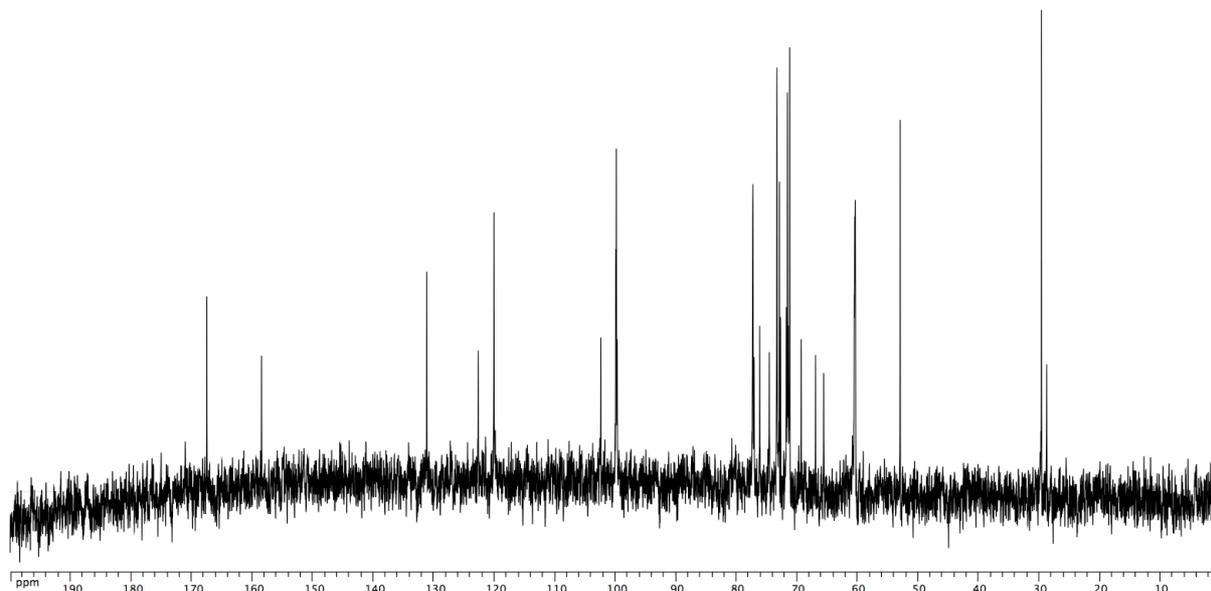


Synthèse du dimethyl 5-(3-(α -D-glucopyranosyl-[(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl]₄-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyloxy)propoxy) isophtalate **10:**

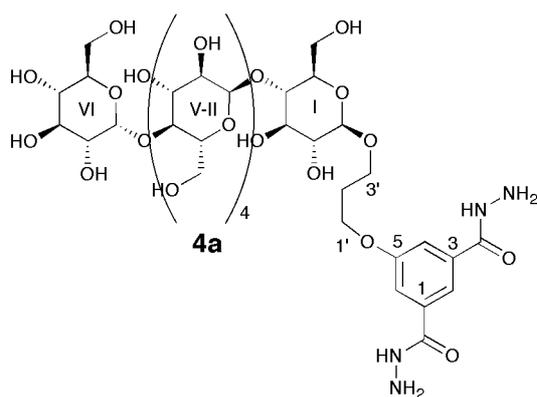


Le diester protégé **9** (835 mg, 0.41 mmol) est dissous dans du méthanol sec (60 ml) contenant du KCN (60 mg). La réaction est agitée à température ambiante pendant 24 h. La réaction est ensuite concentrée et adsorbée sur silice. Le produit brut adsorbé sur la silice est ensuite chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75/50/12). R_f (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 75/50/12) pour donner **10** (341 mg, 67%) sous la forme d'un solide blanc. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 7.66 (s, 1H, H-C(2)), 7.51 (s, 2H, H-C(4, 6)), 5.41 (s, 5H, H-C(1^{II, III, IV, V, VI})), 4.48 (d, J= 8, 1H, H-C(1^I)), 4.29 (t, J= 6, 2H), 4.15-4.07 (m, 1H), 4.02-3.49 (m, 41H), 3.43 (t, J= 9, 1H), 3.31 (t, J= 9, 1H), 2.20-2.11 (m, 2H, H-C(2')). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 168.171 (-COOMe), 159.103 (C(5)), 131.83 (C(1, 3)), 123.333 (C(2)), 120.734 (C(4, 6)), 103.086 (C(1^I)), 100.671-100.342 (m, C(1^{II, III, IV, V, VI})), 77.976, 77.748, 75.256, 73.976, 73.580, 73.374, 72.452, 72.246, 72.116, 71.888, 69.960, 67.598, 66.264, 61.135-61.029 (m), 53.652 (2-COOCH₃), 29.412 (C(2')). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₄₉H₇₆NaO₃₆ [M+Na]⁺ 1263.4008 observée m/z: 1263.4007.





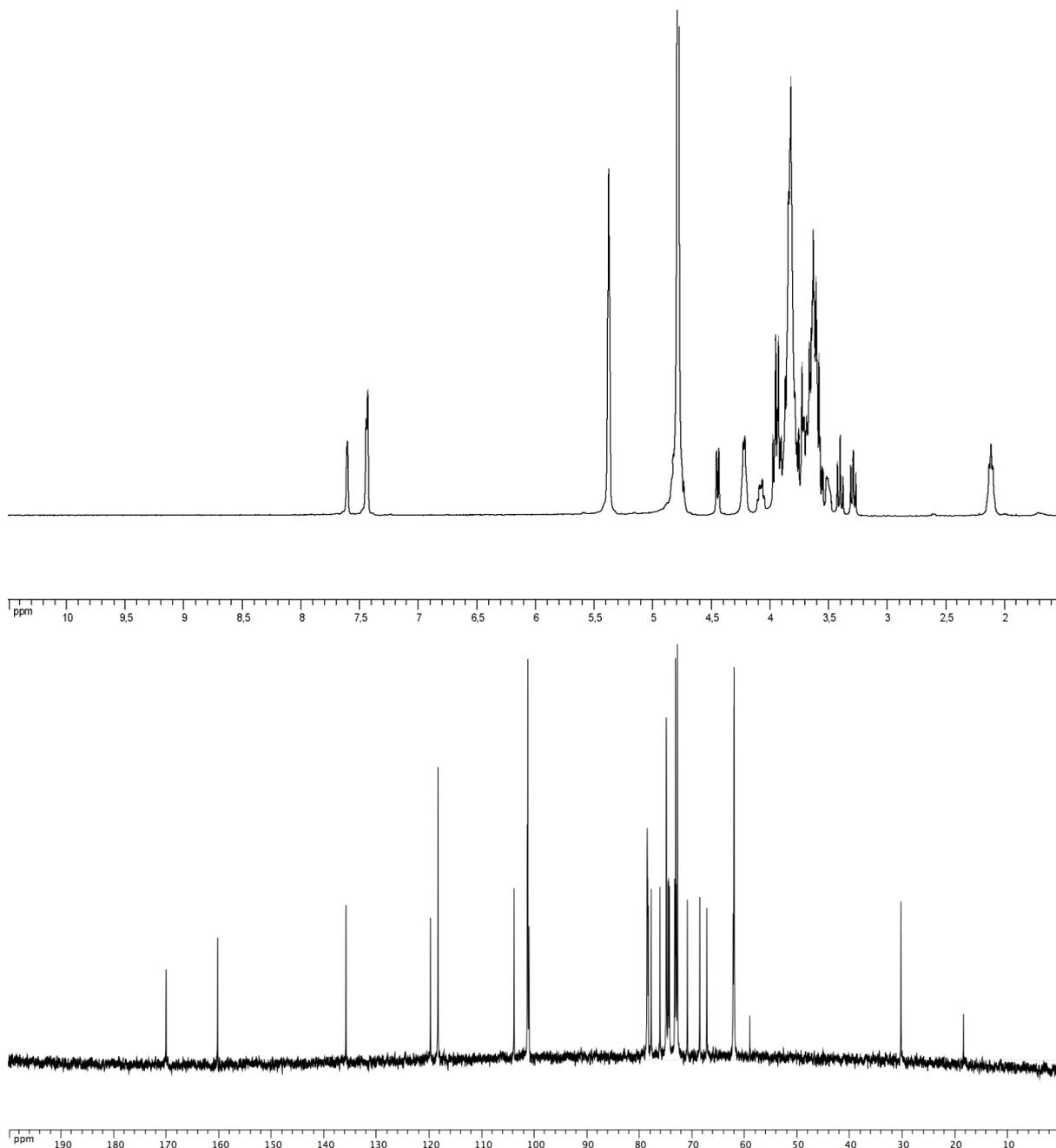
Synthèse du 5-(3-(α -D-glucopyranosyl-[(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl]₄-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyloxy)propoxy) isophtalic acid dihydrazide **4a:**



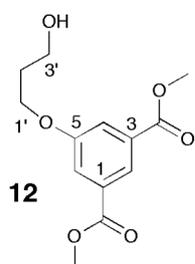
Le diester déprotégé **10** est dissous dans du MeOH sec (45 ml). De l'hydrazine hydratée (1.5 ml) est ajoutée en excès à cette solution qui est ensuite agitée à température ambiante pendant 6 h. Après concentration sous pression réduite le résidu est dissous dans 2 ml d'eau. Cette solution est ajoutée goutte-à-goutte à 200 ml d'éthanol absolu agité vigoureusement. Le précipité blanc ainsi obtenu est filtré puis lyophilisé pour donner (234 mg, 68%) sous la forme d'une mousse blanche. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) : 7.61 (s, 1H, H-C(2)), 7.43 (s, 2H, H-C(4, 6)), 5.38 (s, 5H, H-C(1^{II}, 1^{III}, 1^{IV}, 1^V, 1^{VI})), 4.45 (d, J= 8, 1H, H-C(1^I)), 4.27-

4.18 (m, 2H, H-C(1^I')), 4.13-4.03 (m, 1H), 4.00-3.46 (m, 35H), 3.4 (t, J= 9.2, 1H), 3.29 (t, J= 9.2, 1H), 2.16-2.07 (m, 2H, H-C(2^I')). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O) 170.08 (-COONH), 160.29 (C(5)), 135.87 (C(1, 3)), 119.79 (C(2)), 118.37 (C(4, 6)), 103.90 (C1^I), 101.37-101.05 (m, C1^{II}, 1^{III}, 1^{IV}, 1^V, 1^{VI}), 78.58, 78.46, 78.34, 77.80, 76.13, 74.93, 74.60, 74.48, 74.32, 73.35, 73.15, 73.05, 72.80, 70.92, 68.57, 67.22, 62.22-62.02 (m), 59.03, 18.40 (C(2^I')). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₄₇H₇₇N₄O₃₄ [M+H]⁺ 1241.4414 observée m/z: 1241.4399.

Partie Expérimentale
Chapitre III: Section Expérimentale



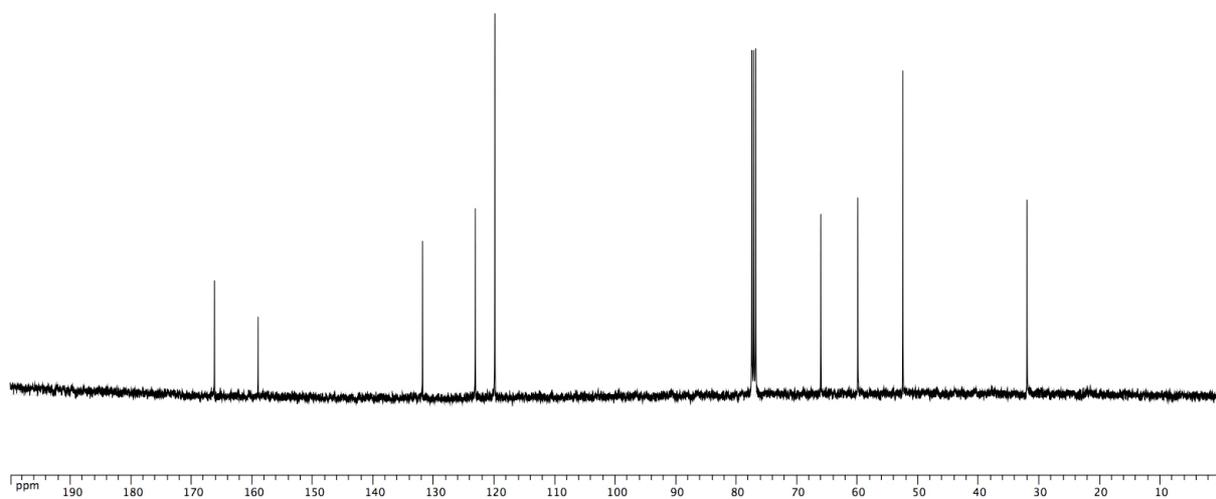
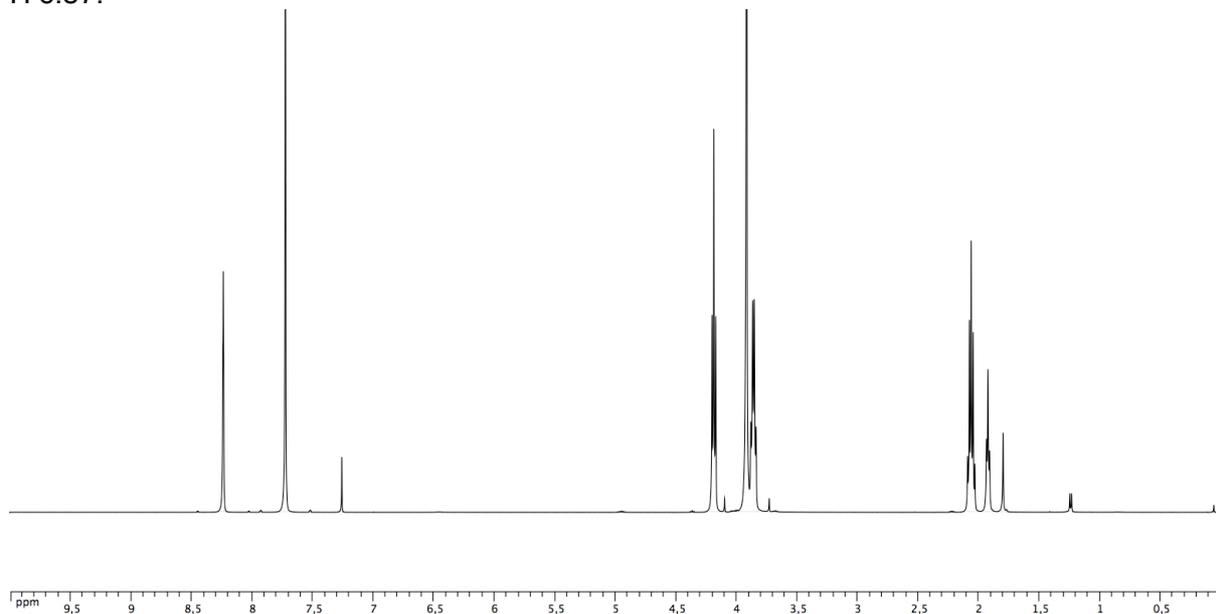
Synthèse du diméthyl 5-(3-hydroxypropoxy)isophtalate 12:



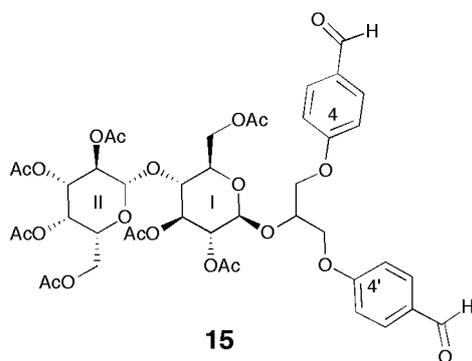
Le phénol 5-hydroxyisophtalate de diméthyle **11** (10.5 g, 50 mmol), la triphénylphosphine (13.5 g, 50 mmol) et le 1,3-propane diol (3.95 g, 3.75 ml, 50 mmol) sont dissous dans du THF sec (100 ml). La solution est refroidie à 0°C par un bain de glace et mise sous atmosphère d'azote avant l'addition goutte-à-goutte du diisopropylazodicarboxylate DIAD (10.27 g, 10 ml, 50 mmol). La réaction est ensuite réchauffée à température ambiante et agitée pendant 12 h. L'évaporation du solvant suivie de deux chromatographies sur gel de silice consécutives (CH₂Cl₂/Et₂O 1/0→4/1) fournissent le produit sous la forme de cristaux incolores (9 g, 67%). R_f (CH₂Cl₂/Et₂O 4/1) 0.4. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 8.24 (s, 1H, H-C(2)), 7.68 (d, J=1.3, 2H, H-C(4)), 4.19 (t, J=6, 1H, H-C(1')), 3.92 (s, 2-COOMe, 6H), 3.86 (dd, J=12.8, 6, 2H, H-C(3')), 2.12-2.00 (m, 2H, H-C(2')), 1.92 (t, J=5.12, 1H, -OH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 166.24 (-COOMe), 159.03 (C(5)), 131.86 (C(1, 3)), 123.16 (C(2)), 119.92 (C(4, 6)), 66.06 (C(1')),

Partie Expérimentale
Chapitre III: Section Expérimentale

59.96 (C(3')), 52.53 (2-COOCH₃), 32.02 (C(2')). ESI-MS(pos.): m/z : 291.045 [M+Na]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₁₃H₁₆O₆: C 58.2, H 6.01; valeurs obtenues: C 58.45, H 6.57.

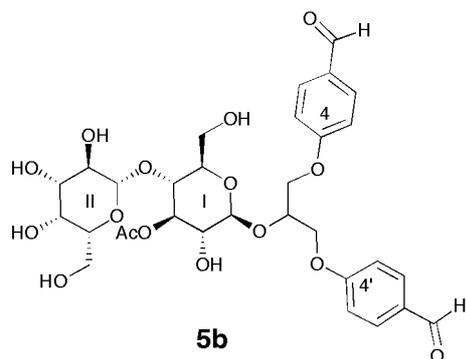


Synthèse du 4,4'-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4))-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)propane-1, 3-diyl)bis(oxy)dibenzaldehyde **15**:



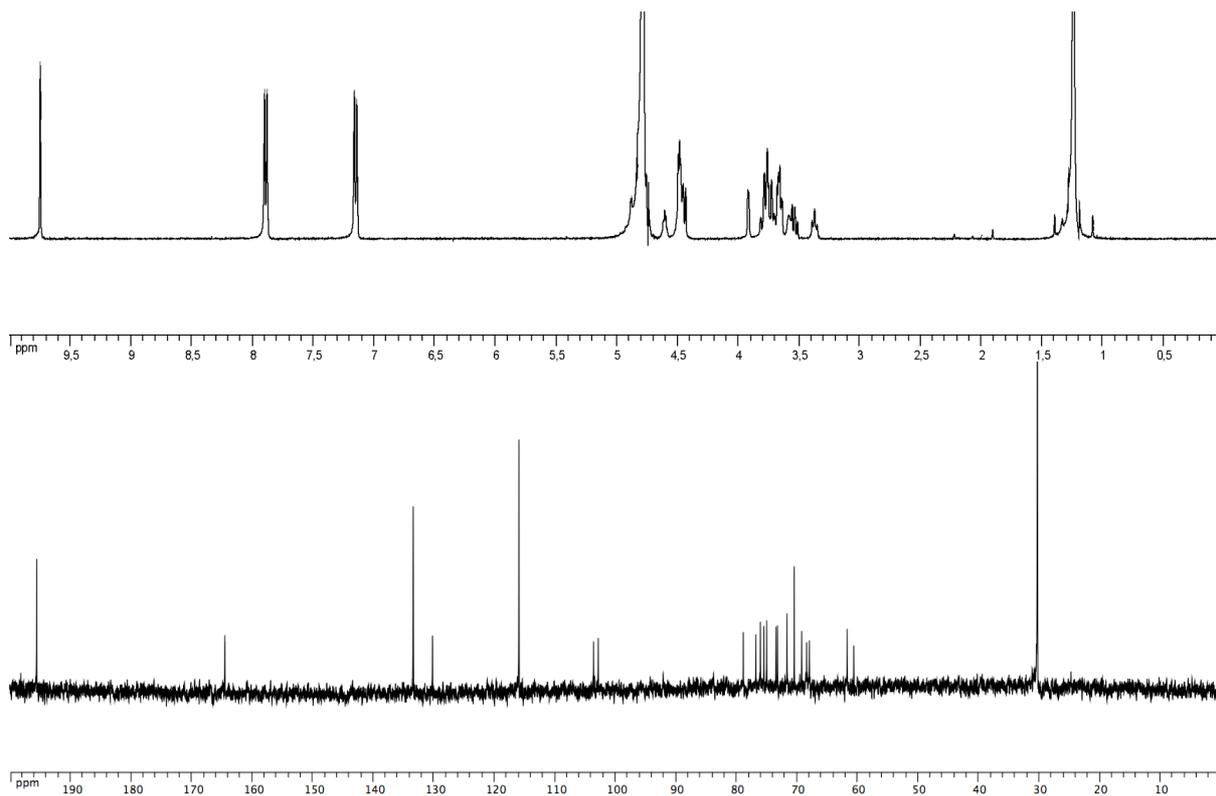
L'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3 ml, 27 mmol) est ajouté goutte-à-goutte à une solution de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-1,2,3,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **14**³ (3.8 g, 5.8 mmol) et l'alcool 4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)bis(oxy)dibenzaldehyde **18** (3.8 g, 11.6 mmol) dans du CH_2Cl_2 sec (225 ml). Cette solution rouge vif est ensuite mise sous reflux pendant 6 h sous atmosphère d'azote. Après refroidissement, la solution est diluée par du CH_2Cl_2 puis lavée à l'eau et à la saumure. La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner le produit brut. Une chromatographie sur gel de silice (toluène/acétone 9/1 \rightarrow 4/1) fournit majoritairement un mélange (2.53 g) du produit désiré et d'une petite quantité de *O*-(2,3,4,6-tetra-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-acetyl- α -D-glucopyranoside qui n'a pas réagi. Cette impureté est très difficile à éliminer à ce stade c'est pourquoi ce mélange est directement utilisé pour la déprotection. R_f (Toluène/Acétone 4/1) 0.17

Synthèse du 4,4'-(2-(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4))- β -D-glucopyranosyloxy)propane-1,3-diyl)bis(oxy)dibenzaldehyde **5b**:

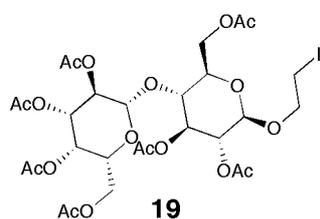


Le produit **15** impur précédemment obtenu est dissous dans un mélange méthanol/triéthylamine/eau 56 ml/8 ml/24 ml puis agité à température ambiante toute une nuit. Après évaporation des solvants sous pression réduite le produit brut est chromatographié sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 80/40/5) puis cristallisé dans un mélange $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$. Ce produit peut également être cristallisé à partir d'une solution aqueuse (65 mg dans 1 ml) pour fournir de fines aiguilles incolores (400 mg, 13% sur deux étapes). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 80/40/5) 0.17. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O) 9.75 (s, 2H, protons aldéhydes), 7.89 (d, $J = 8\text{Hz}$, 4H, C(2, 2')), 7.15 (d, $J = 8\text{Hz}$, 4H, C(3, 3')), 4.64-4.56 (m, 1H), 4.54-4.40 (m, 5H), 3.94-3.90 (m, 1H), 3.85-3.49 (m, 11H), 3.37 (t, $J = 8\text{Hz}$, 1H). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, D_2O) 195.62 (-CHO), 164.52 (C(4, 4')), 133.40 (C(2, 2')), 130.22 (C(1, 1')), 115.94 (C(3, 3')), 103.61, 102.84, 78.89, 76.82, 76.06, 75.46, 75.01, 73.49, 73.22, 71.65, 69.25, 68.41, 67.97, 61.72, 60.63. HR-ESI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{LiO}_{15}$ $[M+\text{Li}]^+$ 631.2209 observée m/z : 631.2143.

³ Synthesis of Deoxy and Acylamino Derivatives of Lactose and use of these for Probing the Active Site of *Neisseria Meningitidis* *N*-acetylglucosaminyltransferase. U. Westerlind, P. Hagback, B. Tidbäck, L. Wiik, O. Blixt, N. Razi, T. Norberg. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 221-223.



Synthèse du 2-iodoethyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **19**:

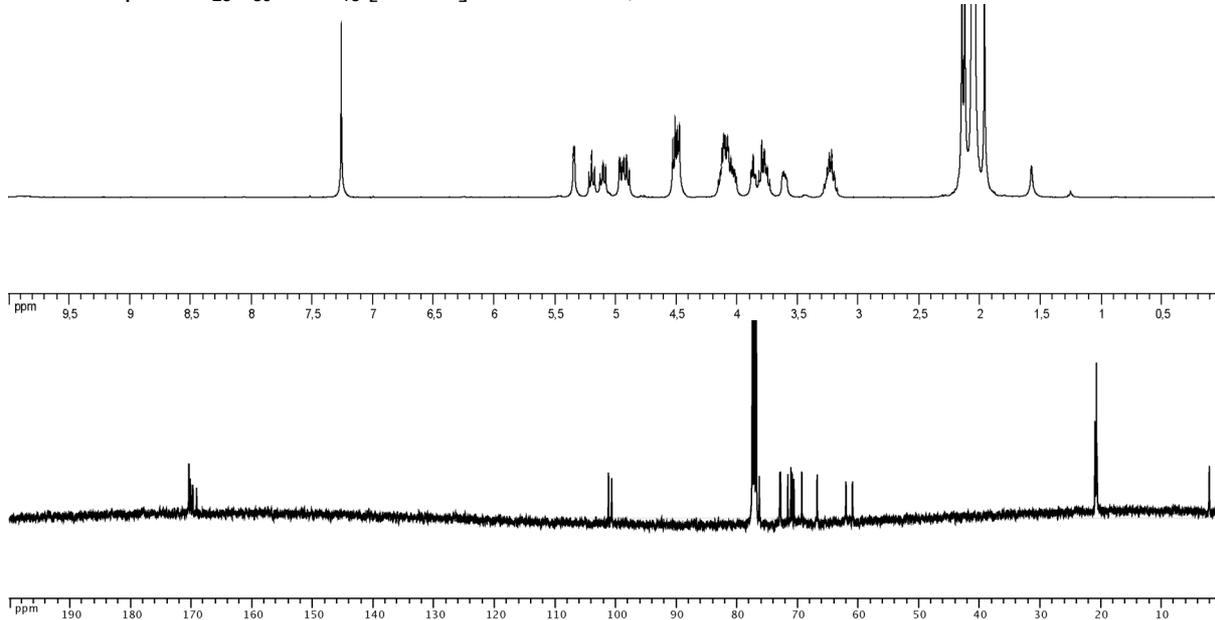


Ce composé a été préparé en adaptant des procédures décrites dans la littérature. Le (2,3,4,6-tetra-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-acetyl- β -D-glucopyranoside **14** (18.51 g, 27.2 mmol) est dissous dans du THF anhydre (170 ml). De la benzylamine (4.6 ml, 4.51 g, 42.1 mmol) est ensuite ajoutée à cette solution qui est agitée à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 72 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée successivement par une solution d'HCl 1N, une solution saturée en NaHCO₃, puis de la saumure. Après séchage sur MgSO₄, la phase organique est filtrée puis concentrée sous vide pour donner le 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-D-glucopyranoside. Ce produit est directement transformé en trichloroacetimidate par traitement par la trichloroacetonitrile (34 ml) dans le CH₂Cl₂ (90 ml) en présence d'une quantité catalytique de DBU (9 gouttes, 168 mg). Après 3 h à température ambiante les solvants sont évaporés pour donner produit brut. Après chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 1/0 \rightarrow 4/1) on isole le trichloroacetimidate de 2,3,4,6-tetra-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tetra-acetyl- β -D-glucopyranoside⁴ (15.92 g, 20.3 mmol). Ce donneur de glycosyl est ensuite dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (50 ml). Du 2-bromoethanol (4.3 ml, 7.63g, 61 mmol) tamis moléculaire 4Å (4 g) est ajouté à cette solution qui est ensuite refroidie puis agitée à -20°C pendant 30 min. L'acide de Lewis BF₃*OEt₂ (2.85 g, 2.25 ml, 20.03 mmol) est alors ajouté goutte-à-goutte. La réaction est ensuite réchauffée lentement jusqu'à une température de 0°C sur une période de 3 h, moment auquel 3 ml de pyridine sont ajoutés à la réaction pour neutraliser l'acide de Lewis. Après filtration et dilution par du CH₂Cl₂ on obtient une solution du produit brut qui est lavée par une solution de HCl

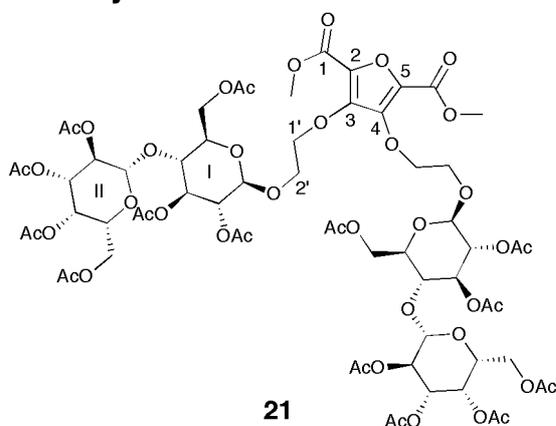
⁴ Synthesis of galactosyl and lactosyl derivatives as potential anti-metastasis compounds. H. Li, Q. Li, M.-S. Cai, Z.-J. Li. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 611-615.

Partie Expérimentale
Chapitre III: Section Expérimentale

1N, une solution saturée de NaHCO₃, et de la saumure. La phase organique est concentrée sous pression réduite après séchage sur MgSO₄ et filtration. Le produit brut est ensuite chromatographié sur gel de silice pour donner le 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside de 2-bromoéthyle⁵ (10.32 g, 0.0138 mmol, 68%). On transforme alors ce bromure en iodure par une réaction d'échange dans l'acétone (140 ml) contenant du NaI (3.12 g, 20mmol) à reflux pendant 6h. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite le produit brut est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 9/1→4/1) pour donner le produit **19** sous la forme d'une mousse blanche (6.3 g, 57%) R_f 0.17 (CH₂Cl₂). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 5.37-5.31 (*m*, 1H), 5.20 (*t*, J=9, 1H), 5.11 (*dd*, J= 9, 8, 1H), 4.99-4.87 (*m*, 2H), 4.57-4.44 (*m*, 3H), 4.17-3.99 (*m*, 4H), 3.90-3.71 (*m*, 3H), 3.65-3.57 (*m*, 1H), 3.34-3.13 (*m*, 2H), 2.15 (*s*, 3H), 2.12 (*s*, 3H), 2.07 (*s*, 3H), 2.06 (*s*, 3H), 2.04 (*s*, 4H), 1.96 (*s*, 3H). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 170.43, 170.21, 170.13, 169.79, 169.72, 169.15, 101.21, 100.68, 76.33, 72.95, 72.82, 71.63, 71.12, 70.90, 70.62, 69.32, 69.79, 62.03, 60.97, 20.96, 20.89, 20.72, 20.59. 2.09 (C(2)). HRMS *m/z* calculée pour C₂₈H₃₉I NaO₁₈ [M+Na]⁺= 813.1073; valeur obtenue 813.1053.



Synthèse du 3,4-bis-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)-ethoxy)-furan-2,5-dicarboxylic acid dimethyl ester **21:**



Le 3,4-dihydroxy-furan-2,5-dicarboxylate de diméthyle **20** a été préparé selon une procédure décrite dans la littérature.⁶

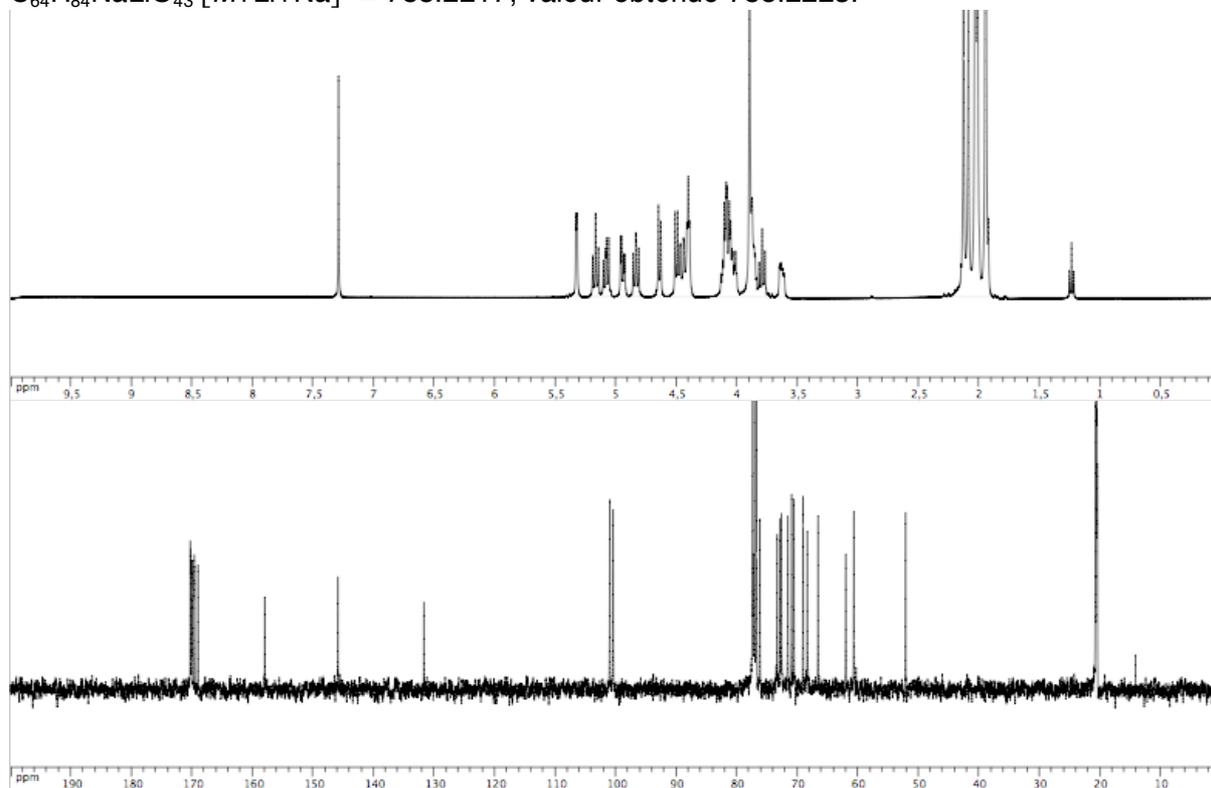
L'iodure **19** (1.828 g, 2.3 mmol), l'éther couronne "18-crown-6" (489 mg, 1.84 mmol), et du K₂CO₃ (387 mg, 2.8 mmol) sont ajoutés à une solution de 3,4-dihydroxy-furan-2,5-dicarboxylate de diméthyle **20** (200 mg, 0.92 mmol) dans de la DMF anhydre (8 ml). Après avoir été mise sous atmosphère d'azote la réaction est chauffée et agitée à 40°C pendant 48 h. La suspension est ensuite diluée dans de

⁵ Glycomethanethiosulfonates: powerful reagents for protein glycosylation. B. G. Davis, M. A. T. Maughan, M. P. Green, A. Ullman, J. B. Jones. *Tetrahedron. Asym.* **2000**, 11, 245-262.

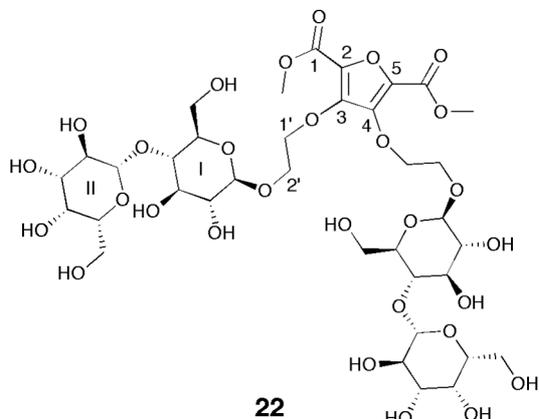
⁶ cf. Chapitre III: Glycopolymères Dynamiques référence 25 page 113.

Partie Expérimentale
Chapitre III: Section Expérimentale

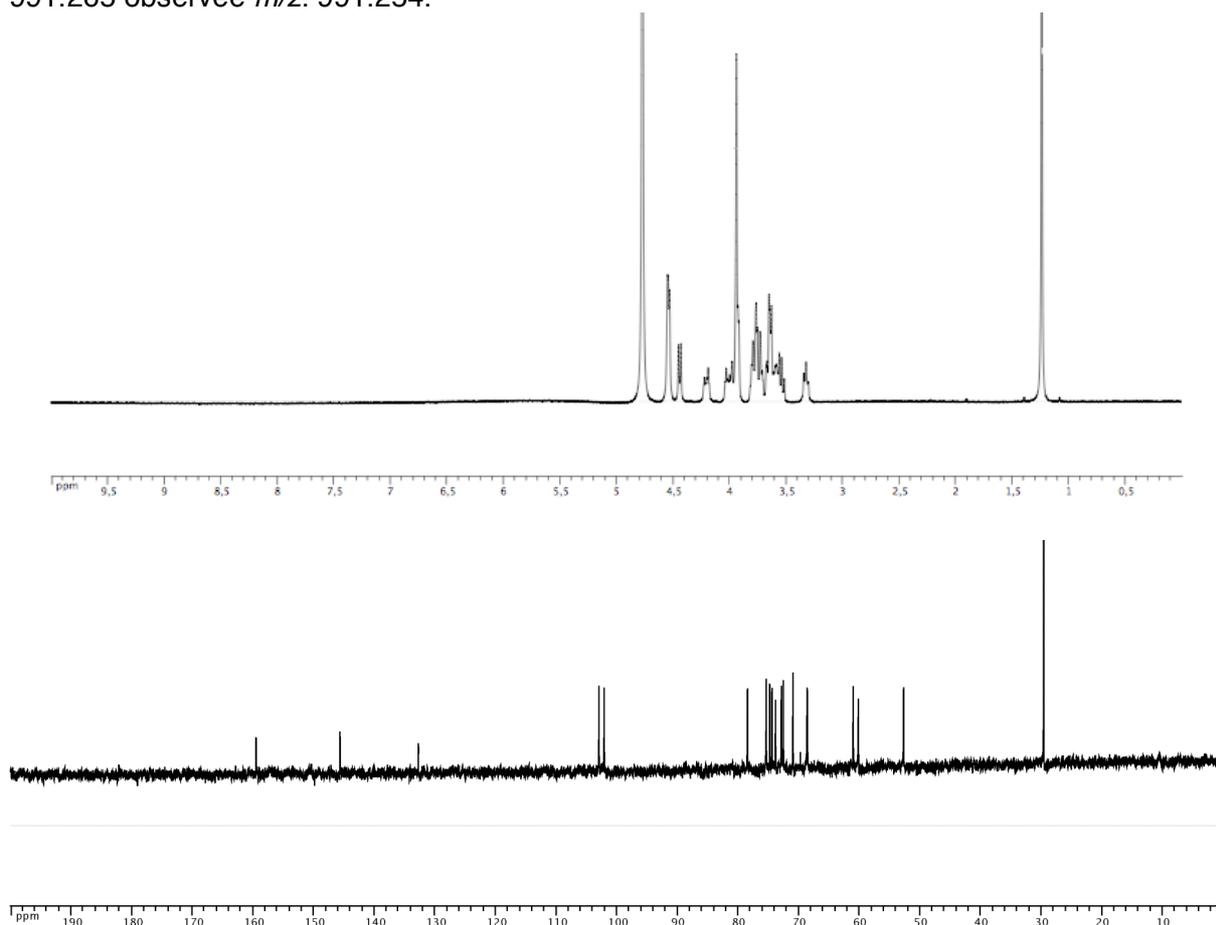
l'AcOEt. La phase organique est lavée trois fois par de l'eau, de la saumure puis séchée sur MgSO₄. Après filtration et évaporation sous pression réduite on obtient de produit brut qui est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 3/2) pour donner le produit voulu sous la forme d'un solide incolore (1.116 g, 79%). R_f (CH₂Cl₂/AcOEt 3/2) 0.21. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, assignation basée sur une expérience COSY): 5.32 (*d*, J=3.27, 2H, H-C(4^I)), 5.167 (*t*, J=9.30, 2H, H-C(3^{II})), 5.080 (*dd*, J=7.878, 10.36, 2H, H-C(2^I)), 4.943 (*dd*, J= 3.44, 10.426, 2H, H-C(3^I)), 4.833 (*dd*, J= 7.93, 9.452, 2H, H-C(2^{II})), 4.639 (*d*, J= 7.933, 2H, H-C(1^{II})), 4.500 (*d*, J= 8, 2H, H-C(1^I)), 4.468-4.436 (*m*, 2H, H-C(6a^{II})), 4.402 (*t*, J= 4.544, 4H, H₂C-Oarom.), 4.18-3.97 (*m*, 8H, H-C(6b^{II})), H₂C-O-C(1^I)), 3.896 (*s*, 6H, 2-COOCH₃), 3.93-3.82 (*m*, 4H, H-C(6a^{II}), H-C(5^I)), 3.792 (*t*, J=9.268, 2H, H-C(4^{II})), 3.650-3.608 (*m*, 2H, H-C(5^{II})), 2.128 (*s*, 6H, acétyle), 2.088 (*s*, 6H, acétyle), 2.036 (*s*, 6H, acétyle) 2.026 (*s*, 6H, acétyle), 2.012 (*s*, 6H, acétyle), 1.950 (*s*, 6H, acétyle), 1.942 (*s*, 6H, acétyle). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 170.36, 170.32, 170.15, 170.05, 169.71, 169.66, 169.10 (7-OOCMe), 158.07 (2COOMe), 145.99 (2-O-C(3, 4)), 131.76 (C(2, 5)), 101.07 (C(1^I)), 100.53 (C(1^{II})), 76.28 (C(4^{II})), 73.43 (arom.O-CH₂CH₂-O), 72.94 (C(3^{II})), 72.71 (C(5^{II})), 71.67 (C(2^{II})), 71.03 (C(3^I)), 70.66 (C(5^I)), 69.15 (C(2^I)), 68.44 (arom.O-CH₂CH₂-O), 66.65 (C(4^I)), 62.08 (C(6^{II})), 60.75 (C(6^I)), 52.21 (arom.-COOCH₃), 20.766, 20.738, 20.578, 20.519, 20.458 (acétyles). HRMS *m/z* calculée pour C₆₄H₈₄NaLiO₄₃ [M+Li+Na]²⁺ = 785.2217; valeur obtenue 785.2223.



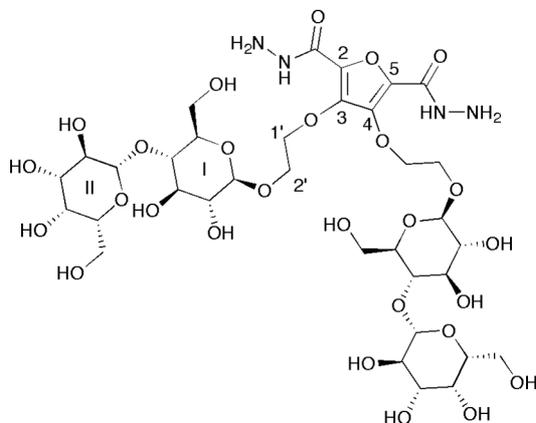
Synthèse du 3,4-bis-(2-(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyloxy)-ethoxy)-furan-2,5-dicarboxylic acid dimethyl ester 22:



Le produit protégé **21** (1.116 g, 0.72 mmol) est dissous dans du méthanol sec (100 ml). Du cyanure de potassium (100 mg) est ajouté à cette solution sous atmosphère d'azote. La réaction est agitée pendant 4 jours à température ambiante. Un précipité blanc se forme progressivement. On filtre la réaction pour isoler ce solide blanc qui est lavé trois fois par du méthanol pour donner le produit voulu sous la forme d'une poudre blanche (530 mg, 77%). Si nécessaire, ce produit peut être recristallisé dans un mélange méthanol/eau. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 4.60-4.49 (*m*, 6H, 4 H-C(1')), 4.44 (*d*, *J*=8, 2H), 4.26-4.15 (*m*, 2H, 2 H-C(2)), 4.07-3.87 (*m*, 12H, 2 H-C(2'), 2 H₃COO-), 3.85-3.49 (*m*, 18H), 3.37-3.28 (*m*, 2H). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 159.90 (C(1)), 146.06 (C(3, 4)), 133.13 (C(2, 5)), 103.35, 102.49, 78.85, 75.77, 75.18, 74.81, 74.24, 73.26, 72.93, 71.36, 69.02, 68.95, 61.43, 60.57, 53.10 (-COOCH₃). HR-ESI-MS(pos.): calculée pour C₃₆H₅₆KO₂₉ [*M*+K]⁺ 991.265 observée *m/z*: 991.254.

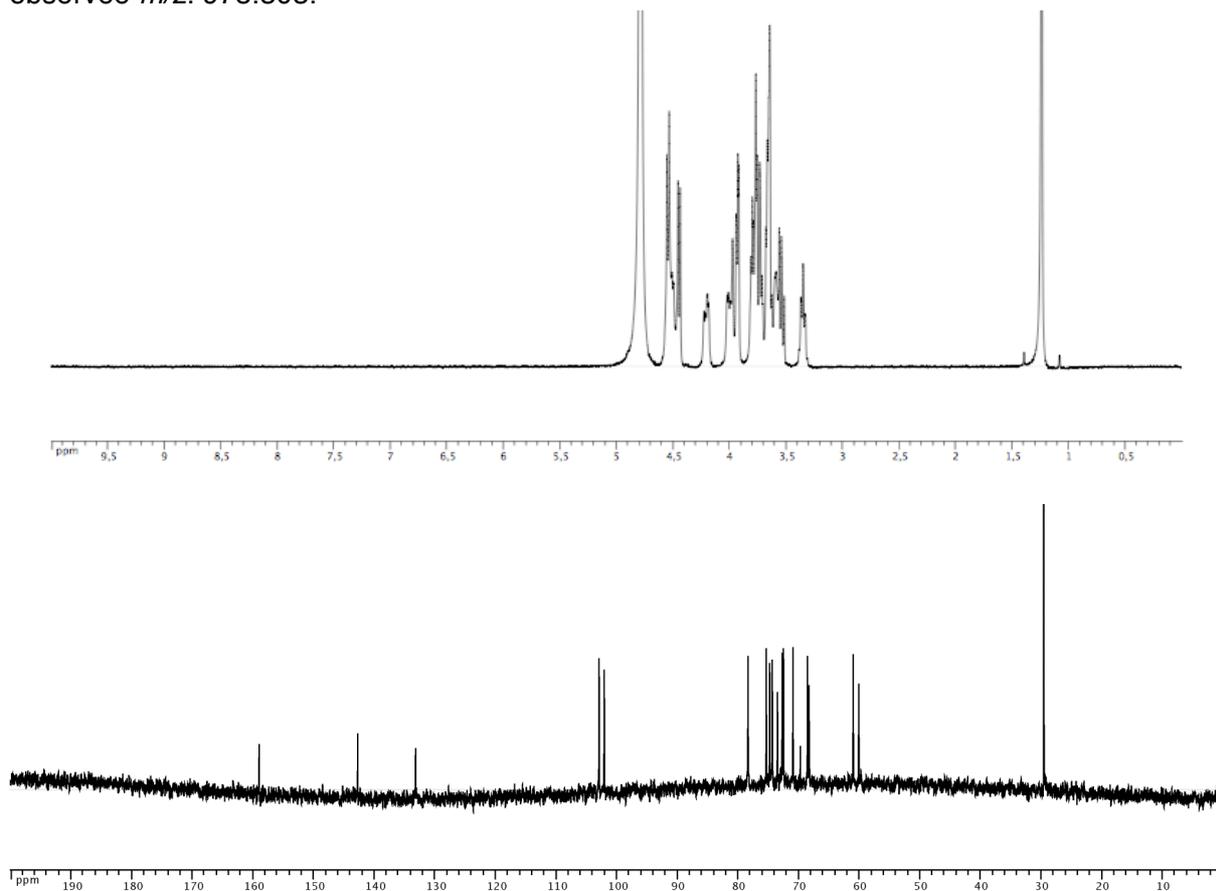


Synthèse du 3,4-bis-(2-(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyloxy)-ethoxy)-furan-2,5-dicarboxylic acid dihydrazide **4b:**

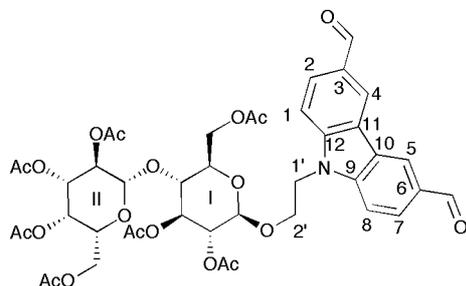


Le diester **22** (530 mg, 0.55 mmol) est dissous dans un mélange MeOH/H₂O 1/1 (75 ml). De l'hydrate d'hydrazine (2.5 ml) est ajouté à cette solution sous atmosphère d'azote. Après 6 heures d'agitation à température ambiante les solvants sont évaporés sous pression réduite jusqu'à un volume de 2 ml environ. Cette solution de produit brut est ajoutée goutte-à-goutte à un grand volume d'éthanol absolu (200 ml) en maintenant une forte agitation. Cela permet de précipiter le dihydrazide **4b** sous la forme d'un solide blanc qui est ensuite séché sous vide puis lyophilisé (386 mg, 74%) sous la forme d'un

solide blanc. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 4.55 (*d*, *J*= 8, 2H), 4.54-4.45 (*m*, 4H, 4 H-C(1')), 4.45 (*d*, *J*=8, 2H), 4.28-4.14 (*m*, 2H, 2 H-C(2')), 4.08-3.87 (*m*, 6H, 2 H-C(2')), 3.86-3.48 (*m*, 18H), 3.40-3.30 (*m*, 2H). ¹³C (100 MHz, D₂O) 159.70 (-CONHNH₂), 143.44 (C(3, 4)), 133.90 (C(2,5)), 103.64, 102.79, 79.08, 76.07, 75.49, 75.07, 74.22, 73.44, 73.23, 71.66, 69.25, 69.01, 61.72, 60.81. HR-MALDI-MS(pos.): calculée pour C₃₄H₅₆N₄NaO₂₇ [*M*+Na]⁺ 975.302 observée *m/z*: 975.303.



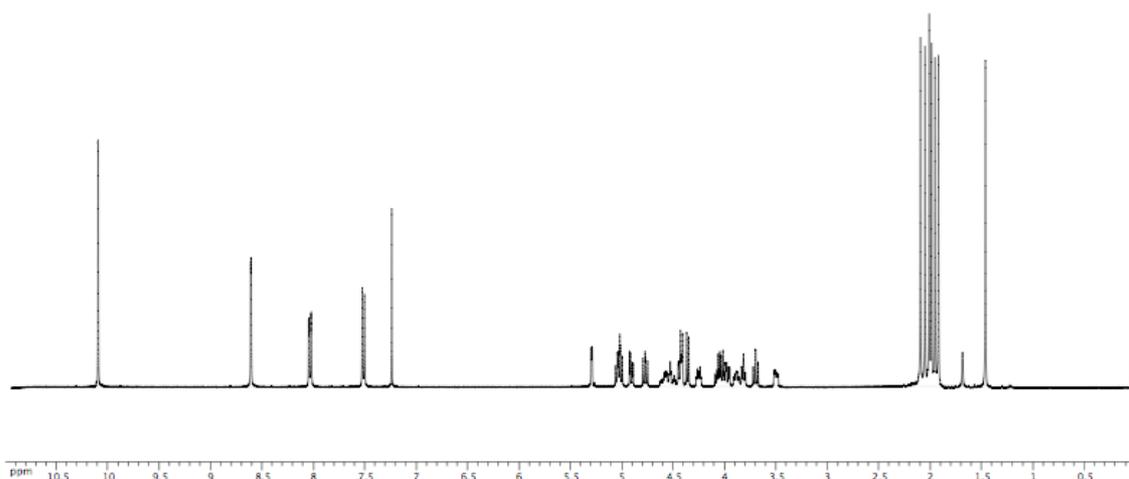
Synthèse du 9-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-ethyl)-9*H*-carbazole-3,6-dicarbaldehyde 24:



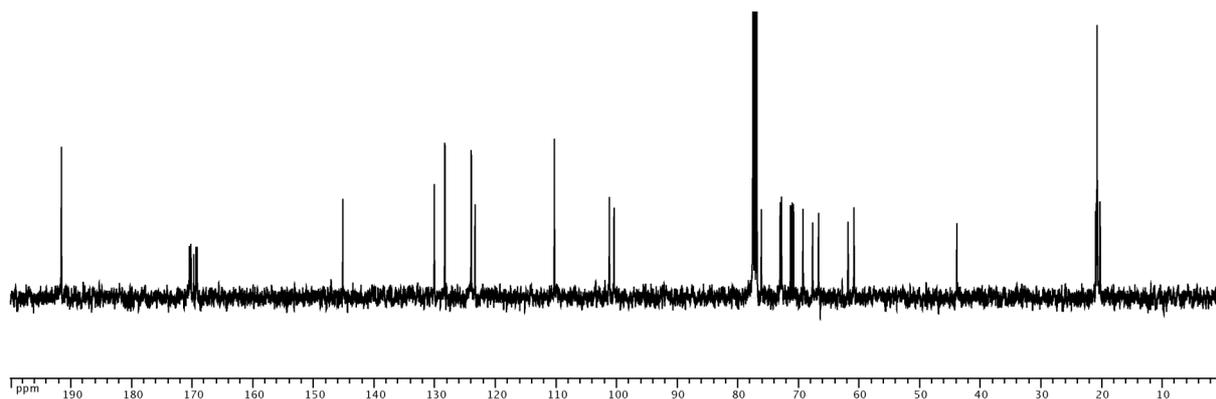
24

L'iodure **19** (645 mg, 0.817 mmol), l'éther couronne 18-crown-6 (72 mg, 0.272 mmol), et du K_2CO_3 (113 mg, 0.817 mmol) sont ajoutés à une solution de carbazole-3,6-dicarbaldehyde⁷ (121 mg, 0.545 mmol) dans de la DMF sèche (4 ml). Après avoir été mise sous atmosphère d'azote la réaction est chauffée et agitée à 45°C pendant 20 heures. La suspension est ensuite diluée dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée par trois fois par de l'eau, de la saumure puis séchée sur $MgSO_4$. Après filtration

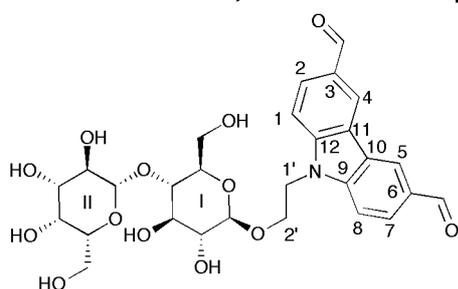
et évaporation sous pression réduite on obtient de produit brut qui est chromatographié sur gel de silice (CH_2Cl_2 /AcOEt 3/2) pour donner le produit voulu sous la forme d'un solide légèrement jaune (290 mg, 60%). R_f (CH_2Cl_2 /AcOEt 3/2) 0.28. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$, assignation basée sur une expérience COSY) : 10.148 (s, 2H, 2-COH), 8.66 (d, $J=1.6$, 2H, H-C(4, 5)), 8.08 (dd, $J=1.6, 8.5$, 2H, H-C(2, 7)), 7.56 (d, $J=8.5$, 2H, H-C(1, 8)), 5.35 (dd, $J=3.4, 0.9$, 1H, H-C(4^I)), 5.013-5.02 (m, 2H, H-C(2^I, 3^I)), 4.96 (dd, $J=10.4, 3.4$, 1H, H-C(3^I)), 4.82 (dd, $J=10.4, 7.9$, 1H, H-C(2^I)), 4.7-4.52 (m, 2H, H_2C H_2C -Narom.), 4.49 (dd, $J=12, 2.2$, 1H, H-C(6a^I)), 4.47 (d, $J=7.5$, 1H, H-C(1^I)), 4.41 (d, 1H, H-C(1^{II})), 4.35-4.26 (m, 1H, H_2CH_2C -O), 4.17-3.99 (m, 3H, H-C(6b^I, 6a^{II}, 6b^{II})), 3.97-3.90 (m, 1H, H_2CH_2C -O), 3.87 (t, $J=13.9$, 1H, H-C(5^I)), 3.75 (t, $J=19.1$, 1H, H-C(4^{II})), 3.61-3.50 (m, 1H, H-C(5^I)), 2.147 (s, 3H, acétyle), 2.103 (s, 3H, acétyle), 2.062 (s, 3H, acétyle), 2.040 (s, 3H, acétyle), 2.005 (s, 3H, acétyle), 1.972 (s, 3H, acétyle), 1.739 (s, 3H, acétyle). ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$ assignation basée sur une expérience HSQC) 191.53 (2 $-CHO$), 170.42, 170.31, 170.19, 170.13, 169.69, 169.32, 169.14 (7- $OOCH_3$), 145.12 (C(9, 12)), 130.03 (C(3, 6)), 128.29 (C(2, 7)), 123.93 (C(4, 5)), 123.31 (C(10, 11)), 110.22 (C(1, 8)), 101.16 (C(1^I)), 100.38 (C(1^{II})), 76.09 (C(4^{II})), 72.98 (C(5^{II})), 72.77 (C(3^{II})), 71.28 (C(2^{II})), 71.02 (C(3^I)), 70.79 (C(5^I)), 69.23 (C(2^I)), 67.63 (O- CH_2CH_2 -N), 66.66 (C(4^I)), 61.79 (C(6^I)), 60.81 (C(6^{II})), 43.85 (O- CH_2CH_2 -N), 20.94, 20.81, 20.72, 20.59, 20.21 (7- $COCH_3$). HRMS m/z calculée pour $C_{42}H_{47}NNaO_{20}$ [$M+Na$]⁺ = 908.2584; valeur obtenue 908.2534.



⁷ cf. Chapitre III: Glycopolymères Dynamiques référence 26 page 113.



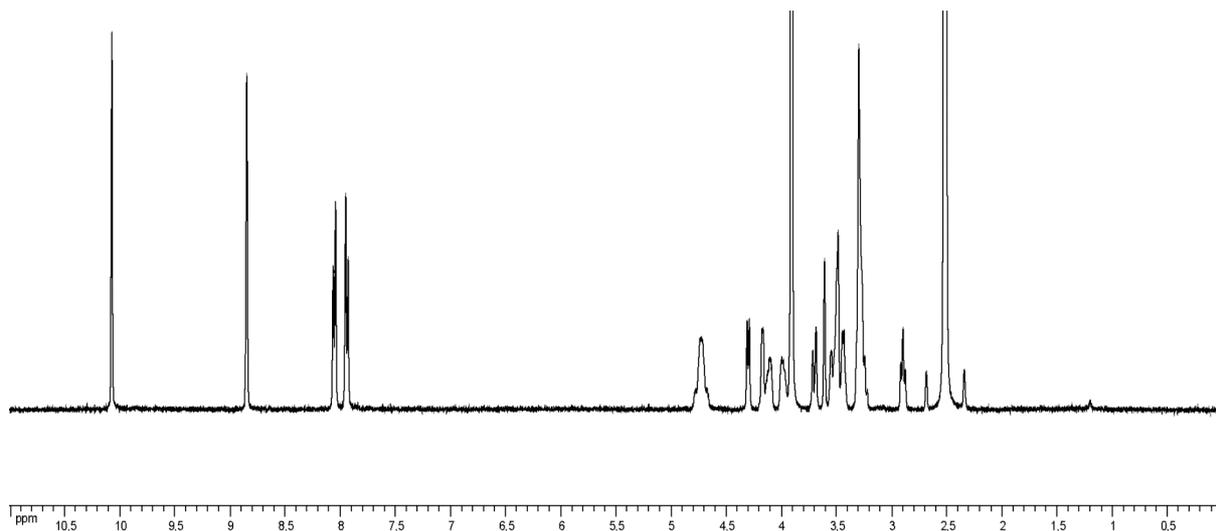
Synthèse du 9-(2-(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyloxy)-ethyl)-9H-carbazole-3,6-dicarbaldehyde 5a:

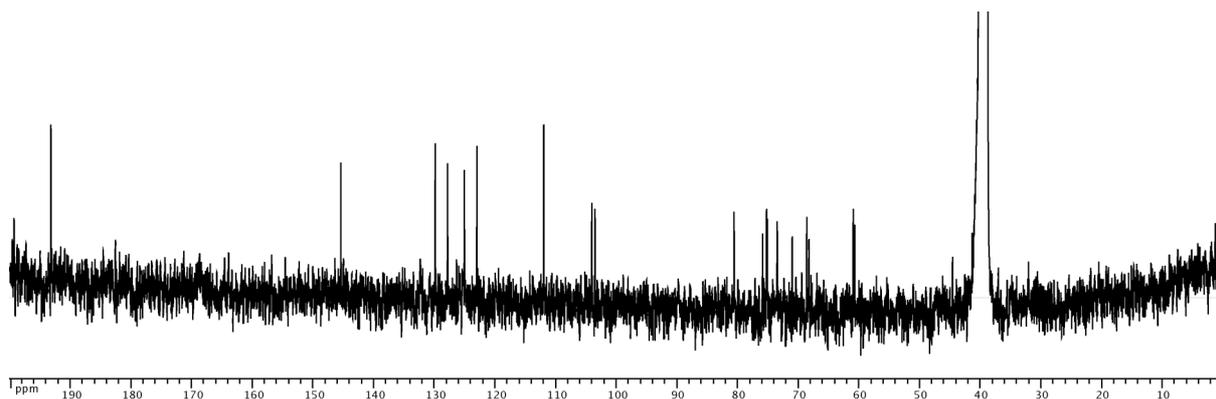


5a

Le composé **19** est dissous dans un mélange MeOH/triéthylamine/eau 56 ml/8 ml/24 ml puis agité à température ambiante toute une nuit. On observe la formation d'un précipité. On récupère ce précipité par filtration sous la forme d'une poudre jaunâtre (138 mg, 76 %). Ce produit peut également être recristallisé dans l'eau. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) 10.07 (s, 2H, -CHO), 8.85 (s, 2H, H-C(4, 5)), 8.06 (d, 2H, H-C(2, 7)), 7.94 (d, 2H, H-C(1, 8)), 4.83-4.64 (m, 2H, H-C(1')), 4.3 (d, J= 8, 1H), 4.21-4.05 (m, 2H), 4.03-3.95 (m, 1H),

3.75-3.66 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.58-3.40 (m, 4H), 3.35-3.22 (m, 5H), 2.9 (t, J= 8.6, 1H). ^{13}C -RMN (100 MHz, DMSO- d_6) 193.24 (2-C-CHO), 145.43 (C(9, 12)), 129.90 (C(3, 6)), 127.87 (C(4, 5)), 125.11 (C(2, 7)), 123.03 (C(10, 11)), 111.99 (C(1, 8)), 104.07, 103.56, 80.65, 75.92, 75.30, 75.14, 73.56, 73.47, 71.08, 68.67, 68.64, 68.27, 60.98, 60.76. HR-MALDI-MS(pos.): calculée pour $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{LiNO}_{13}$ [$M+\text{Li}$] $^+$ 598.2107 observée m/z : 598.2108.





Synthèse des glycopolymères dynamiques de première génération

4a (12.4 mg, 0.01 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O pour donner la solution **A**. **5b** (6.2 mg, 0.01 mmol) est dissous dans 1 mL d'une solution contenant 600 µL de D₂O et 400 µL de solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 4 pour donner la solution **B**. **4b** (9.53 mg, 0.01 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O pour donner la solution **C**. Le polymère **4a5a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **A** et de 500 µL d'une solution de **5a** (2.6 mg, 0.005 mmol) préparée par sonication dans une solution contenant 300 µL de D₂O et 200 µL de solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 4. Le polymère **4b5a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **C** et de 500 µL d'une solution de **5a** (2.6 mg, 0.005 mmol) préparée par sonication (un léger chauffage à 80°C peut être nécessaire pour dissoudre entièrement le monomère **5a**) dans d'une solution contenant 300 µL de D₂O et 200 µL de solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 4. Le polymère **4a5b** est préparé par mélange de 500 µL de solution **A** et de 500 µL de solution **B**. Dans chaque solution de polymère la concentration finale en monomères est de 5 mM.

Synthèse des glycopolymères dynamiques de deuxième génération

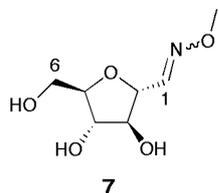
Le précurseur de monomère **25** (5 mg, 0.02 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O. 5 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à cette solution qui est ensuite chauffée à 50 °C pendant 24h. La réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant pour donner la solution **A**. Le précurseur de monomère **26** (7.3 mg, 0.02 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O. 5 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à cette solution qui est ensuite chauffée à 30 °C pendant 12h. La réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant pour donner la solution **B**. Le monomère **4a** (24.8 mg, 0.02 mmol) est dissous dans 1 ml de solution contenant 800 µL et 200 µL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₄/NaAcO-*d*₃ à pD= 5 pour donner la solution **C**. Le monomère **4b** (19 mg, 0.02 mmol) est dissous dans 1 ml de solution contenant 800 µL et 200 µL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 5 pour donner la solution **D**.

Le polymère **4a25a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **A** et 500 µL de solution **C**. Le polymère **4a26a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **B** et 500 µL de solution **C**. Le polymère **4b25a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **A** et 500 µL de solution **D**. Le polymère **4a26a** est préparé par mélange de 500 µL de solution **B** et 500 µL de solution **D**.

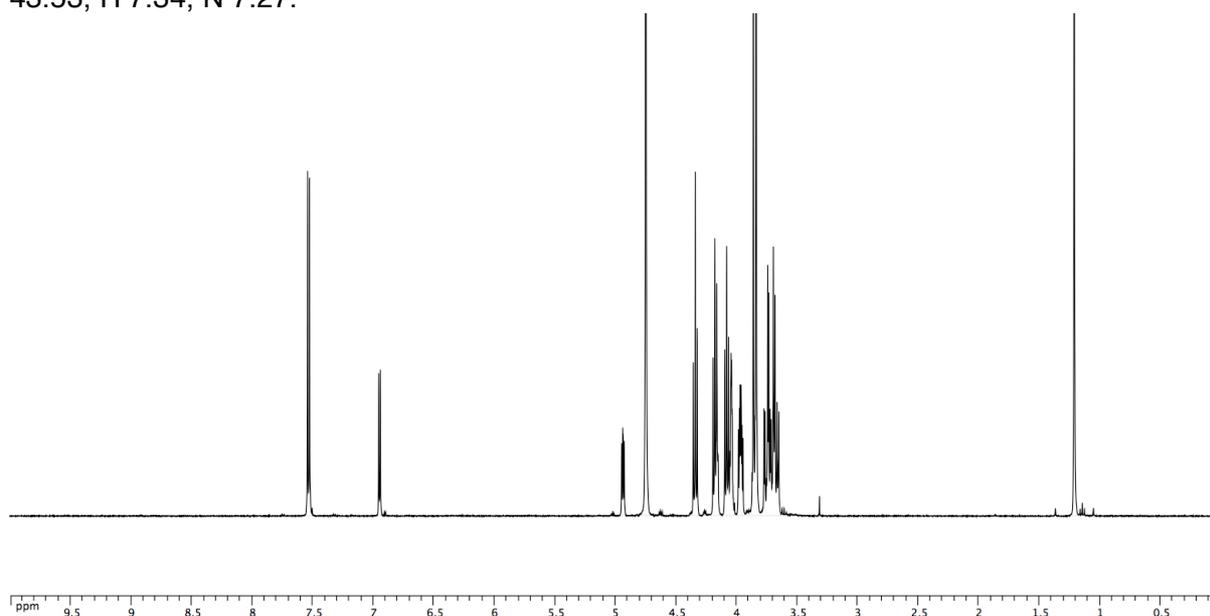
CHAPITRE IV: Section expérimentale

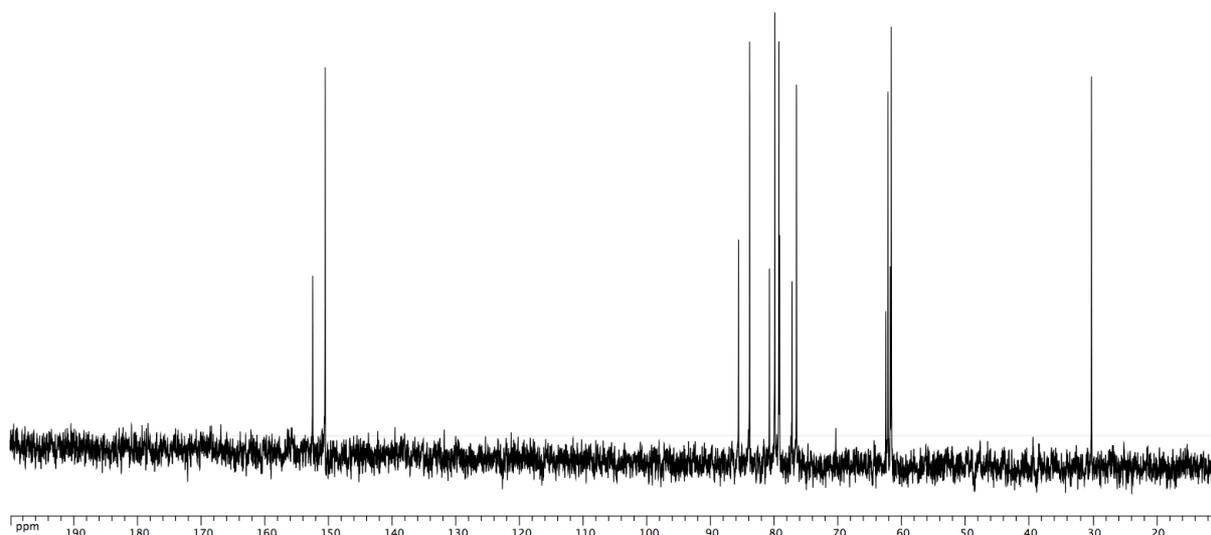
Synthèse des monomères et précurseurs de monomères

Synthèse du 2,5 -anhydro-D-mannose methyl oxime 7:

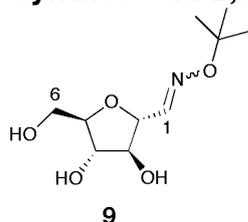


La glucosamine sous forme d'hydrochlorure (4 g, 18.5 mmol) est dissoute dans de l'eau (200 ml). La solution est laissée 4 h à cette température puis refroidie à 0°C avec un bain de glace. Du nitrite de sodium NaNO₂ (3.27 g, 3 eq) est alors ajouté en une portion suivi d'acide acétique (3 eq) qui lui est ajouté goutte-à-goutte (en particulier au début de l'addition) pour éviter que la température de la réaction excède 5°C. La réaction s'accompagne d'un dégagement d'azote. Après l'addition de la totalité de l'acide, on compte encore 4 h à 0°C avant de dégazer la réaction 3 fois par la succession de passage d'argon et de mise sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. La O-methylhydroxylamine sous forme d'hydrochlorure (2.32 g, 37.1 mmol) est ensuite ajoutée à la solution d'aldéhyde après avoir neutralisé le pH (7). La réaction est ensuite agitée à température ambiante pendant 12h. Après évaporation du solvant sous pression réduite le produit brut chromatographié sur gel de silice (CHCl₃/MeOH 9/1→8/2) pour donner le produit 7 sous forme d'un sirop incolore (2 g, 56%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, assignation basée sur une expérience COSY) : 7.54 (*d*, 0.70 H, J=6.5, H-C(1), isomère E), 6.95 (*d*, 0.30 H, J=5, H-C(1), isomère Z), 4.94 (*dd*, 0.30 H, J=5, 3.8, H-C(2), isomère Z), 4.34 (*t*, 0.70 H, J=6.5, H-C(2), isomère E), 4.20-4.14 (*m*, 1 H, H-C(3) isomère E et Z), 4.08 (*t*, 0.70 H, J=6.5, H-C(4), isomère E), 4.06-4.02 (*m*, 0.70 H, H-C(6)), 3.99-3.94 (*m*, 1 H, H-C(5), isomère E et Z), 3.86 (*s*, 0.90 H, OCH₃, isomère Z), 3.84 (*s*, 0.21 H, -OCH₃, isomère E), 3.79-3.64 (*m*, 1.3 H, H-C(6), isomère E et Z). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 152.51 (C(1), isomère Z), 150.55 (C(1), isomère E), 85.69 (C(5), isomère Z), 83.94 (C(5), isomère E), 80.84 (C(2), isomère Z), 79.99 (C(2), isomère E), 79.36 (C(4), isomère E), 79.24 (C(4), isomère Z), 77.30 (C(3), isomère Z), 76.59 (C(3), isomère E), 62.58 (C(6), isomère Z), 62.23 (C(6), isomère E), 61.87 (NOCH₃, isomère Z), 61.72 (NOCH₃, isomère E). ESI-MS(pos.): *m/z*: 214.05 [M+Na]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₇H₁₃NO₅: C 43.98, H 6.85, N 7.33; valeurs obtenues: C 43.53, H 7.34, N 7.27.

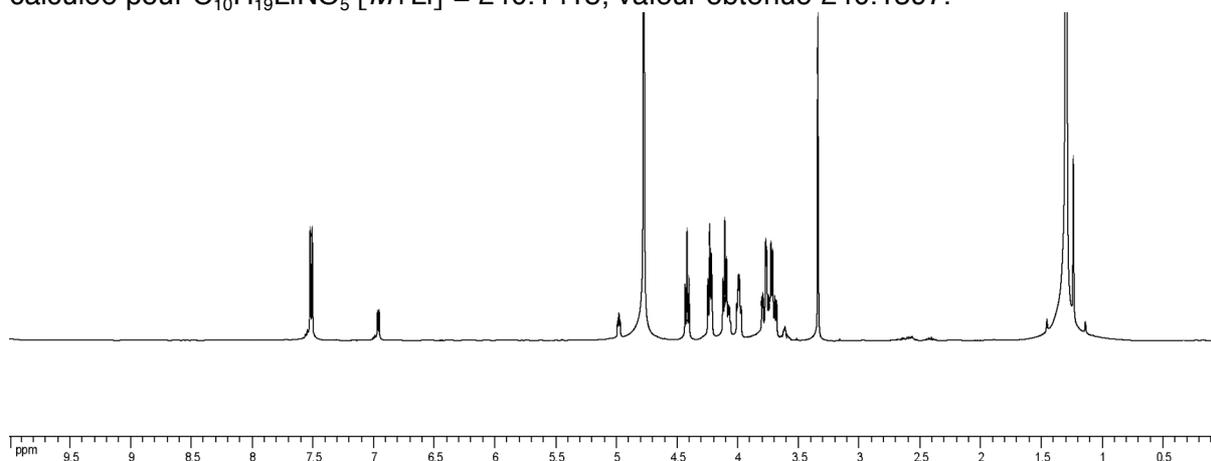




Synthèse du 2,5 -anhydro-D-mannose *tert*-butyl oxime **9**:

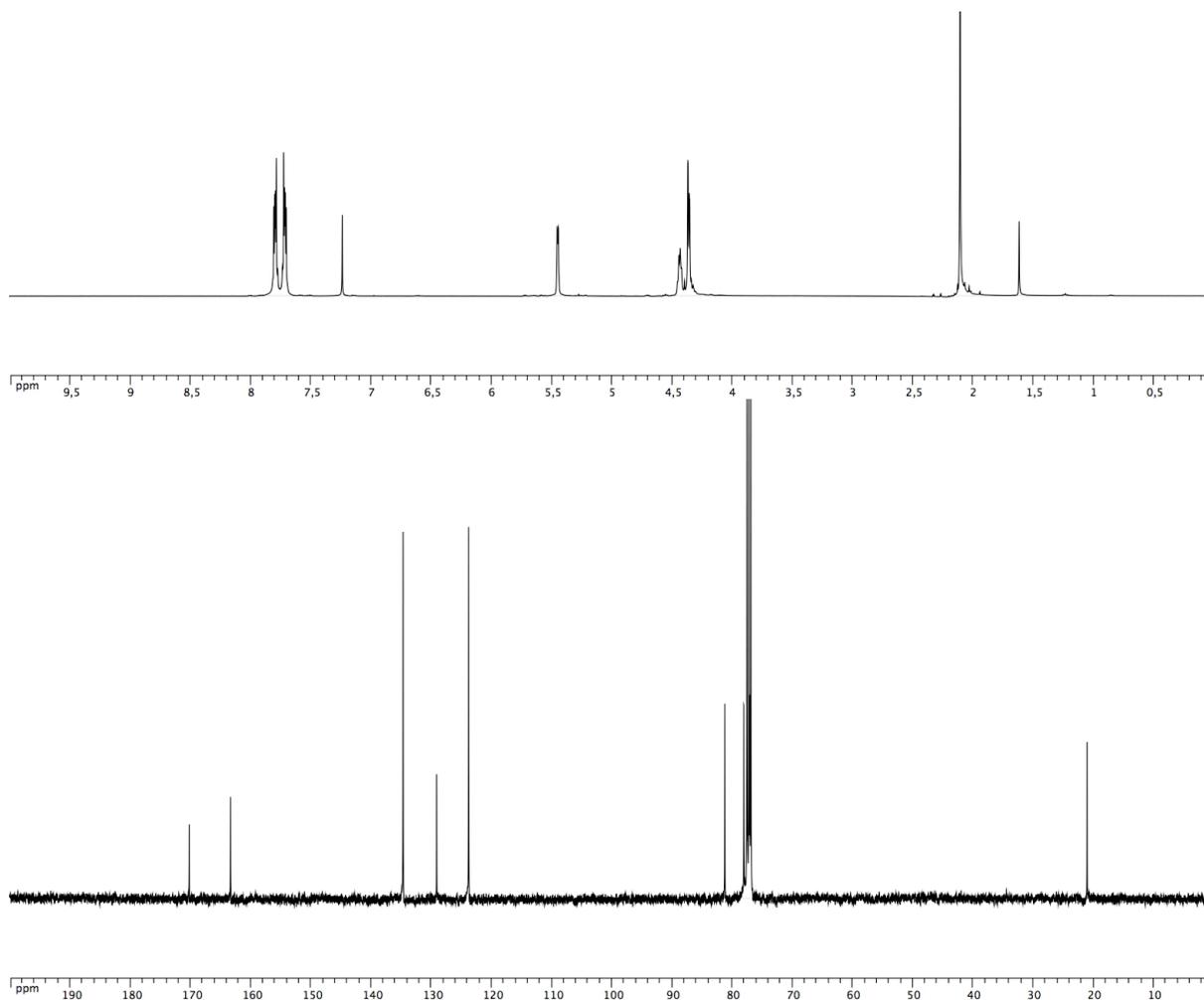


Le 2,5-anhydro-D-mannitol¹ (315 mg, 1.75 mmol) est dissous dans 5 ml de tampon acétate (100 mM) à pH= 5. La *O-tert*-butylhydroxylamine sous forme d'hydrochlorure (330 mg, 2.6 mmol) est ajoutée à cette solution suivie de K₂CO₃ (181 mg, 1.3 mmol) afin de déprotonner l'hydroxylamine. Après 12 h d'agitation à température ambiante le solvant est évaporé, et le produit brut chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 6/1) pour donner le produit **9** (300 mg, 73%).¹H-RMN (400 MHz, D₂O) : 7.52 (*d*, 0.80 H, J=6.5, H-C(1), isomère E), 6.96 (*d*, 0.20 H, J=4.5, H-C(1), isomère Z), 5.00-4.96 (*m*, 0.20 H, H-C(2), isomère Z), 4.42 (*t*, 0.80 H, J=6.5, H-C(2), isomère E), 4.23 (*t*, 1 H, H-C(3) isomère E et Z), 4.13-4.05 (*m*, 1.2 H), 4.02-3.96 (*m*, 0.80 H), 3.83-3.65 (*m*, 2H), 1.30 (*s*, 9H, *tert*-butyl). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 152.18 (C(1), isomère Z), 150.01 (C(1), isomère E), 85.96, 83.99, 81.29, 80.83, 80.31, 79.78, 79.43, 77.48, 76.79, 61.98 (C(6), isomère Z), 61.75 (C(6), isomère E), 27.19 (C primaire *tert*-butyl, isomère E et Z). HRMS *m/z* calculée pour C₁₀H₁₉LiNO₅ [*M*+Li]⁺= 240.1418; valeur obtenue 240.1397.

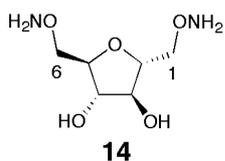


¹ cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 4 page 176.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale

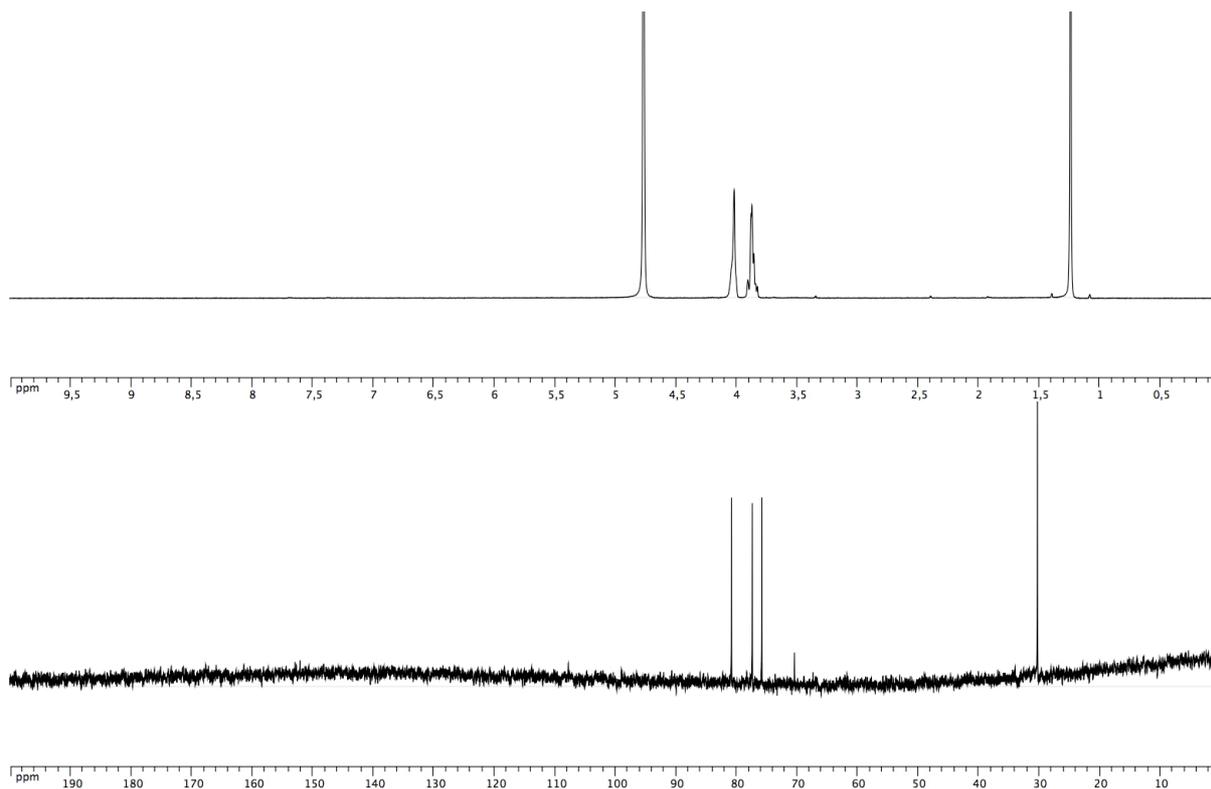


Synthèse du 2,5-anhydro-1,6-di-O-amino-D-mannitol 14:

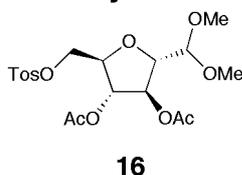


Le 3,4-Di-O-acetyl-2,5-anhydro-1,6-di-O-phtalimido-D-mannitol **13** (433 mg, 0,8 mmol) est dissous dans un mélange 1/1 butylamine/méthanol (30 ml) puis agité à température ambiante pendant 24h. La réaction est ensuite concentrée sous vide, puis coévaporée 3 fois avec de l'éthanol. Le produit brut est séché sous la rampe à vide pendant 3 h puis chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 4/1) pour donner le produit **14** sous forme d'un solide blanc (118mg, 76%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 4.08-3.98 (*m*, 4H), 3.94-3.80 (*m*, 4H). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 80.83 (C(1, 6)), 77.40(C(2, 5)), 75.83 (C(3, 4)). ESI-MS(pos.): *m/z*. 217.0776 [*M*+Na]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₆H₁₄N₂O₅: C 37.11, H 7.27, N 14.43; valeurs obtenues: C 36.56, H 7.17, N 14.48.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale



Synthèse du 3,4-di-*O*-acetyl-2,5-anhydro-6-*O*-(*p*-tolylsulfonyl)-D-mannose dimethyl acetal **16:**



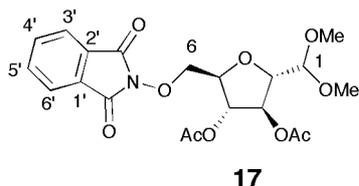
Ce composé a été préparé en se basant sur des procédures décrites dans la littérature.² La glucosamine sous forme d'hydrochlorure (8.44 g, 39 mmol) est dissoute dans de l'eau (200 ml). La solution est laissée 4 h à cette température puis refroidie à 0°C avec un bain de glace. Du nitrite de sodium NaNO₂ (6.9 g, 3 eq) est alors ajouté en une portion suivie de résine échangeuse d'ion du type *Amberlite IR 120 H⁺* (200ml) qui elle est ajoutée goutte-à-goutte (en particulier au début de l'addition) pour éviter que la température de la réaction excède 5°C. La réaction s'accompagne d'un dégagement d'azote. Après l'addition de la totalité de la résine, on compte encore 4 h à 0°C avant de filtrer la réaction. Le filtrat est dégazé 3 fois par la succession de passage d'argon et mise sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. La solution est ensuite neutralisée par de la résine échangeuse d'ion du type *Dowex 21K (CO₃²⁻)* (200 ml), filtrée puis concentrée sous pression réduite pour fournir le 2,5-anhydro-D-mannose sous la forme d'une mousse jaunâtre (5.95 g). Ce produit n'est pas purifié pour la seconde étape d'acétalisation dans le méthanol (200 ml). Du triméthylorthoformate est ajouté à cette solution, suivi du chlorure de l'acide acétique (0.5 ml) pour générer de l'acide chlorhydrique *in situ*. Après 4 h à température ambiante la réaction est neutralisée par de la résine échangeuse d'ion du type *Dowex 21K (CO₃²⁻)* puis filtrée et concentrée sous pression réduite pour donner le 2,5-anhydro-D-mannose dimethyl acetal sous la forme d'une huile. Cet intermédiaire est directement transformé en tosylate après 2 coévaporation avec de la pyridine puis solubilisation dans de la pyridine sèche (50 ml). Cette solution est refroidie à 0°C sous atmosphère d'argon. Du chlorure de tosylate (7 g, 37.5 mmol, 1 eq) est alors ajouté par petites portions réparties sur 30 min. La réaction est agitée à température ambiante pendant 48 h puis de l'anhydride acétique (50 ml) est rajouté à la réaction. Après 24 h à température

² Cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 7 page 180.

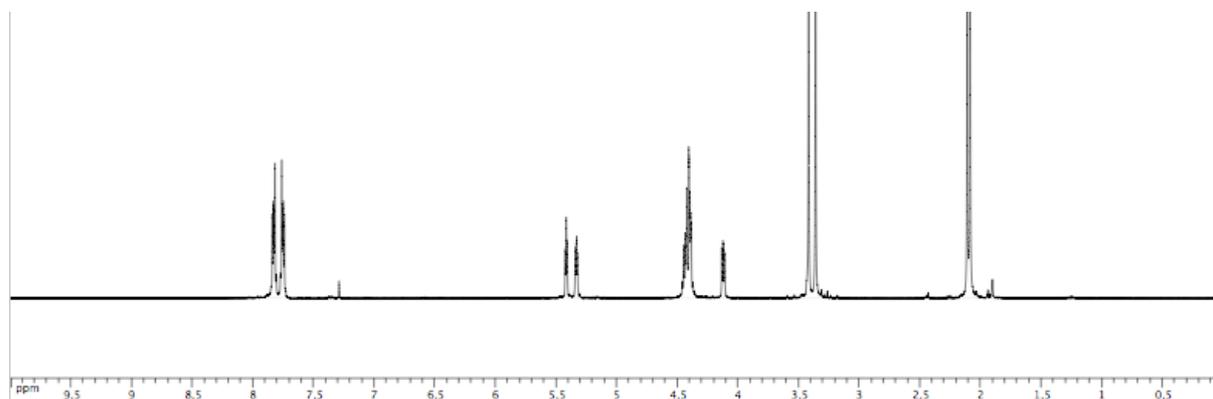
Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale

ambiante la réaction est refroidie à 0°C puis l'excès d'anhydride acétique est neutralisé par l'addition lente de méthanol (50 ml). La réaction est ensuite diluée par de l'AcOEt, lavée par de l'eau, une solution saturée de NaHCO₃, de la saumure, et finalement séchée sur MgSO₄ filtrée et concentrée sous vide. Le produit brut est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/Et₂O 1/0→9/1) pour donner **16** sous la forme d'une huile légèrement jaune (3.36 g, 20%). R_f (CH₂Cl₂/Et₂O 9/1) 0.34.

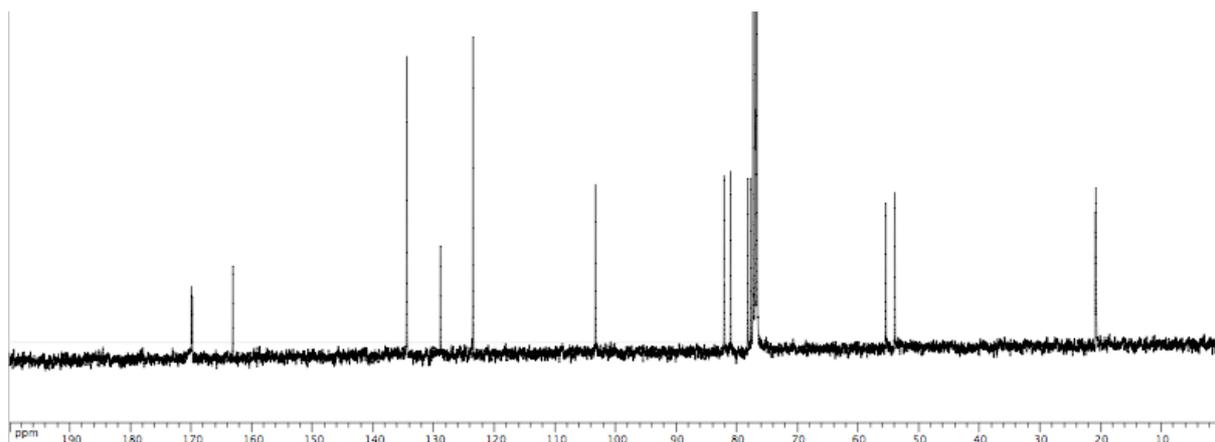
Synthèse du 3,4-di-O-acetyl-2,5-anhydro-6-O-phthalimido-D-mannose diméthyl acetal **17:**



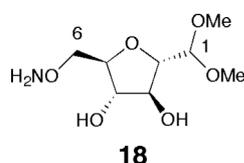
Le tosylate **16** (10.95 g, 24,5 mmol) et la N-Hydroxyphthalimide (6 g, 36,7 mmol, 1.5 eq) sont mis en solution dans de la DMF sèche (95 ml). Sous atmosphère d'azote de la DBU (5.5 ml, 36.7 mmol) est ajoutée ce qui fait tourner la couleur de la réaction au rouge intense. La réaction est chauffée à 90°C pendant 2 h puis diluée par de l'AcOEt. La phase organique est lavée par de l'eau 2 fois, de la saumure, puis séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit brut est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 9/1→8/2) pour donner **17** sous la forme d'une huile jaunâtre (7 g, 65%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, assignation basée sur une expérience COSY) : 7.86-7.62 (*m*, 4H, H-C(3',4',5',6' arom.)), 5.37 (*t*, J=3.4, 1H, H-C(4)), 5.28 (*dd*, J=4.5, 3.4, 1H, H-C(5)), 4.47-4.26 (*m*, 4H, H-C(1,2,H6a,H6b)), 4.07 (*dd*, J=5.7, 3.4, 1H, H-C(3)), 3.37 (*s*, 3H, -OCH₃), 3.31 (*s*, 3H, -OCH₃), 2.06 (*s*, 3H -OOCCH₃), 2.04 (*s*, 3H, -OOCCH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 169.98 (-OOCCH₃), 169.85 (-OOCCH₃), 163.14 (phthalimide-CON), 134.47 (C(1',2')), 128.91 (C(4',5')), 123.53 (C(3',6')), 103.35 (C(1)), 82.12 (C(2)), 81.08 (C(4)), 78.23 (C(5)), 77.69 (C(6)), 76.97 (C(3)), 55.50 (-OCH₃), 54.00 (-OCH₃), 20.91 (-OOCCH₃), 20.82 (-OOCCH₃). MALDI-MS(pos.): *m/z*: 460.11 [*M*+Na]⁺, 438.14 [*M*+H]⁺; analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₀H₂₃NO₁₀: C 54.92, H 5.30, N 3.20; valeurs obtenues: C 54.7, H 5.47, N 3.34.



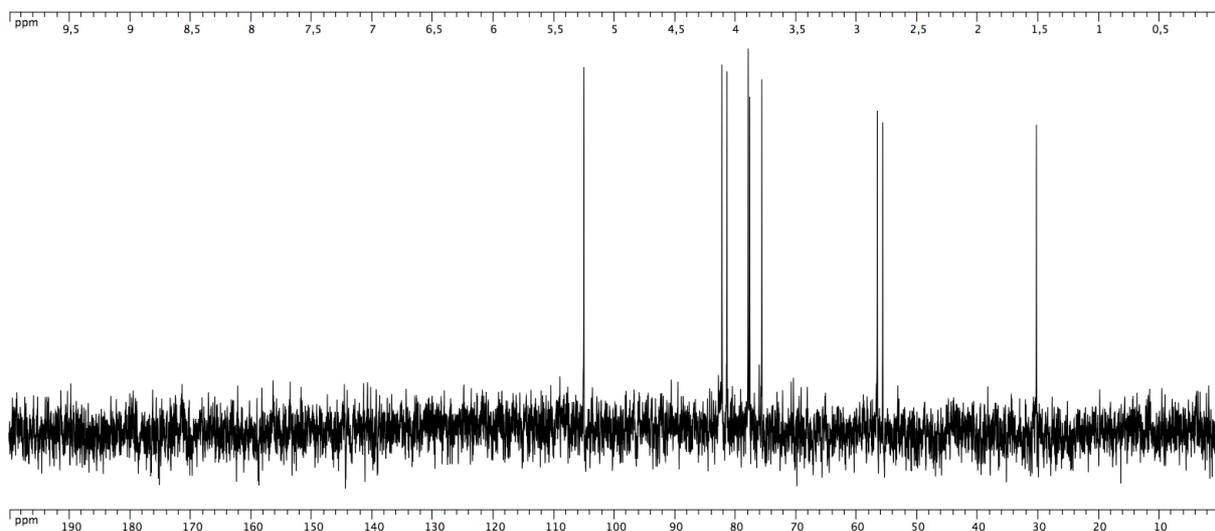
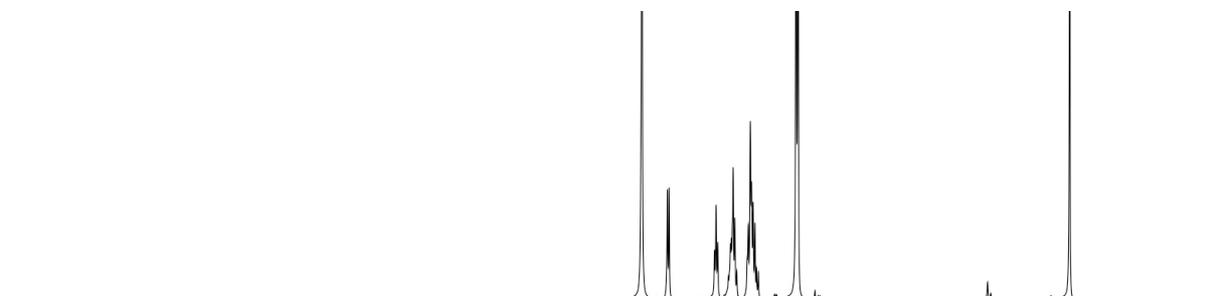
Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale



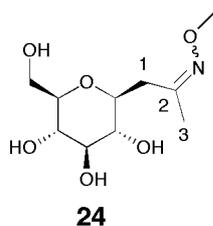
Synthèse du 2,5 -anhydro-6-*O*-amino-D-mannose dimethyl acetal **18:**



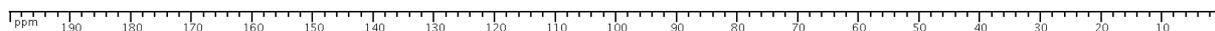
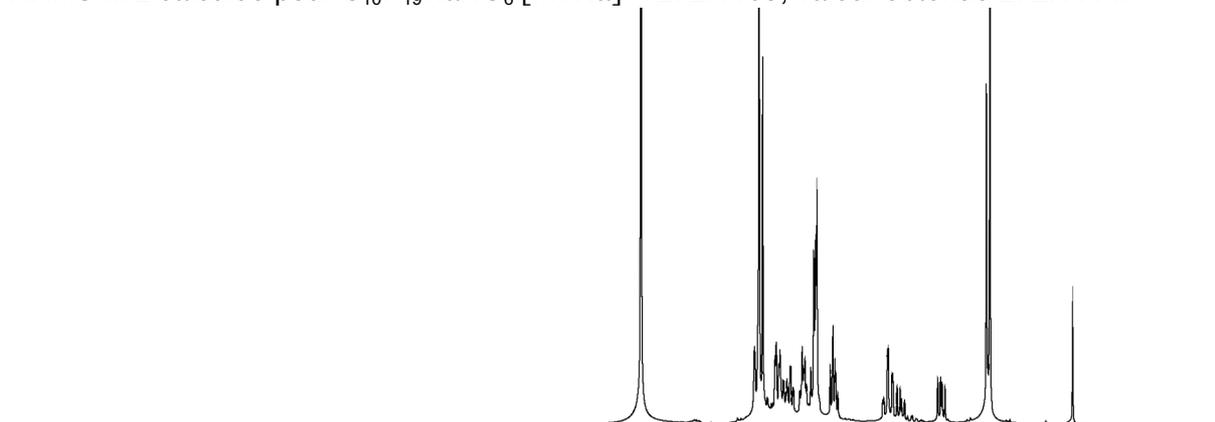
Le composé **17** (805 mg, 1.84 mmol) est dissous dans un mélange 1/1 butylamine/méthanol (20ml) puis agité à température ambiante pendant 3h. La réaction est ensuite concentrée sous vide, puis coévaporée 3 fois avec de l'éthanol. Le produit brut est séché sous la rampe à vide pendant 3 h puis chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9/1) pour donner le produit **18** sous forme d'un sirop incolore (200mg, 49%). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 4.56 (*d*, *J*=6, 1H, H-C(1)), 4.16 (*t*, *J*=6Hz, 1H, H-C(2)), 4.10-3.96 (*m*, 2H), 3.94-3.79 (*m*, 3H), 3.50 (*s*, 3H, -OCH₃), 3.48 (*s*, 3H, -OCH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 105.05 (C(1)), 82.25(C(2)), 81.41, 77.91, 77.65 (C(4)), 75.66 (C(3)), 56.57 (-OCH₃), 55.67 (-OCH₃). HRMS *m/z* calculée pour C₈H₁₇LiNO₆ [*M*+Li]⁺= 230.1211; valeur obtenue 230.1225.



Synthèse de la 1-β-D-glucopyranosylpropan-2-one *O*-methyl oxime **24**:

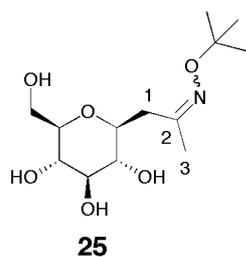


Le C-glycoside 4,8-Anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-D-gulonose ou 1-β-D-glucopyranosylpropan-2-one **23** a été préparé en une étape selon une méthode décrite dans la littérature par une condensation du glucose et de la 2,3-pentanedione en milieu aqueux en présence de Na₂CO₃.³ Ce composé (500 mg, 1.88 mmol) est dissous dans de l'eau (5 ml), puis traité par de la *O*-methylhydroxylamine sous forme d'hydrochlorure (234 mg, 2.8 mmol) en présence de K₂CO₃ (194 mg, 1.4 mmol). Après 12h à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Celui ci est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 6/1) pour donner le produit **24** (275 mg, 57 %) sous la forme d'une mousse blanche. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 3.92-3.29 (*m*, 6H), 3.82 (*s*, 1.8 H, =NO-CH₃ isomère E), 3.79 (*s*, 1.2 H, =NO-CH₃ isomère Z), 3.21 (*t*, J= 9.1, 0.6 H), 3.20 (*t*, J= 9.1, 0.4 H), 2.82-2.70 (*m*, 1H, H-C(1)), 2.65 (*dd*, J= 12.6 et 9.8, 0.4 H, H-C(1)), 2.32 (*dd*, J= 14.2 et 9.8, 0.6 H, H-C(1)), 1.95 (*s*, 1.2 H, H-C(3)), 1.92 (*s*, 1.8 H, H-C(3)). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 160.65 (isomère Z, C(2)), 160.44 (isomère E, C(2)), 80.26, 80.18, 77.97, 77.91, 76.87, 76.82, 74.57, 74.25, 70.46, 70.41, 61.47(isomère E, =NO-CH₃), 61.35 (isomère Z, =NO-CH₃), 38.38 (isomère E, C(1)), 32.32 (isomère Z, C(1)), 20.07 (isomère Z, C(3)), 14.48 (isomère E, C(3)). HRMS *m/z* calculée pour C₁₀H₁₉NaNO₆ [*M*+Na]⁺ = 272.1105; valeur obtenue 272.1114.

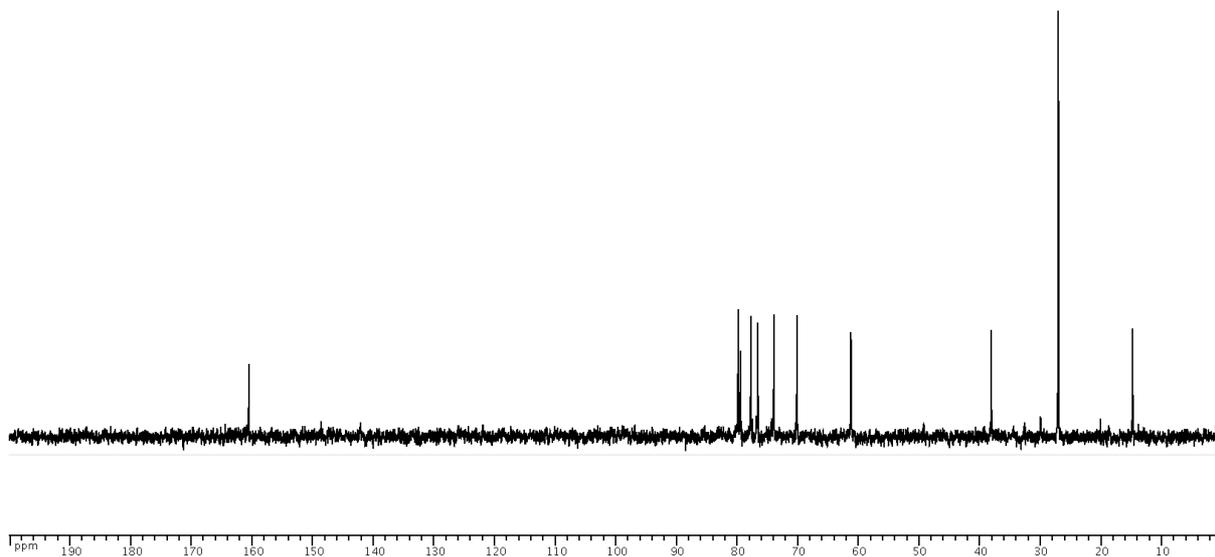
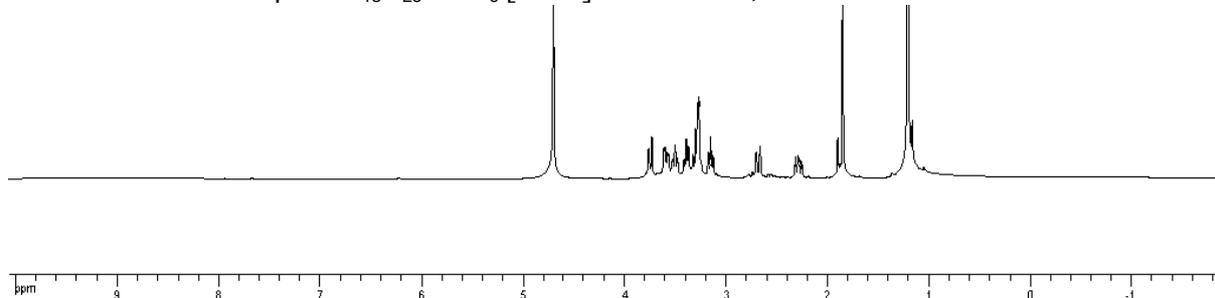


³ cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 14 page 191.

Synthèse de la 1-β-D-glucopyranosylpropan-2-one *O*-*tert*-butyl oxime **25**:

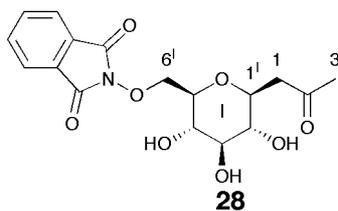


Le C-glycoside 4,8-Anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-D-gulonose ou 1-β-D-glucopyranosylpropan-2-one **23** a été préparé en une étape selon une méthode décrite dans la littérature par une condensation du glucose et de la 2,3-pentanedione en milieu aqueux en présence de Na₂CO₃.⁴ Ce composé (500 mg, 1.88 mmol) est dissous dans de l'eau (5 ml), puis traité par de la *O*-*tert*-butylhydroxylamine sous forme d'hydrochlorure (352 mg, 2.8 mmol) en présence de K₂CO₃ (194 mg, 1.4 mmol). Après 12h à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Celui ci est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 6/1) pour donner le produit **25** (231 mg, 42 %) sous la forme d'une mousse blanche. ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 3.82-3.70 (*m*, 1H), 3.64-3.22 (*m*, 5H), 3.19-3.11 (*m*, 1 H), 2.80-2.51 (*m*, 1H, H-C(1)), 2.34-2.23 (*m*, 1H, H-C(1)), 1.95 (*s*, 0.52 H, H-C(3)), 1.85 (*s*, 2.48 H, H-C(3)), 1.21 (*s*, 9H, *tert*-butyl). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 160.53 (C(2)), 79.86, 79.50, 77.75, 77.56, 76.88, 76.61, 74.37, 73.97, 70.15 (C quaternaire *tert*-butyl), 61.27, 38.12 (C(1)), 27.06 (C primaires *tert*-butyl), 14.82 (C(3)). HRMS *m/z* calculée pour C₁₃H₂₅LiNO₆ [*M*+Li]⁺= 298.1837; valeur obtenue 298.1821.

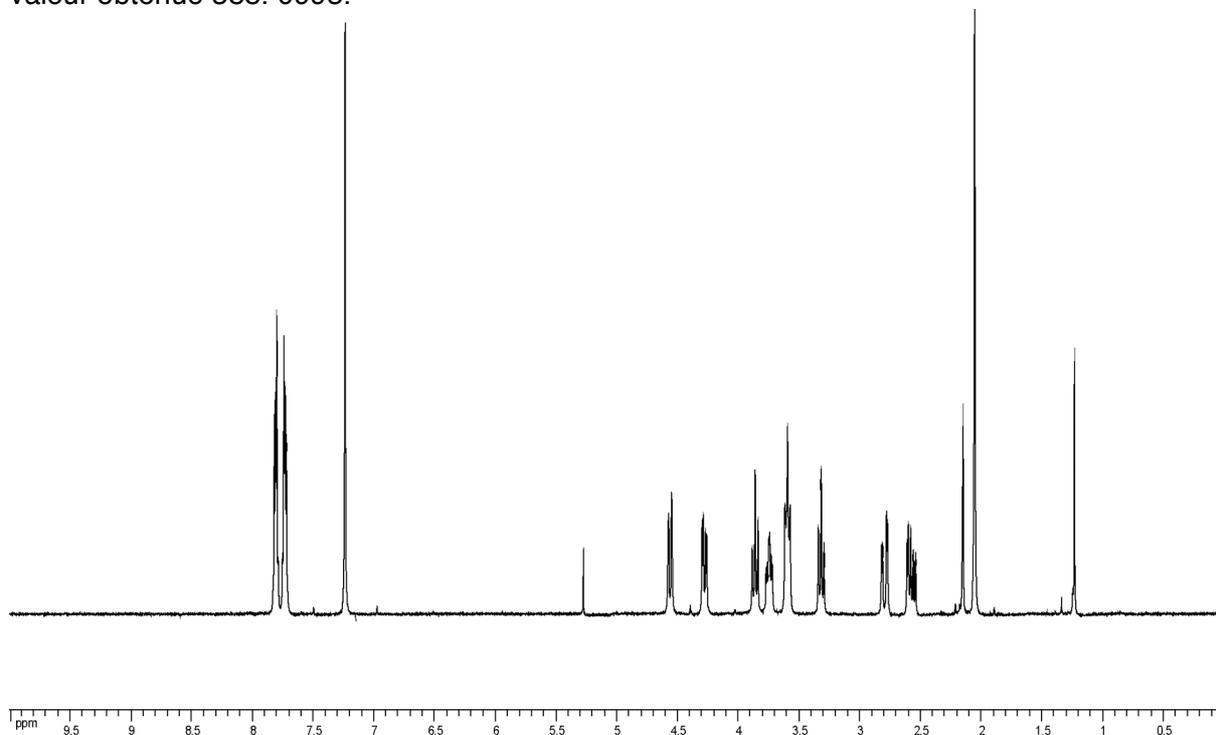


⁴ cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 14 page 191.

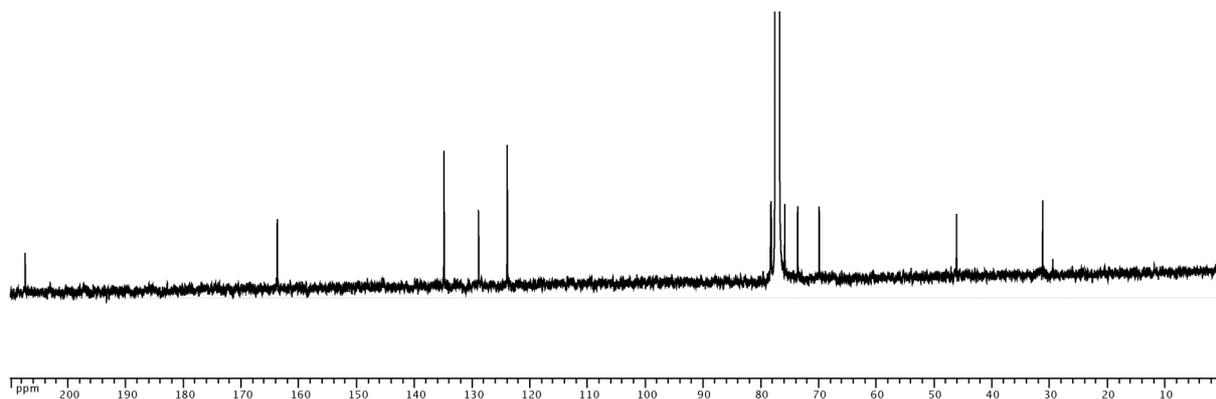
Synthèse du 1-(6-O-phtalimido-β-D-glucopyranosyl)propan-2-one **28**:



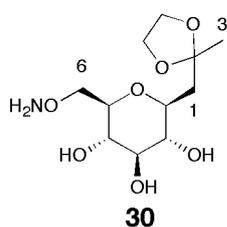
Le C-glycoside 4,8-Anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-D-gulo-nonulose ou 1-β-D-glucopyranosylpropan-2-one **23** a été préparé en une étape selon une méthode décrite dans la littérature par une condensation du glucose et de la 2,3-pentanedione en milieu aqueux en présence de Na₂CO₃.⁵ Le composé **23** (5.18 g, 20 mmol) est coévaporé 2 fois sous pression réduite avec de la pyridine (40 ml) pour éliminer par formation d'azéotrope l'eau résiduelle contenu dans ce produit très hygroscopique. Après séchage à la rampe à vide pendant 2 h, l'huile ainsi obtenue est dissoute dans du THF sec (100 ml) avec de la N-hydroxyphtalimide (3.83 g, 23.5 mmol, 1.2 eq). Dans un récipient à part, la triphénylphosphine (6.16 g, 23.5 mmol, 1.2 eq) et le diisopropylazodicarboxylate (4.75 g, 4.62 ml, 23.5 mmol, 1.2 eq) sont mélangés sous atmosphère d'azote pour générer la bétaine impliquée dans la réaction de Mitsunobu. Après 15 min à température ambiante cette suspension de bétaine est ajoutée par petites portions à la solution de N-hydroxyphtalimide et du C-glycoside qui vire immédiatement au rouge vif. Après 3 h à température ambiante le solvant est éliminé et le produit brut chromatographié sur gel de silice (AcOEt→AcOEt/MeOH/H₂O 7/3/1 puis CH₂Cl₂/MeOH 1/0→10/1→4/1; CH₂Cl₂/Acetone 1/1 est également utilisable) pour donner le produit sous forme d'une mousse blanche (1.45 g, 20%).¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 7.67-7.68 (*m*, 4H, H-C(aromatiques)), 4.56 (*dd*, J= 11.8, 1.8, 1H, H-C(2')), 4.28 (*dd*, J= 11.8, 4.2, 1H, H-C(1')), 3.86 (*t*, J= 9.2, 1H), 3.78-3.71 (*m*, 1H), 3.64-3.55 (*m*, 2H, H-C(6')), 3.32 (*t*, J= 9.2, 1H), 2.8 (*dd*, J= 16, 4.2, 1H, H-C(1)), 2.63-2.53 (*m*, 1H, H-C(1)) 2.06 (*s*, 3H, H-C(3)). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 207.47 (C(2)), 163.80, 134.92 (C(quaternaire phtalimide), 128.93, 123.97, 78.36, 78.27, 75.91, 74.43, 73.68, 69.96, 46.17 (C(1)), 31.25 (C(3)). HRMS *m/z* calculée pour C₁₇H₁₉NaNO₈ [M+Na]⁺= 388.1003; valeur obtenue 388. 0993.



⁵ Cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 14 page 191.

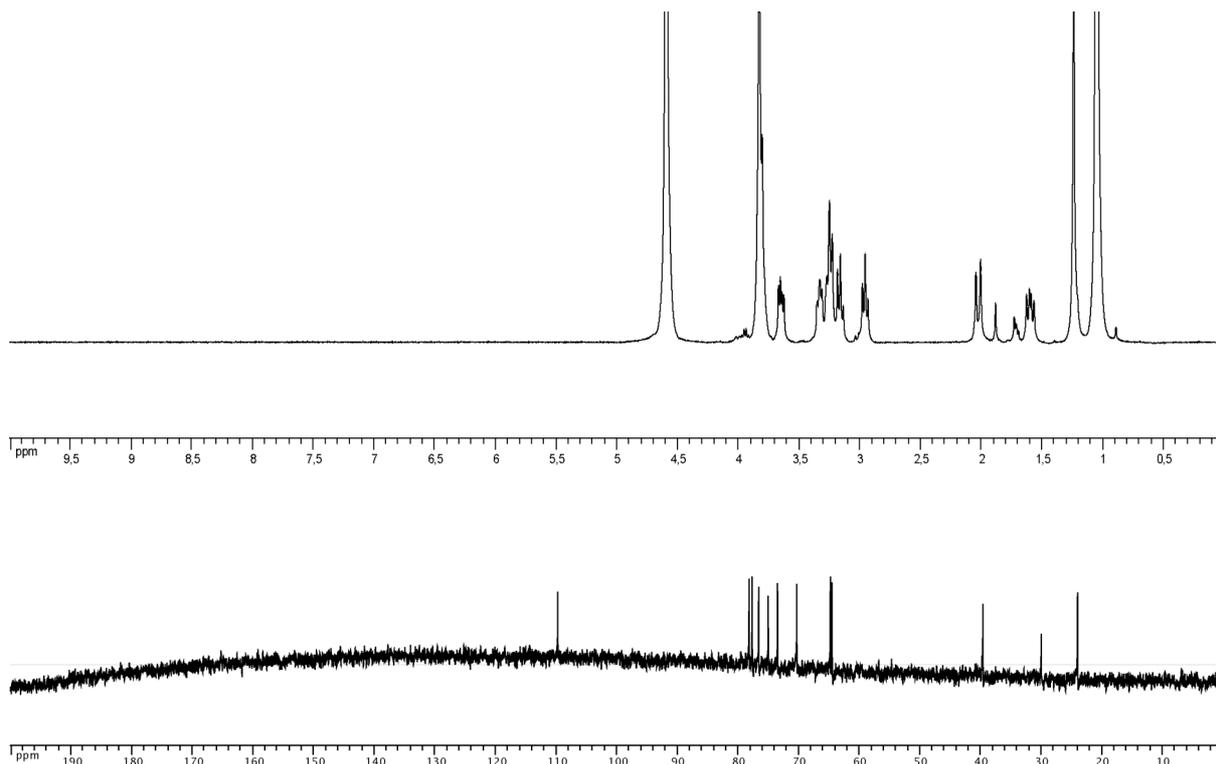


Synthèse du 1-(6-*O*-amino- β -D-gluco-pyranosyl)propan-2-one ethylene acetal **30**:

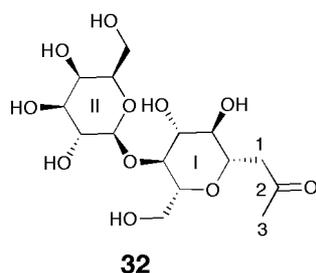


La méthyle cétone **29** est dissoute dans un mélange pyridine/anhydride acétique 1/1 (20 ml). Cette solution est agitée à température ambiante toute une nuit puis refroidie à l'aide d'un bain de glace. Du MeOH (50 ml) est alors ajouté par petites portions. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est dissous dans de l'AcOEt. Cette solution est lavée successivement par une solution d'HCl 1N, une solution saturée de NaHCO₃, puis de la saumure. Après séchage de la phase organique sur MgSO₄, filtration et concentration sous pression réduite on obtient le 5,6,7-tri-*O*-acetyl-4,8-anhydro-1,3-dideoxy-9-*O*-phtalimido-D-glycero-D-gulonulose qui est directement utilisé pour l'étape suivante. Une partie de ce composé (150 mg, 0.3 mmol) est mise en suspension dans une solution d'éthylène glycol (2.5 ml) et de triméthylorthoformate (1.5ml). De l'acide *p*-toluène sulfonique est alors ajouté en quantité catalytique (27 mg). Après agitation à température ambiante pendant 12h sous atmosphère d'azote la réaction est diluée dans 200 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est alors lavée deux fois par une solution saturée de NaHCO₃ et de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour fournir le produit brut qui est directement déprotégé par dissolution dans un mélange 1/1 butylamine/méthanol (10 ml) et agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 12h. La réaction est ensuite concentrée sous vide, puis coévaporée 3 fois avec de l'éthanol, puis séchée sous rampe à vide pendant 1h. Le produit brut est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9/1→8/2) pour donner le produit **30** (38 mg, 45% à partir du composé protégé). ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 4.10-3.93 (*m*, 5H, H-C(dioxolane)), 3.84 (*dd*, *J*= 11.7, 6.3, 1H), 3.58-3.31 (*m*, 4H), 3.15 (*t*, 1H), 2.22 (*d*, *J*= 15, 1H, H-C(1)), 1.79 (*dd*, *J*= 15, 9.4, 1H, H-C(1)), 1.43 (*s*, 3H, H-C(3)). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 109.75 (C(2)), 78.19, 77.68, 76.60, 75.04, 73.50, 70.32, 64.78 (C(cycle dioxolane)), 64.50 (C(cycle dioxolane)), 39.62 (C(1)), 24.01 (C(3)). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*: calculée pour C₁₁H₂₂NO₇ [*M*+H]⁺= 280.1391, observée 280.1392.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale



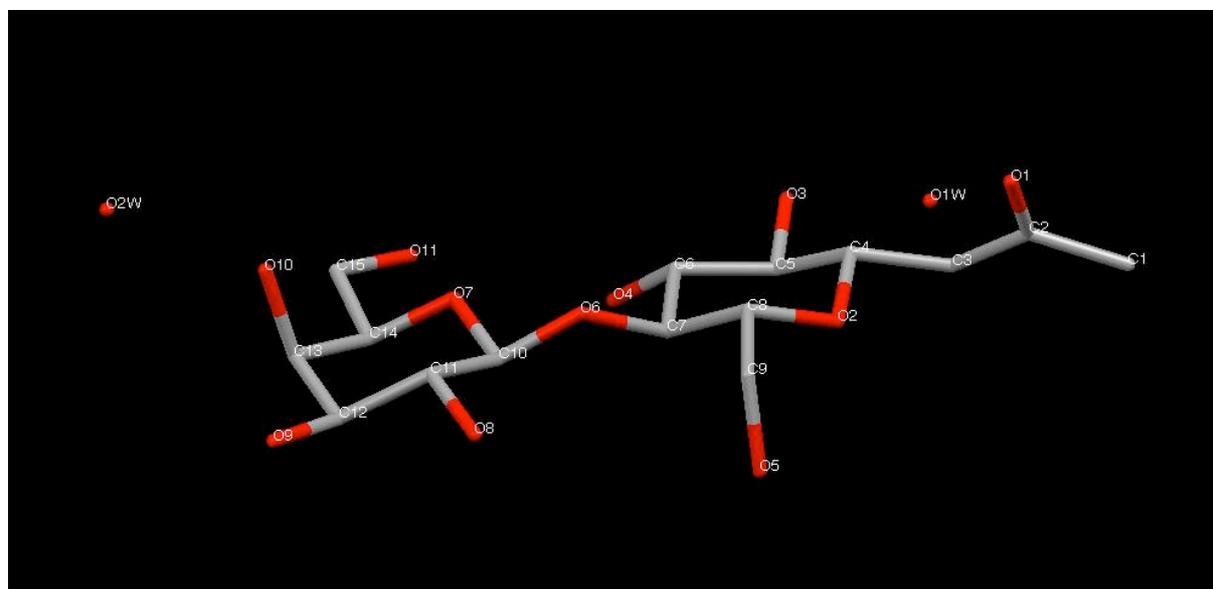
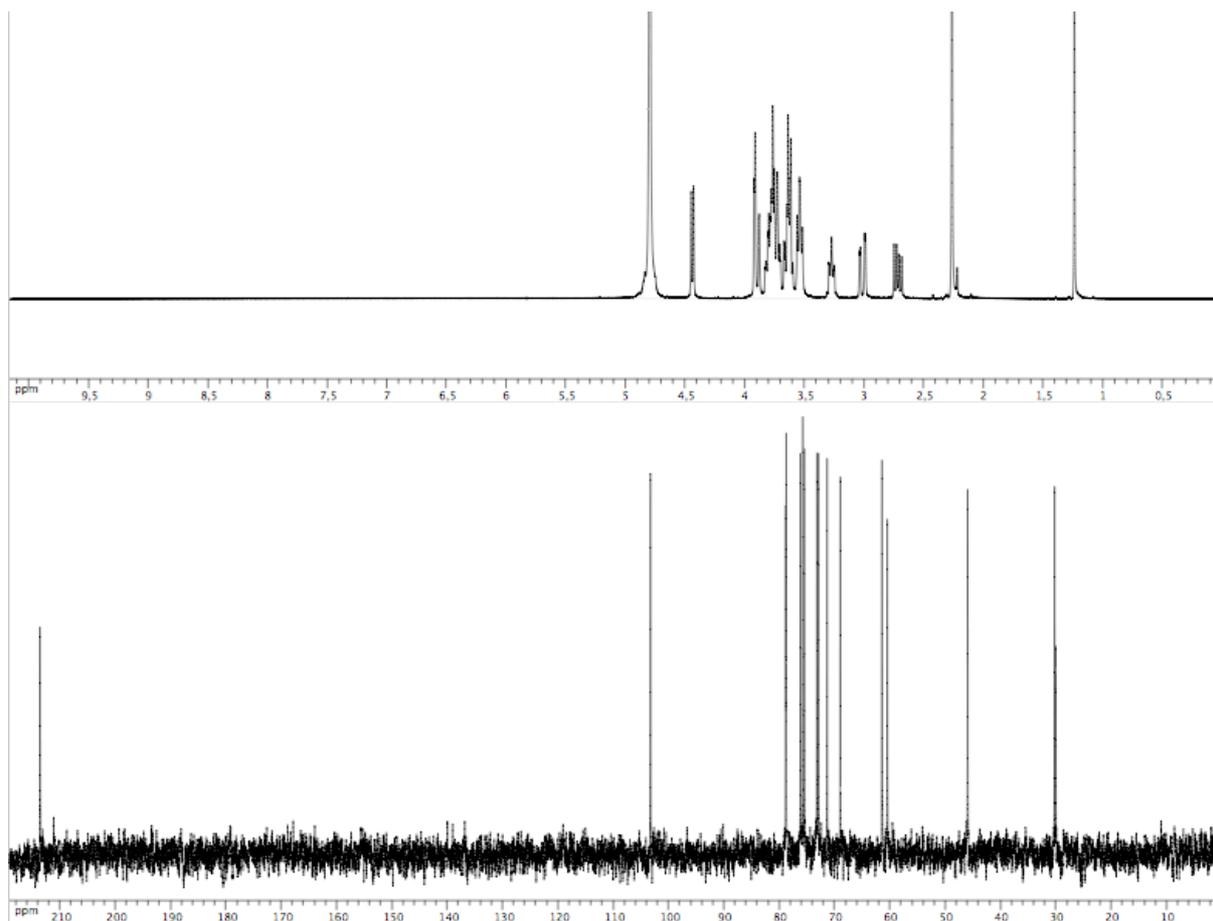
Synthèse de la 1-β-D-Lactosylpropan-2-one **32**:



Du D-Lactose monohydrate (7.2 g, 20 mmol) est solubilisé dans de l'eau (80 ml) avec du bicarbonate de sodium Na_2CO_3 (3.18 g, 30 mmol) et de la pentane-2,4-dione (2.4 g, 2.46 ml, 24 mmol) à une température de 90°C. Après 12 h à cette température la réaction est refroidie à température ambiante, neutralisée avec de la résine échangeuse d'ion du type *Amberlite IR 120 H⁺*, puis filtrée. Cette phase aqueuse est lavée 3 fois par du dichlorométhane puis concentrée à sec. Le produit brut est recristallisé dans un mélange eau /acétone de la façon suivante :

Le résidu brut est dissout par chauffage dans un mélange d'acétone et d'une quantité minimum d'eau. Cette solution est ensuite diluée par de l'acétone puis placée au frigo toute une nuit pour récolter par filtration des cristaux incolores (5g, 65%). ^1H -RMN (400 MHz, D_2O , assignation basée sur une expérience COSY) : 4.44 (*d*, $J=7.7$, 1H, H-C(1^{II})), 3.95-3.58 (*m*, 10H), 3.58-3.50 (*m*, 2H, H-C(2^{II})), 3.32-3.23 (*m*, 1H), 3.01 (*dd*, $J=17$, 2.6, 1H, H-C(1a)), 2.72 (*dd*, $J=17$, 9.2, 1H H-C(1b)), 2.27 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{-C}(3)$) ^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O assignation basée sur une expérience HSQC) 213.54 (C(2)), 103.32 (C(1^{II})), 78.89, 78.79, 76.21, 75.79, 75.52, 73.22, 72.97, 71.41, 69.01, 61.49, 60.53, 46.00 (C(1)), 30.07 (C(3)). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*: calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NaO}_{11}$ 405.1367 [$M+\text{Na}$]⁺, observée 405.1362; **32** cristallise sous la forme du trihydrate, analyse élémentaire calculée (%) pour $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$: C 41.28, H 7.39; valeurs obtenues: C 42.14, H 7.38.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale



Structure tridimensionnelle de **32** obtenue par diffraction des rayons X sur des monocristaux obtenus par diffusion lente d'acétone dans une solution de **32** dans l'eau.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale

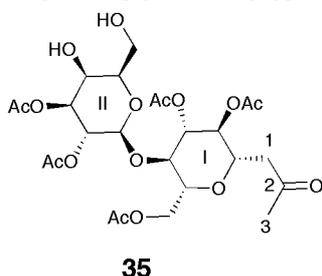
Composé	32
Formule chimique	C ₁₅ H ₃₀ O ₁₃
<i>M</i> (g.mol ⁻¹)	418.39
Température (K)	173(2)
Longueur d'onde (Å)	0.71073
Groupe d'espace	P1
<i>a</i> (Å)	4.739(10)
<i>b</i> (Å)	7.7259(2)
<i>c</i> (Å)	13.5842(4)
<i>α</i> (°)	88.166(2)
<i>β</i> (°)	83.566(2)
<i>γ</i> (°)	75.238(2)
<i>V</i> (Å ³)	477.91
<i>Z</i> , <i>Z'</i>	<i>Z</i> : 1 <i>Z'</i> : 0
<i>R</i> (%)	3.17

Informations sur les données cristallographiques et les paramètres de résolution de la structure de **32**.

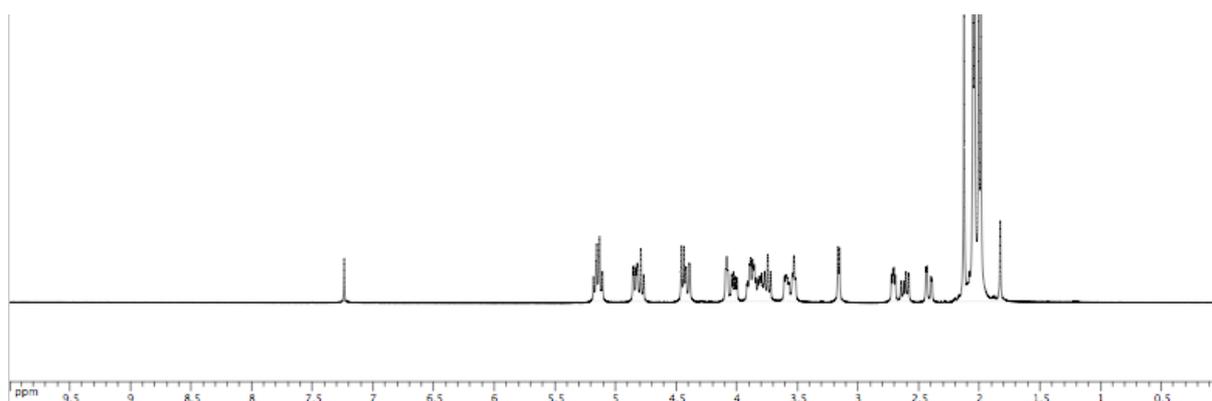
Atome 1	Atome 2	Distance(Å)	SybylType	Atome 1	Atome 2	Atome 3	Angle(°)
C1	H1A	0.961	1	O1	C2	C1	121.55
C1	H1B	0.960	1	O1	C2	C3	121.57
C1	H1C	0.960	1	C4	C3	C2	114.73
C1	C2	1.490	1	C5	C4	C3	112.57
C2	C3	1.509	1	O2	C4	C3	106.23
C2	O1	1.217	2	C4	O2	C8	111.75
C3	H3A	0.970	1	C8	C9	O5	110.54
C3	H3B	0.970	1	C7	C8	O2	109.28
C3	C4	1.516	1	O6	C7	C8	110.66
C4	H4	0.980	1	C5	C6	C7	111.59
C4	C5	1.529	1	O4	C6	C7	112.47
C4	O2	1.427	1	O4	C6	C5	105.76
C5	H5	0.980	1	C6	C5	O3	111.06
C5	C6	1.526	1	O3	C5	C4	109.35
C5	O3	1.428	1	C7	O6	C10	116.80
C6	H6	0.980	1	O6	C7	O6	112.02
O6	C7	1.524	1	O6	C7	C8	104.69
O6	O4	1.435	1	O7	C10	O6	106.81
C7	H7	0.980	1	O6	C10	C11	110.08
C7	C8	1.524	1	C10	C11	O8	109.30
C7	O6	1.437	1	O8	C11	C12	110.47
C8	H8	0.980	1	C11	C12	O9	112.26
C8	C9	1.508	1	O9	C12	C13	112.74
C8	O2	1.431	1	O10	C13	C12	107.59
C9	H9A	0.971	1	O10	C13	C14	111.96
C9	H9B	0.970	1	C13	C14	O7	110.12
C9	O5	1.423	1	C13	C14	C15	113.40
C10	H10	0.980	1	C15	C14	O7	106.33
C10	C11	1.514	1	C14	O7	C10	112.66
C10	O6	1.396	1	O7	C10	C11	109.06
C10	O7	1.429	1	C12	C11	C10	108.63
C11	H11	0.980	1	C13	C12	C11	110.18
C11	C12	1.528	1	C14	C13	C12	108.52
C11	O8	1.429	1	O11	C15	C14	110.16
C12	H12	0.980	1	O6	C5	C4	111.52
C12	C13	1.524	1	C5	C4	O2	108.97
C12	O9	1.419	1	O2	C8	C9	107.42
C13	H13	0.980	1	C7	C8	C9	112.91
C13	C14	1.531	1				
C13	O10	1.420	1				
C14	H14	0.980	1				
C14	C15	1.515	1				
C14	O7	1.436	1				
C15	H15A	0.970	1				
C15	H15B	0.971	1				
C15	O11	1.427	1				
O3	H3	0.820	1				
O4	H4A	0.821	1				
O5	H5A	0.820	1				
O8	H8A	0.820	1				
O9	H9	0.820	1				
O10	H10A	0.819	1				
O11	H11A	0.820	1				
O1W	H1W	0.856	1				
O1W	H2W	0.776	1				
O2W	H3W	0.847	1				
O2W	H4W	0.993	1				

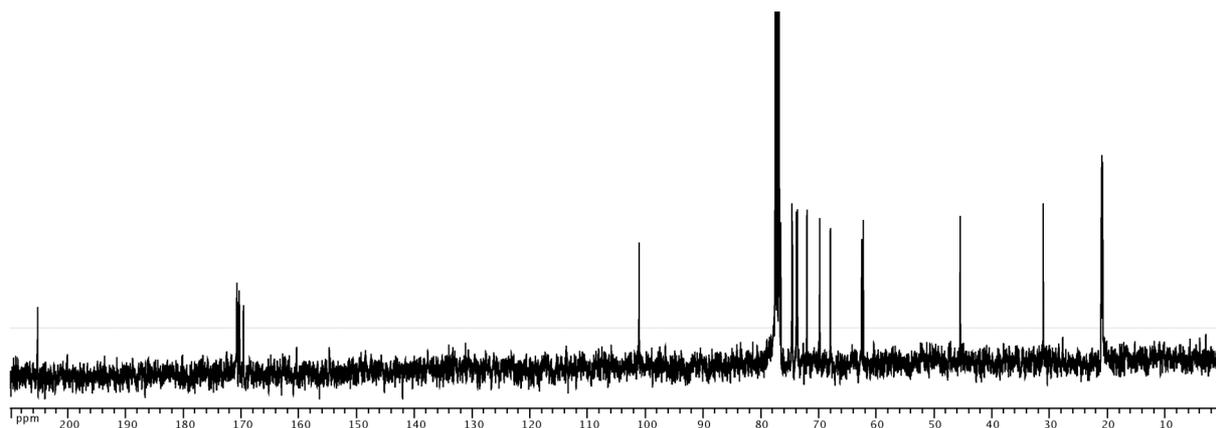
Mesures des longueurs et des angles de liaisons dans la maille cristalline de **32**.

Synthèse du 1-(2,3-Di-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)propan-2-one **35**:

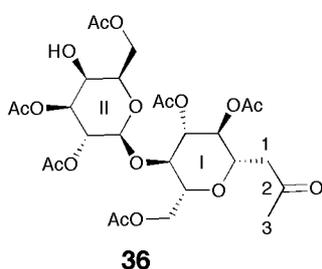


La cétone 1-β-D-Lactosylpropan-2-one **32** (2 g, 5.2 mmol) est dissoute dans de la DMF (15ml) avec du benzaldehyde dimethyl acetal (2 ml, 2.03 g, 13.3 mmol) et de l'acide *p*-tolènesulfonique monohydrate (30 mg, cat.). Cette solution est placée dans l'évaporateur rotatif à une pression de 50 mBar et une température de 50 °C pendant 3 h. La réaction est ensuite neutralisée par l'addition de triéthylamine puis diluée dans un mélange d'Et₂O et d'AcOEt 99/1 (200 ml) pour donner un précipité brun. Ce solide est récupéré par filtration puis dilué dans un mélange pyridine/anhydride acétique 1/1 (40 ml) et agité pendant 12 h. L'excès d'anhydride acétique est éliminé par l'addition de MeOH (20 ml) à la réaction refroidie à 0°C. Les solvants sont éliminés et le résidu dissous dans de l'acide acétique à 80% dans l'eau (50 ml). La réaction est chauffée à 90 °C pendant 1 h 15 min puis refroidie à température ambiante. De la silice est ajoutée pour adsorber le produit brut en éliminant les solvants sous pression réduite. Une chromatographie sur gel de silice fournit le produit **35** sous la forme d'un solide blanc (1,06 g, 36% sur 3 étapes). *R_f* (Toluène/ Acétone 1/1) 0.26. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, assignation basée sur une expérience COSY) : 5.21-5.08 (*m*, 2H, H-C(2^{II},3^I)), 4.84 (*dd*, *J*=10.3, 3, 1H, H-C(3^{II})), 4.79 (*t*, *J*= 19.4, 1H, H-C(2^I)), 4.45 (*d*, *J*= 7.8, 1H, H-C(1^{II})), 4.43-4.37 (*m*, 1H, H-C(6^I)), 4.13-4.06 (*m*, 1H, H-C(4^{II})), 4.02 (*dd*, *J*=12.2, 5.8, 1H, H-C(6^I)), 3.94-3.78 (*m*, 3H, H-C(1^I, 6a^{II}, 6b^{II})), 3.75 (*t*, *J*=18.7, 1H, H-C(4^I)), 3.63-3.56 (*m*, 1H, H-C(5^I)), 3.53 (*t*, 10.3, 1H, H-C(5^{II})), 3.16 (*d*, *J*=4.8, 1H, HO-C(4^{II})), 2.71 (*dd*, *J*=8.3, 4.5, 1H, HO-C(6^{II})), 2.62 (*dd*, *J*=15.4, 9, 1H, H-C(1a)), 2.62 (*dd*, *J*=15.4, 2.6, 1H, H-C(1b)), 2.13 (*s*, 3H, H-C(3)), 2.06, 2.04, 2.01, 1.99 (plusieurs singulets, 5 acétyles). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃ assignation basée sur une expérience HSQC) 205.22 (C(2)), 170.74, 170.62, 170.33, 170.25, 169.59 (5-OOCCH₃), 101.07 (C(1^{II})), 76.73, 76.53, 74.61, 74.53, 73.81, 73.65, 72.00 (C(2^I)), 69.79 (C(2^{II})), 67.95 (C(4^{II})), 62.53 (C(6^I)), 62.25 (C(6^{II})), 45.47 (C(1)), 31.09 (C(3)), 21.07, 20.95, 20.94, 20.82, 20.78 (5-COCH₃). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*. calculée pour C₂₅H₃₆NaO₁₆ 615.1896 [M+Na]⁺, observée 615.1949; analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₅H₃₆O₁₆: C 50.67, H 6.12; valeurs obtenues: C 50.56, H 6.094.



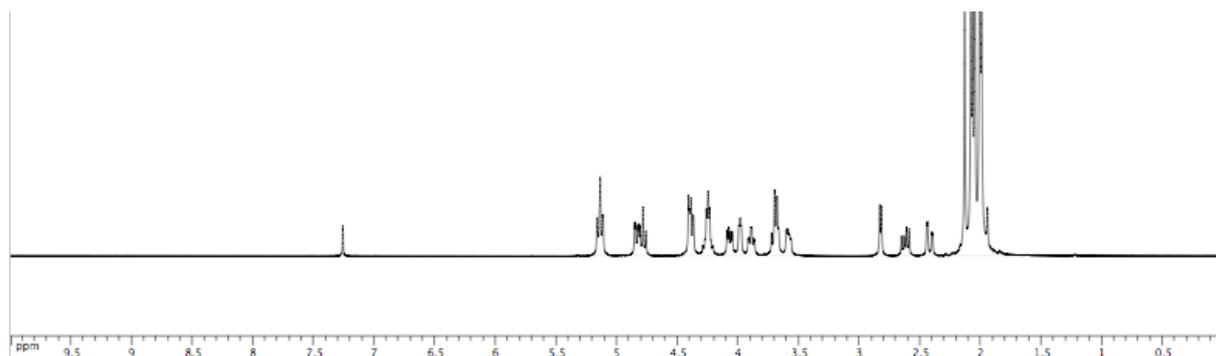


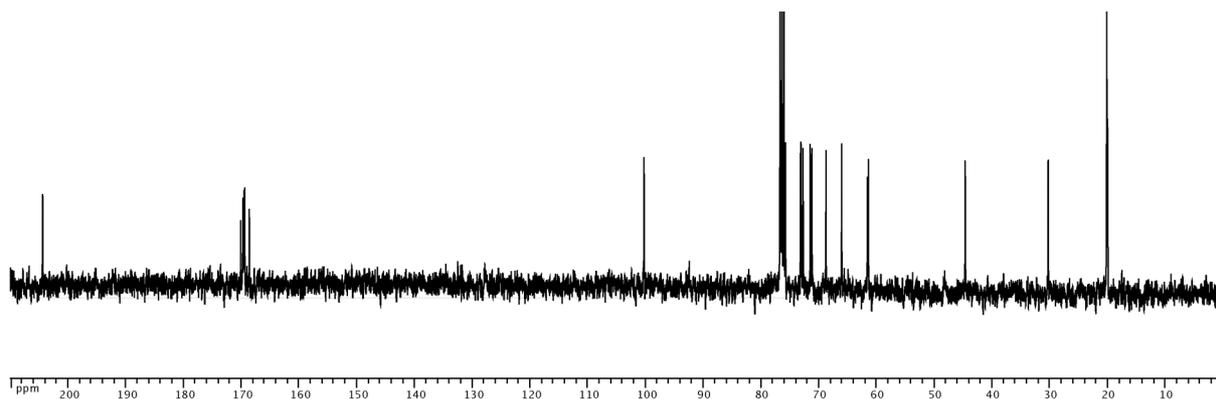
Synthèse du 1-(2,3,6-Tri-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)propan-2-one **36**:



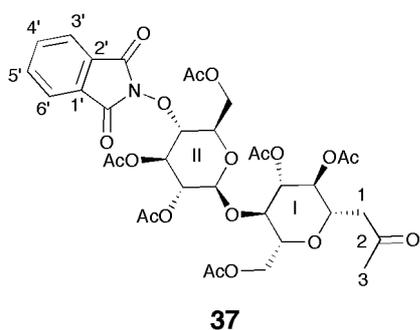
Le diol 1-(2,3-di-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)propan-2-one **35** (1.95 g) est dissous dans de l'anhydride acétique (100 ml) sous atmosphère d'azote. Du tamis moléculaire (9 g) est alors ajouté à la réaction. Cette suspension est agitée à température ambiante sous atmosphère d'azote jusqu'à *quasi* disparition du produit de départ, c'est-à-dire 96h. La réaction est filtrée et le filtrat refroidi à 0°C avant l'addition de méthanol (100 ml). Après 2 h d'agitation à température ambiante la solution est diluée par de l'AcOEt. La

phase organique est neutralisée par lavage avec une solution aqueuse de Na₂CO₃, puis séchée par de la saumure et du MgSO₄. Après filtration et concentration sous pression réduite le produit brut est chromatographié sur gel de silice (Toluène/Acétone 4/1→3/1) pour donner le produit sous la forme d'un solide blanc (1.57 g, 75%). R_f (Toluène/ Acétone 1/1) 0.54. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, assignation basée sur une expérience COSY) : 5.20-5.06 (*m*, 2H, H-C(2^{II},3^I)), 4.84 (*dd*, J=10.1, 3, 1H, H-C(3^{II})), 4.78 (*t*, J= 19.4, 1H, H-C(2^I)), 4.4 (*d*, J= 7.4, 1H, H-C(1^{II})), 4.41-4.34 (*m*, 1H, H-C(6^I)), 4.31-4.19 (*m*, 2H, H-C(6^{II})), 4.07 (*dd*, J=12.1, 5.4, 1H, H-C(6^I)), 4.02-3.95 (*m*, 1H, H-C(4^{II})), 3.89 (*dt*, J=9.7, 3.3, 1H, H-C(1^I)), 3.74-3.64 (*m*, 2H, H-C(5^{II},4^I)), 3.62-3.54 (*m*, 1H, H-C(5^I)), 2.83 (*d*, J=5.4, 1H, HO-C(4^{II})), 2.62 (*dd*, J=16.6, 9.1, 1H, H-C(1a)), 2.42 (*dd*, J=16.6, 2.7, 1H, H-C(1b)), 2.13 (*s*, 3H, H-C(3)), 2.08, 2.07, 2.05, 2.01, 1.99 (plusieurs singulets, 6 acetyls). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃ assignation basée sur une expérience HSQC) 205.16 (C(2)), 170.88, 170.49, 170.30, 170.17, 170.37 (plusieurs -OOCCH₃), 100.02 (C(1^{II})), 76.83 (pic superposé avec celui du solvant), 76.54, 73.91, 73.80, 73.48, 72.24, 71.95, 69.51, 66.80, 62.33, 66.80 (C(4^{II})), 45.47 (C(1)), 31.04 (C(3)), 20.90, 20.78, 20.72 (plusieurs -COCH₃). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*: calculée pour C₂₇H₃₈NaO₁₇ 657.2001 [M+Na]⁺, observée 657.2042; analyse élémentaire calculée (%) pour C₂₇H₃₈O₁₇: C 51.10, H 6.04; valeurs obtenues: C 50.67, H 6.057.





Synthèse du 1-(2,3,6-Tri-*O*-acetyl-4-*O*-phtalimido- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)propan-2-one **37**:



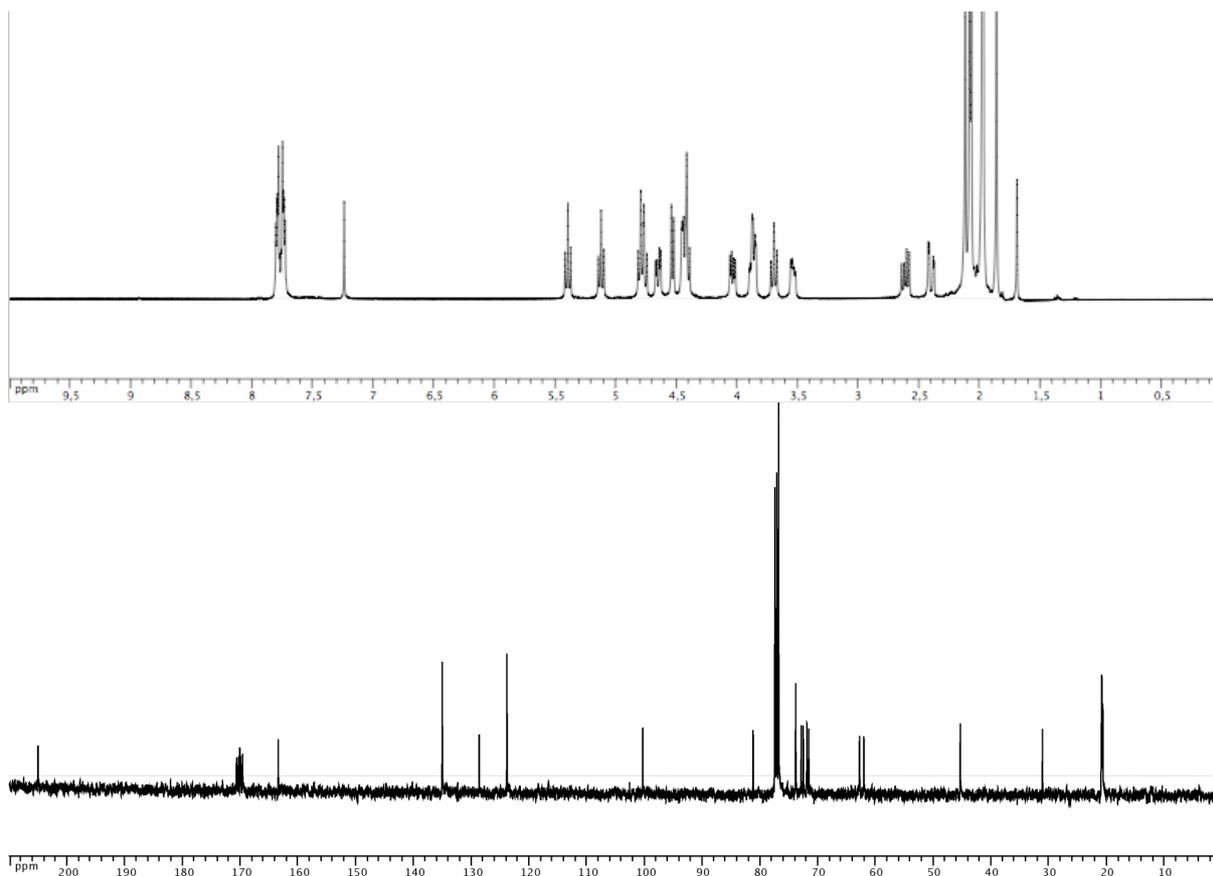
37

L'alcool 1-(2,3,6-Tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)propan-2-one **36** (500 mg, 0.78 mmol) est dissous dans un mélange de CH₂Cl₂ sec (7.5 ml) et de pyridine sèche (2 ml) sous atmosphère d'azote. Cette solution est refroidie à 0°C par un bain de glace avant l'addition goutte-à-goutte d'anhydride triflique Tf₂O. Après 2 h à 0°C et 30 min à température ambiante la réaction est diluée par du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée par une solution saturée de NaHCO₃, une solution de HCl 1N, de la saumure, puis

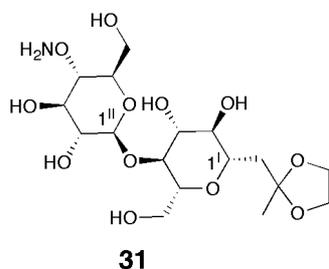
séchée sur MgSO₄. Une filtration et la concentration à froid de cette solution donne le triflate brut qui est utilisé directement sans autre purification.

Ce triflate est dissous dans de la DMF sèche (5 ml) sous atmosphère d'azote puis traité par le sel de potassium de la N-hydroxyphtalimide⁶ (210 mg, 3 mmol, 3.8 eq) et l'ether couronne 18-Crown-6 (100mg, 3.7 mmol, 4.8 eq). Cette suspension est agitée à température ambiante pendant 20 h puis diluée par de l'AcOEt. La phase organique est lavée 3 fois par une solution saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. Après filtration et concentration sous pression réduite on obtient le produit brut qui est chromatographié sur gel de silice (Toluène/Acétone 4/1) puis recristallisé dans de l'éthanol pour donner le produit **37** (329 mg, 54%). R_f (Toluène/Acétone 4/1) 0.44. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, assignation basée sur une expérience COSY): 7.83-7.70 (*m*, 4H, H-C(3',4',5',6') arom.), 5.40 (*t*, J=8.9, 1H, H-C(3')), 5.12 (*t*, J=9.3, 1H, H-C(3'')), 4.83-4.72 (*m*, 2H, H-C(4', 2'')), 4.65 (*dd*, J= 12.4, 1H, H-C(6a')), 4.56 (*d*, J=7.4; 1H, H-C(1'')), 4.48-4.38 (*m*, 3H, H-C(6'', 6b', 2')), 4.04 (*dd*, J=11.9, 5.4, 1H, H-C(6'')), 3.91-3.82 (*m*, 2H, H-C(1', 5')), 3.70 (*t*, J=9.3, 1H, H-C(4')), 3.58-3.50 (*m*, 1H, H-C(5'')), 2.61 (*dd*, J=16.4, 9, 1H, H-C(1a)), 2.42 (*dd*, J=16.4, 3.1, 1H, H-C(1b)), 2.12 (*s*, 3H, HC(3)), 2.12, 2.08, 2.07 (plusieurs singulets, 6 acetyls). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃ assignation basée sur une expérience HSQC) 205.08 (C(2)), 170.70, 170.38, 170.14, 170.11, 169.95, 169.64 (6-OOCC₃H₃), 163.47 (Phtalimide-CON), 135.07 (C(1', 2')), 128.67(C(4',5')), 123.87 (C(3', 6')), 100.35 (C(1'')), 81.24 (C(4')), 76.84 (C(4'',5'')), 73.87 (C(3'')), 72.91 (C(3',1')), 72.56, 71.93, 71.60 (C(5')), 62.81 (C(6')), 62.06 (C(6'')), 45.37 (C(1)), 31.13 (C(3)), 20.95, 20.85, 20.79, 20.70, 20.66 6(-COCH₃). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*: calculée pour C₃₅H₄₁NaO₁₉ 802.2165 [M+Na]⁺, observée 802.2169; analyse élémentaire calculée (%) pour C₃₅H₄₁NO₁₉: C 53.92, H 5.30, N 1.80; valeurs obtenues: C 53.65, H 5.193, N 1.812.

⁶ The Performance of Phtalimide-*N*-oxyl Anion. M. G. Dekamin, F. M. Moghaddam, H. Saeidian, S. Mallakpour. *Monatsch. Chem.* **2006**, 137, 1591-1595.



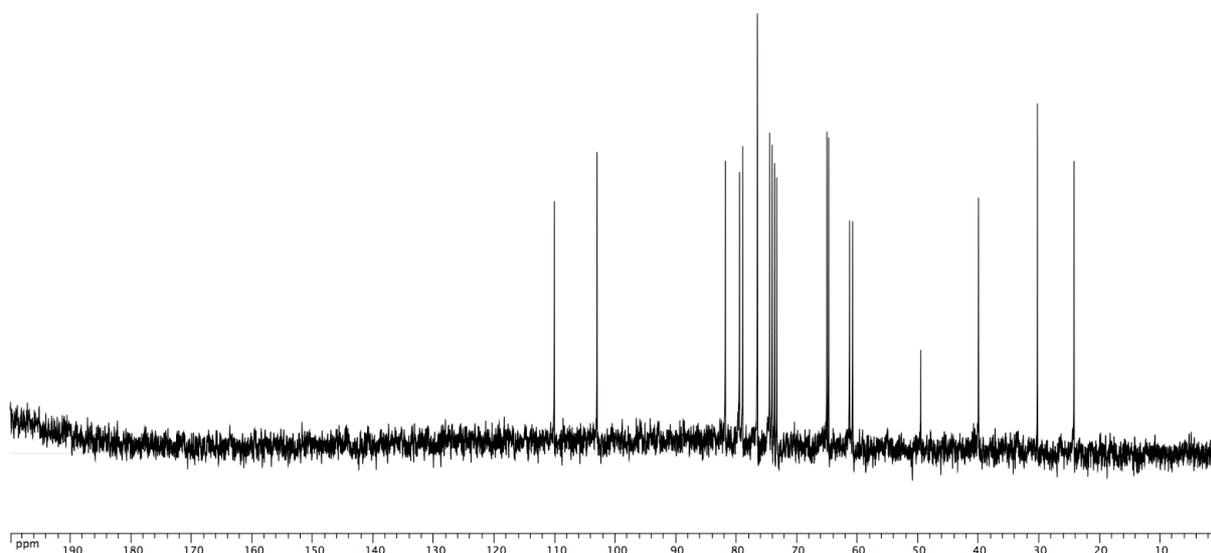
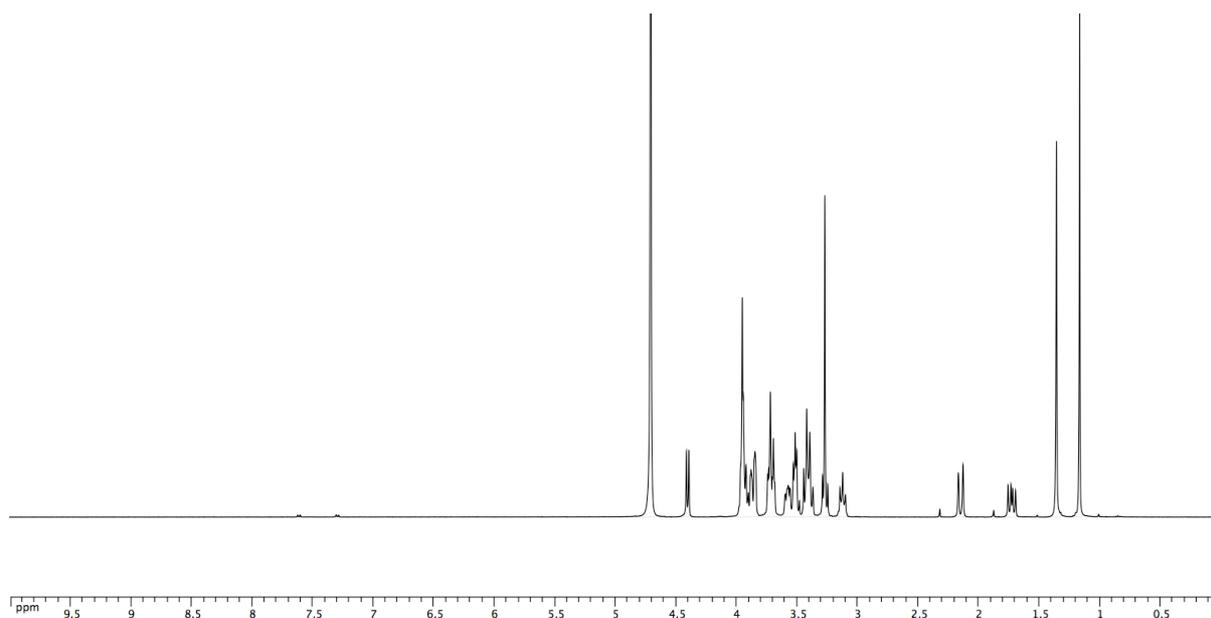
Synthèse du 1-(4-*O*-amino- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)propan-2-one ethylene acetal **31**:



La méthyle cétone **37** 1-(2,3,6-tri-*O*-acetyl-4-*O*-phtalimido- β -D- glucopyranosyl -(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)propan-2-one (100 mg, 0.128 mmol) est mise en suspension dans une solution d'éthylène glycol (2.5 ml) et de triméthylorthoformate (1.5ml). De l'acide *p*-toluène sulfonique est alors ajouté en quantité catalytique (27 mg). De l'AcOEt est ajouté pour solubiliser le produit de départ (20 ml). Après agitation à température ambiante pendant 12h sous atmosphère d'azote la réaction est diluée dans 200 ml d'AcOEt. La phase

organique est alors lavée deux fois par une solution saturée de NaHCO₃ et de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour fournir le produit brut qui est directement déprotégé par dissolution dans un mélange 1/1 butylamine/méthanol (10 ml) et agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 12h. La réaction est ensuite concentrée sous vide, puis coévaporée 3 fois avec de l'éthanol, puis séchée sous rampe à vide pendant 1h. Le produit brut est chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 6/4) pour donner le produit **31** (40 mg, 71%). R_f (CH₂Cl₂/MeOH 6/4) 0.48. ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) : 4.48 (*d*, J= 8.1, 1H, H-C(1^{II})), 4.08-3.89 (*m*, 6H), 3.84-3.73 (*m*, 3H), 3.69-3.54 (*m*, 3H), 3.54-3.42 (*m*, 3H), 3.39-3.30 (*m*, 1H), 3.25-3.15 (*m*, 1H), 2.22 (*d*, J=15.3, 1H, H-C(1^a)), 1.8 (*dd*, J=15.3, 9.6, 1H, H-C(1^b)), 1.43 (*s*, 3H, H-C(3)). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 110.10 (C(2)), 103.02 (C(1^{II})), 81.84 (C(4^{II})), 79.51, 78.98, 76.54 (-OCH₂CH₂O- dioxolane), 74.53, 74.12, 73.70, 73.35, 65.08, 64.78, 61.33, 60.82 (C(1^I)), 40.02 (C(1)), 24.24 (C(3)). HR-ESI-MS(pos.): *m/z*. calculée pour C₁₇H₃₁NNaO₁₂ 464.174 [*M*+Na]⁺, observée 464.172.

Partie Expérimentale
Chapitre IV: Section Expérimentale



Synthèse du polymère dynamique 18P

Le précurseur de monomère **18** (8.93 mg, 0.04 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O. 10 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à cette solution qui est ensuite chauffée à 50 °C pendant 24h. La réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant. Le pD est ajusté par addition de 1 mL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 4.

Synthèse du polymère dynamique 19P

Le précurseur de monomère **10** (10.1 mg, 0.04 mmol) est dissous dans 1 ml de D₂O. 10 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à cette solution qui est ensuite chauffée à 50 °C pendant 24h. La réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant. Le pD est ajusté par addition de 1 mL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 4 contenant le monomère **14** (7.77 mg, 0.04 mmol).

Synthèse du polymère dynamique 27

Le précurseur de monomère **30** (98 mg, 0.35 mmol) est dissous dans 3.5 ml de D₂O. Cette solution est divisée en 7 volumes de 500 µL auxquels est rajoutés 10 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O. après 3 heures à température ambiante la déprotection de la fonction acétal de **30** est complète. Chaque réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant. Le pD est ajusté par addition de 100 µL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 5 ou NaD₂PO₃/Na₂DPO₃ à pD= 6.

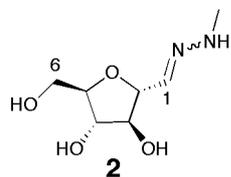
Synthèse du polymère dynamique 31P

Le précurseur de monomère **31** (22 mg, 50 µmol) est dissous dans 2 ml de D₂O. Cette solution stock est répartie dans 4 tubes RMN chacun contenant alors 500 µL. 5 µL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à la solution contenue dans chaque tube. Après 2 h à température ambiante la déprotection de la fonction acétal de **31** est complète. La réaction est alors neutralisée par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant. Le pD est ajusté par addition de 500 µL d'une solution concentrée de tampon (500 mM) AcOD-*d*₃/NaAcO-*d*₃ à pD= 5.

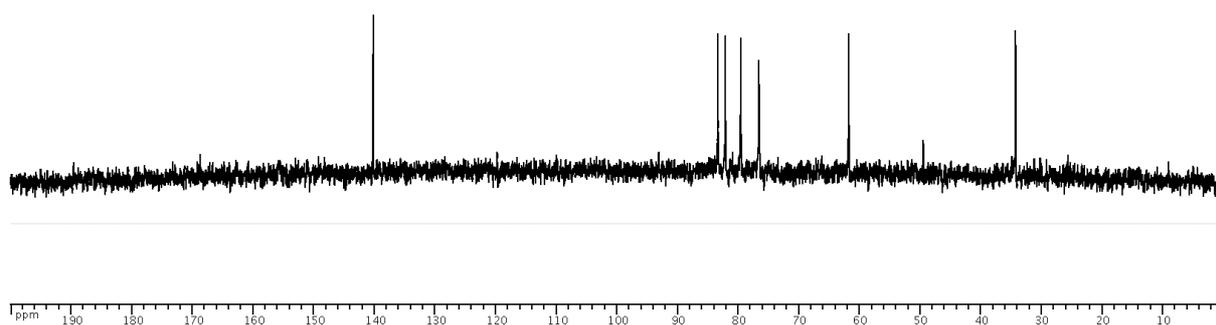
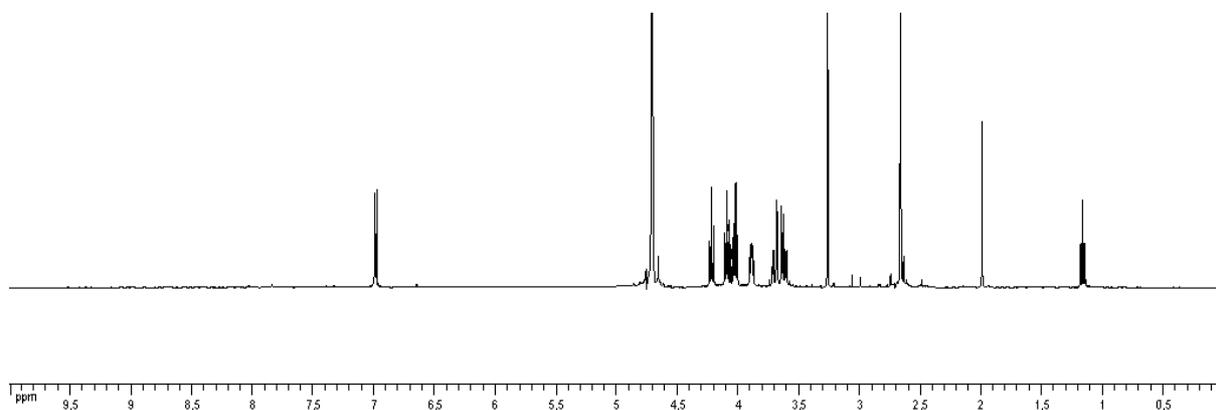
CHAPITRE V: Section expérimentale

Synthèse des monomères et précurseurs de monomères

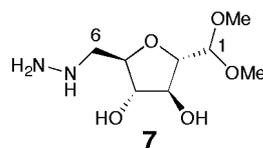
Synthèse du 2,5-anhydro-D-mannose methyl hydrazone 2:



Le 2,5-anhydro-D-mannitol¹ (400 mg, 2.2 mmol) est dissous dans 10 ml d'eau. La methylhydrazine (233 μ l, 203 mg, 4.4 mmol) est ensuite ajoutée à la solution d'aldéhyde. La réaction est ensuite agitée à température ambiante pendant 12 h. Après évaporation du solvant sous pression réduite le produit brut chromatographié sur gel de silice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8/2) pour donner le produit **2** sous forme d'un sirop incolore (250 mg, 60%). ¹H-RMN (400 MHz, D_2O): 7.07 (*d*, $J=6.6$, 1H, H-C(1)), 4.30 (*t*, $J=6.6$, 1H, H-C(2)), 4.18 (*t*, $J=6.6$, 1H), 4.10 (*t*, $J=6.6$, 1H), 4.00-3.94 (*m*, 1H), 3.78 (*dd*, $J=12$, 3.4, 1H, H-C(6)), 3.7 (*dd*, $J=12$, 5.4, 1H, H-C(6)), 2.74 (*s*, 3H, =NN-CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, D_2O): 140.20 (C(1)), 83.39 (C(2)), 82.15, 79.61, 76.60, 61.80 (C(6)), 34.29 (=NNCH₃). HR-ESI-MS *m/z* calculée pour $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{LiN}_2\text{O}_4$ [$M+\text{Li}$]⁺= 197.1108; valeur obtenue 197.1112.



Synthèse du 2,5-anhydro-6-hydrazino-D-mannose dimethyl Acetal 7:



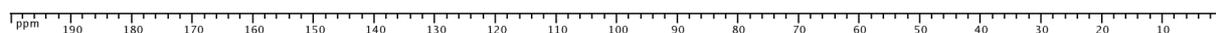
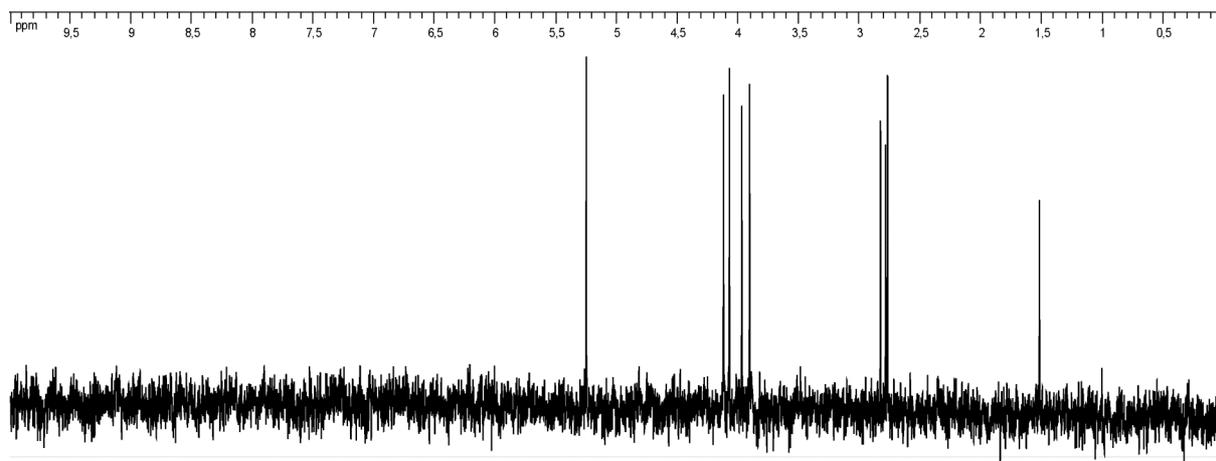
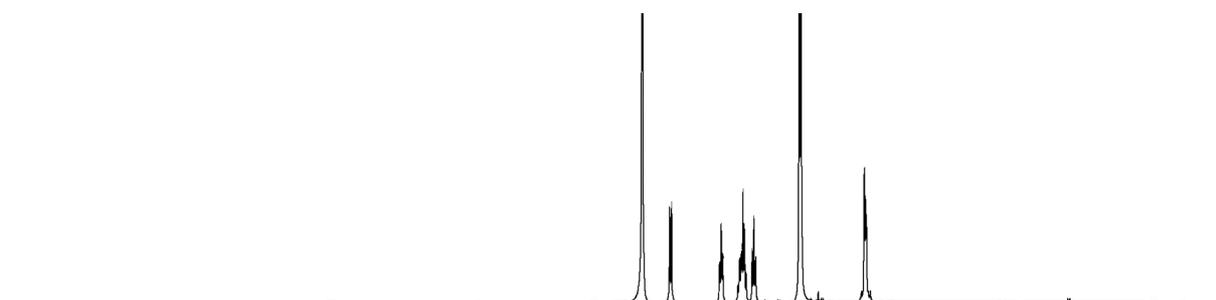
Le composé **6**² (500 mg, 1.38 mmol) est dissous dans de l'hydrazine monohydrate (5 ml) refroidie à 0°C. La réaction est réchauffée à température ambiante puis agitée sous atmosphère d'azote à cette température pendant 24 h. L'hydrazine monohydratée est ensuite évaporée sous pression réduite (attention, à petite échelle

¹ cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 4 page 176.

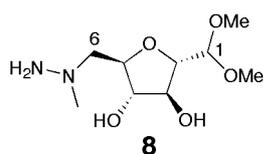
² cf. Chapitre IV: Analogues de Polysaccharides Naturels: La jonction oxime référence 7 page 180.

Partie Expérimentale
Chapitre V: Section Expérimentale

cette opération ne nécessite pas de précautions particulières, mais l'hydrazine anhydre étant un réactif extrêmement toxique et inflammable il est conseillé de prendre des mesures de sécurité si la distillation de l'hydrazine est menée sur plus grande échelle). Le résidu est dissous dans un minimum d'eau puis placé sur une colonne de résine échangeuse d'ions *Dowex 21K CO₃²⁻*. Le produit est élué avec de l'eau distillée. Les fractions contenant le produit peuvent être révélées par traitement des chromatographies sur couche mince avec de la ninhydrine ou du *p*-anisaldéhyde. Le produit brut est ensuite chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH/35%NH₄OH 75/50/5) pour donner le produit **7** sous la forme d'un solide incolore (160 mg, 52%). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) 4.56 (*d*, J= 6.3, 1H, H-C(1)), 4.14 (*t*, J= 5, 1H,), 4.04-3.82 (*m*, 2H), 3.87 (*t*, J= 6.3, H-C(2)), 3.50 (*s*, 3H, -OCH₃), 3.48 (*s*, 3H, -OCH₃), 3.00-2.90 (*m*, 2H, H-C(1, 6)). ¹³C (100 MHz, D₂O) 105.04 (C(1)), 82.41, 81.43, 79.40, 78.10, 56.51, 55.67, 55.34. HR-ESI-MS *m/z* calculée pour C₈H₁₈NaN₂O₅ [*M*+Na]⁺= 245.1108; valeur obtenue 245.1085.



Synthèse du 2,5-anhydro-6-(*N*-methyl-hydrazino)-D-mannose dimethyl acetal **8:**

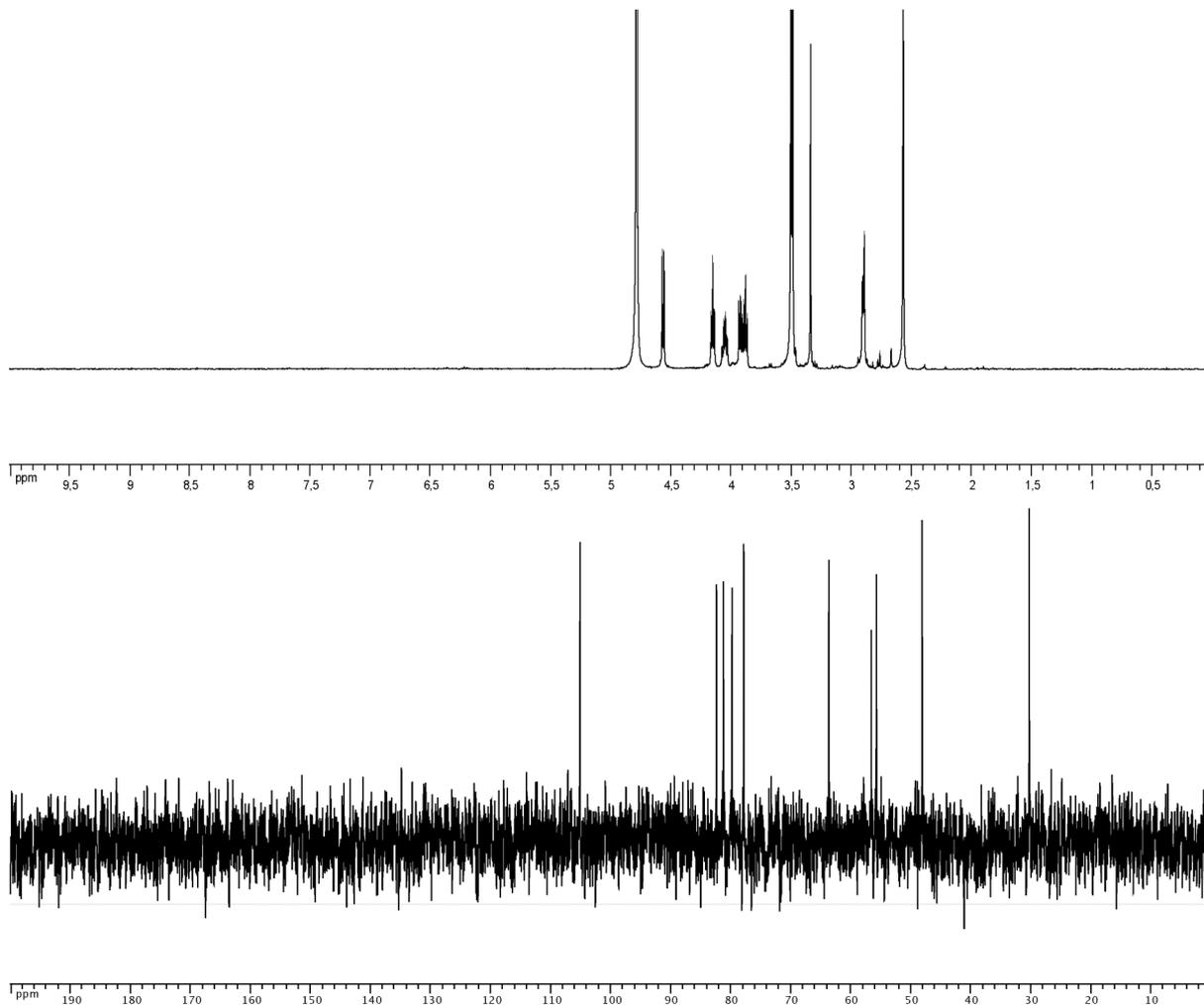


Le tosylate **6**² (430 mg, 1.18 mmol) est dissous dans de la methylhydrazine (5 ml) refroidie à 0°C. La réaction est réchauffée à température ambiante puis agitée sous atmosphère d'azote à cette température pendant 24 h. La methylhydrazine est ensuite évaporée sous pression réduite (attention, à petite échelle cette opération ne

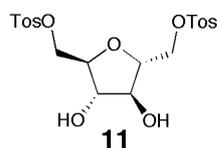
nécessite pas de précautions particulières, mais la methylhydrazine anhydre étant un réactif extrêmement toxique et inflammable il est conseillé de prendre des mesures de sécurité si sa distillation est menée sur plus grande échelle). Le résidu est dissous dans un minimum d'eau, puis placé sur une colonne de résine échangeuse d'ions *Dowex 21K CO₃²⁻*. Le produit est élué avec de l'eau distillée. Les fractions contenant le produit peuvent être révélées par

Partie Expérimentale
Chapitre V: Section Expérimentale

traitement des CCM avec de la ninhydrine ou du *p*-anisaldéhyde. Le produit brut est ensuite chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 4/1 → 3/1) pour donner le produit **7** sous la forme d'un solide incolore (165 mg, 63 %). R_f 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH 4/1) ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) 4.5 (*d*, J= 5.9, 1H, H-C(1)), 4.15 (*t*, J= 5.3, 1H,), 4.08-4.02 (*m*, 1H), 3.95-3.90 (*m*, 1H), (3.88 (*t*, J= 5.9, H-C(2)), 3.50 (*s*, 3H, -OCH₃), 3.49 (*s*, 3H, -OCH₃), 2.95-2.86 (*m*, 2H, H-C(1, 6)), 2.57 (*s*, 3H, H₃CNHNH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O) 105.11 (C(1)), 82.38, 81.22, 79.79, 77.84, 63.67, 56.60, 55.73, 48.12 (H₂NNCH₃-R). HR-ESI-MS *m/z* calculée pour C₉H₂₀NaN₂O₅ [M+Na]⁺= 259.1264; valeur obtenue 259.1230.



Synthèse du 2,5-anhydro-1,6-di-O-tosyl-D-mannitol **11**:



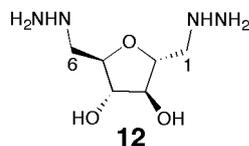
Ce composé a été préparé en adaptant une procédure décrite dans la littérature.³ Une solution de 2,5-anhydro-D-mannitol **9** (5 g, 30 mmol) dans de la pyridine sèche (100 ml) est mise sous atmosphère d'azote puis refroidie avec un bain de glace. Du chlorure de tosylo (12,18 g, 63 mmol) est ensuite ajouté par petites portions étalées sur une heure. La réaction est réchauffée jusqu'à la température ambiante puis agitée une nuit (12 h). De l'eau est ajoutée à la réaction pour détruire l'excès de chlorure de tosylo. La pyridine est évaporée pour donner un résidu qui est dissous dans l'eau. Trois extractions successives par du CH₂Cl₂ sont combinées puis lavées avec une solution saturée de NaHCO₃, une solution 1 N de HCl, puis de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée

³ Cf. Chapitre IV: Analogues de polysaccharides naturels: La jonction oxime référence 6 page 180.

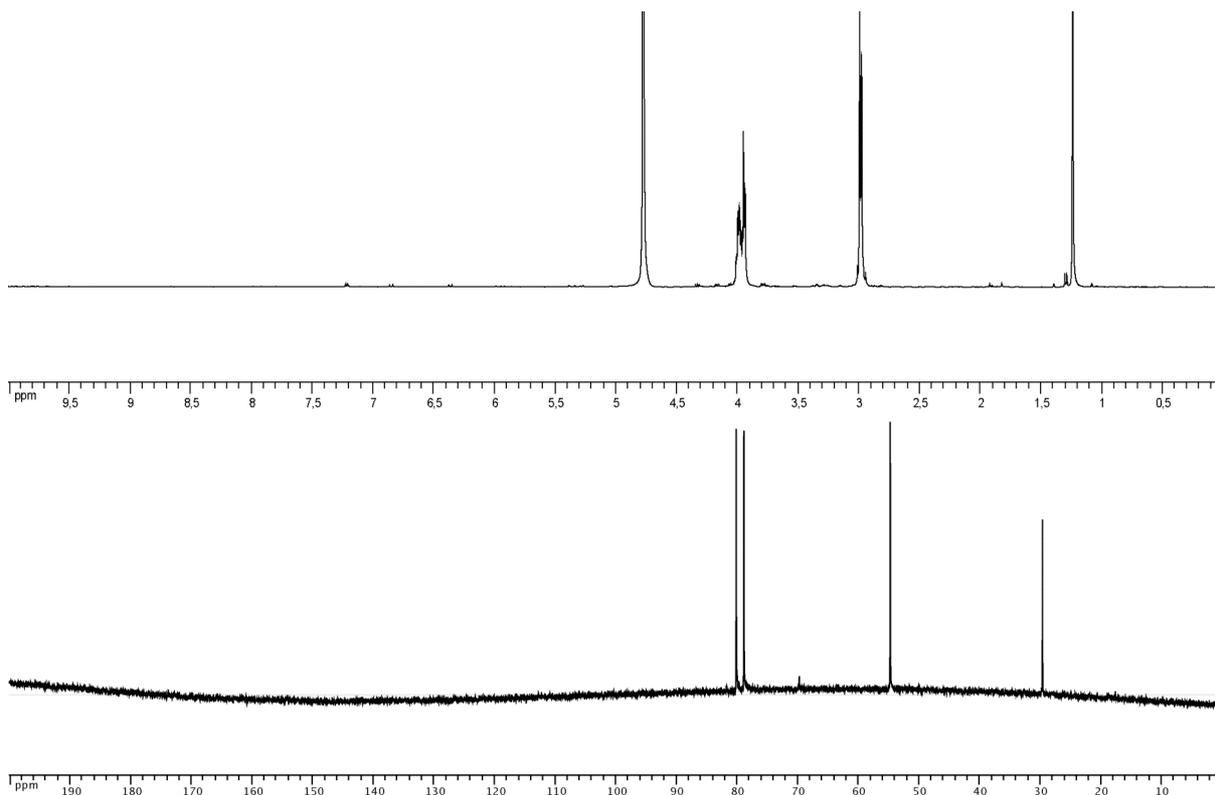
Partie Expérimentale
Chapitre V: Section Expérimentale

pour donner le produit brut. Une purification sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8/2 \rightarrow 1/1) fournit le produit **11** sous la forme d'un solide blanc (4.914 g, 10.4 mmol, 29%).

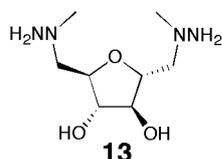
Synthèse du 2,5-anhydro-1,6-di-hydrazino-D-mannitol **12**:



Le tosylate **11** (500 mg, 1.05 mmol) est dissous dans de l'hydrazine monohydrate (5 ml) refroidie à 0°C. La réaction est réchauffée à température ambiante puis agitée sous atmosphère d'azote à cette température pendant 24 h. L'hydrazine monohydrate est ensuite évaporée sous pression réduite (attention, à petite échelle cette opération ne nécessite pas de précautions particulières, mais l'hydrazine anhydre étant un réactif extrêmement toxique et inflammable il est conseillé de prendre des mesures de sécurité si la distillation de l'hydrazine est menée sur plus grande échelle). Le résidu est dissous dans un minimum d'eau puis placé sur une colonne de résine échangeuse d'ions *Dowex 21K CO₃²⁻*. Le produit est élué avec de l'eau distillée. Les fractions contenant le produit peuvent être révélées par traitement des chromatographies sur couche mince avec de la ninhydrine ou du *p*-anisaldéhyde. Le produit brut est ensuite chromatographié sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/35\%\text{NH}_4\text{OH}$ 75/50/12) pour donner le produit **12** sous la forme d'un sirop incolore (134 mg, 66%). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) 4.06-3.88 (*m*, 4H, H-C(2, 3, 4, 5)), 3.05-2.91 (*m*, 4H, H-C(1, 6)). ¹³C (100 MHz, D₂O) 80.81 (C(2, 5)), 79.54 (C(3, 4)), 55.40 (C(1, 6)). HR-ESI-MS *m/z* calculée pour C₆H₁₇N₄O₃ [*M*+H]⁺ = 193.1295; valeur obtenue 193.1309.



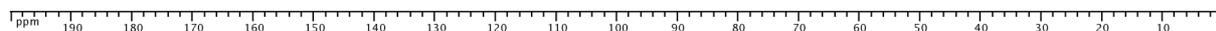
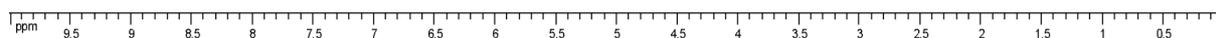
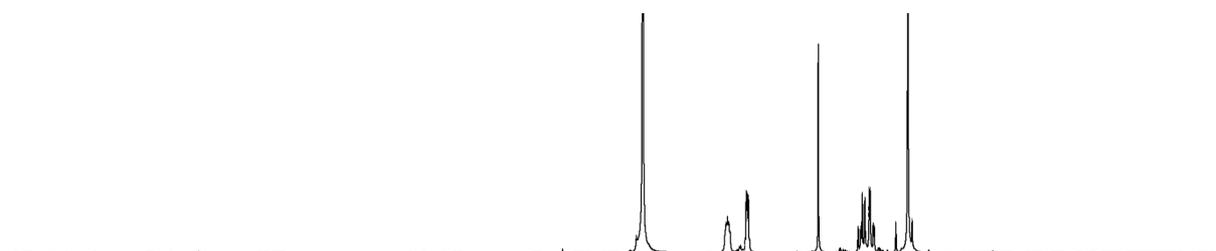
Synthèse du 2,5-anhydro-1,6-di-(*N*-methyl-hydrazino)-D-mannitol **13**:



Le tosylate **13** (500 mg, 1.05 mmol) est dissous dans de la methylhydrazine (5 ml) refroidie à 0°C. La réaction est réchauffée à température ambiante puis agitée sous atmosphère d'azote à cette température pendant 24 h. La methylhydrazine est ensuite évaporée sous pression réduite (attention, à petite échelle cette opération ne nécessite

Partie Expérimentale
Chapitre V: Section Expérimentale

pas de précautions particulières, par contre les hydrazines étant des réactifs extrêmement toxiques et inflammables il est conseillé de prendre des mesures de sécurité si la distillation de la méthylhydrazine est menée sur plus grande échelle). Le résidu est dissous dans un minimum d'eau puis placé sur une colonne de résine échangeuse d'ions *Dowex 21K CO₃²⁻*. Le produit est élué avec de l'eau distillée. Les fractions contenant le produit peuvent être révélées par traitement des chromatographies sur couche mince avec de la ninhydrine ou du *p*-anisaldéhyde. Le produit brut est ensuite chromatographié sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH/35%NH₄OH 75/50/12) pour donner le produit **13** sous la forme d'un sirop incolore (130 mg, 56%). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) 4.13-4.05 (*m*, 2H, H-C(2, 5)), 3.96-3.88 (*m*, 2H, H-C(3, 4)), 2.98 (*dd*, système AB, J= 13, 9, 2H, H_a-C(1, 6)), 2.90 (*dd*, système AB, J= 13, 3, 2H, H_b-C(1, 6)), 2.6 (*s*, 6H, 2 H₃C-NNH₂). ¹³C (100 MHz, D₂O) 74.20 (C(3, 4)), 73.44 (C(2, 5)), 57.66 (C(6)), 41.83 (H₂NNCH₃-R). HR-ESI-MS *m/z* calculée pour C₈H₂₁N₄O₃ [M+H]⁺= 221.1608; valeur obtenue 221.1610.



Synthèse du polymère dynamique **14P**

Le composé **9** (15.14 mg, 0.06 mmol) est dissous dans 1.5 ml de D₂O. 10 μL d'une solution de DCI à 35% dans le D₂O sont ajoutés à cette solution qui est ensuite chauffée à 50 °C pendant 24h. Après neutralisation par ajout d'un équivalent de NaOD par rapport à la quantité de DCI utilisée auparavant, on rajoute le monomère **11** (11.5 mg, 0.06 mmol) à cette solution de **10h**. La solution du polymère **14P** ainsi obtenue est ensuite divisée en 3 volumes de 500 μL auxquels sont rajoutés 500 μL de tampon (500 mM) au pH souhaité.

Synthèse du polymère dynamique 14MP

La procédure est identique à celle de la préparation de **14P** à l'exception de l'utilisation du monomère **12** à la place du monomère **11**.

ANNEXES

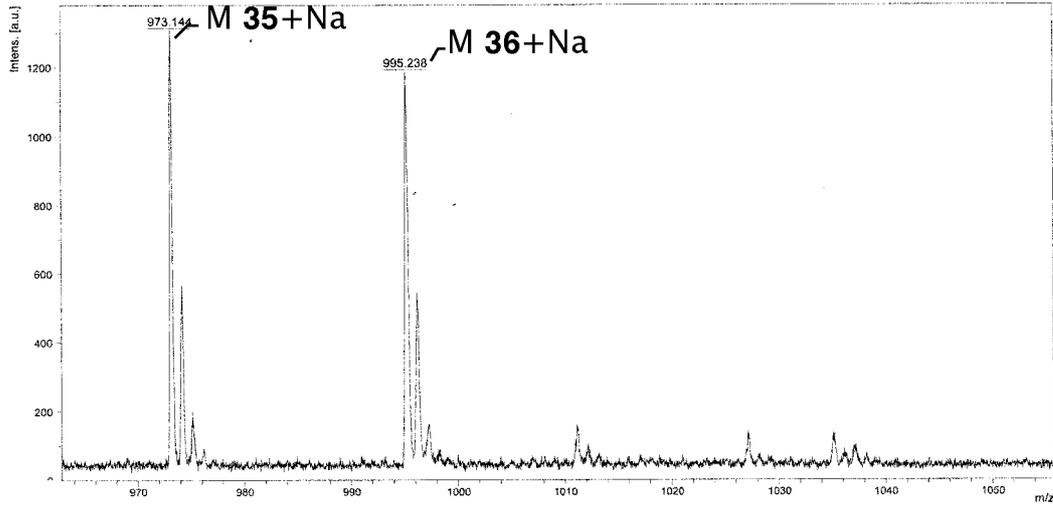
Annexe 1: Spectre MALDI de la bibliothèque constitutionnelle dynamique 25+26h à 6.25 mM

Le dépôt a été réalisé sur une matrice de ditranol. L'échantillon a ensuite été recouvert de matrice (méthode "sandwich").

YRH63 6,25 mM

D:\data\service\A45JB10_K111

Comment 1 YRH63 6.25
Comment 2 ditranol (acetone) sandwich



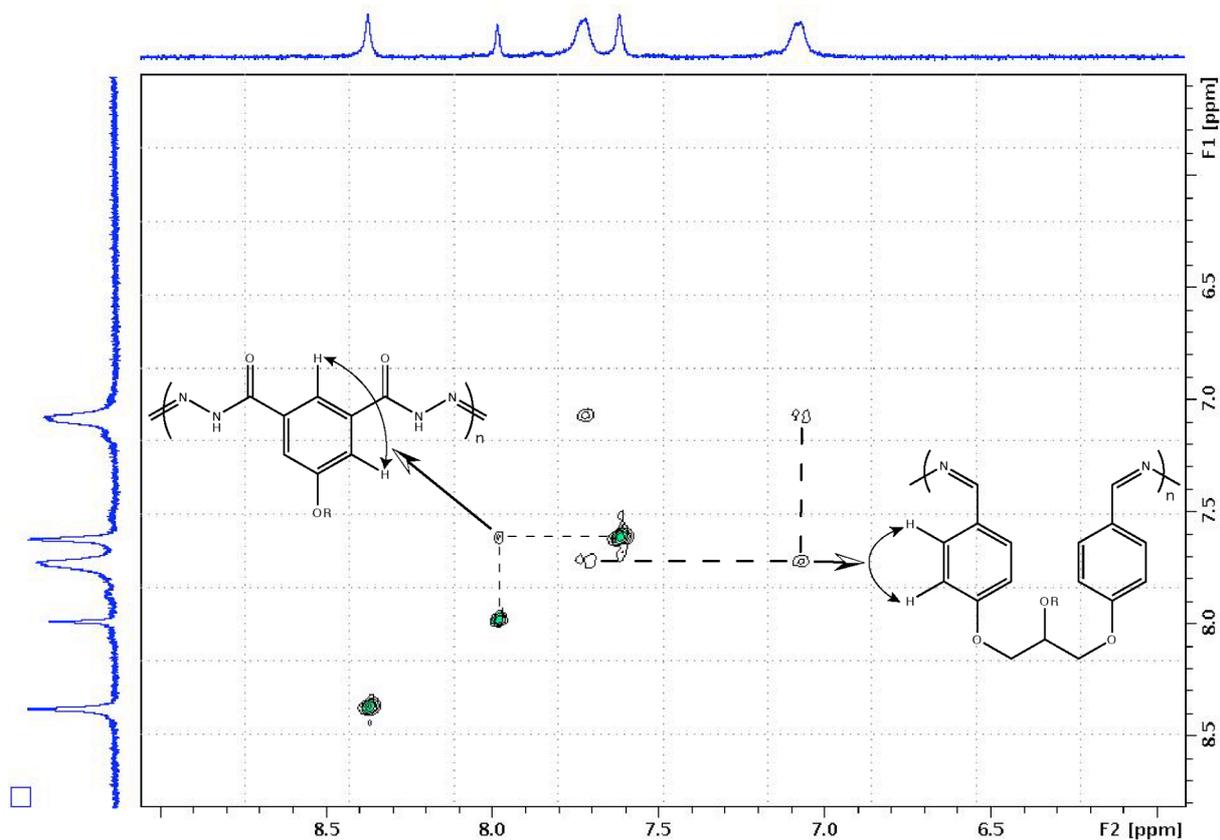
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 04/26/2006 03:59:20 PM

Annexe 2: Expérience de RMN COSY sur le polymère 4a5b dilué dans le DMSO- d_6 /D $_2$ O 5/1

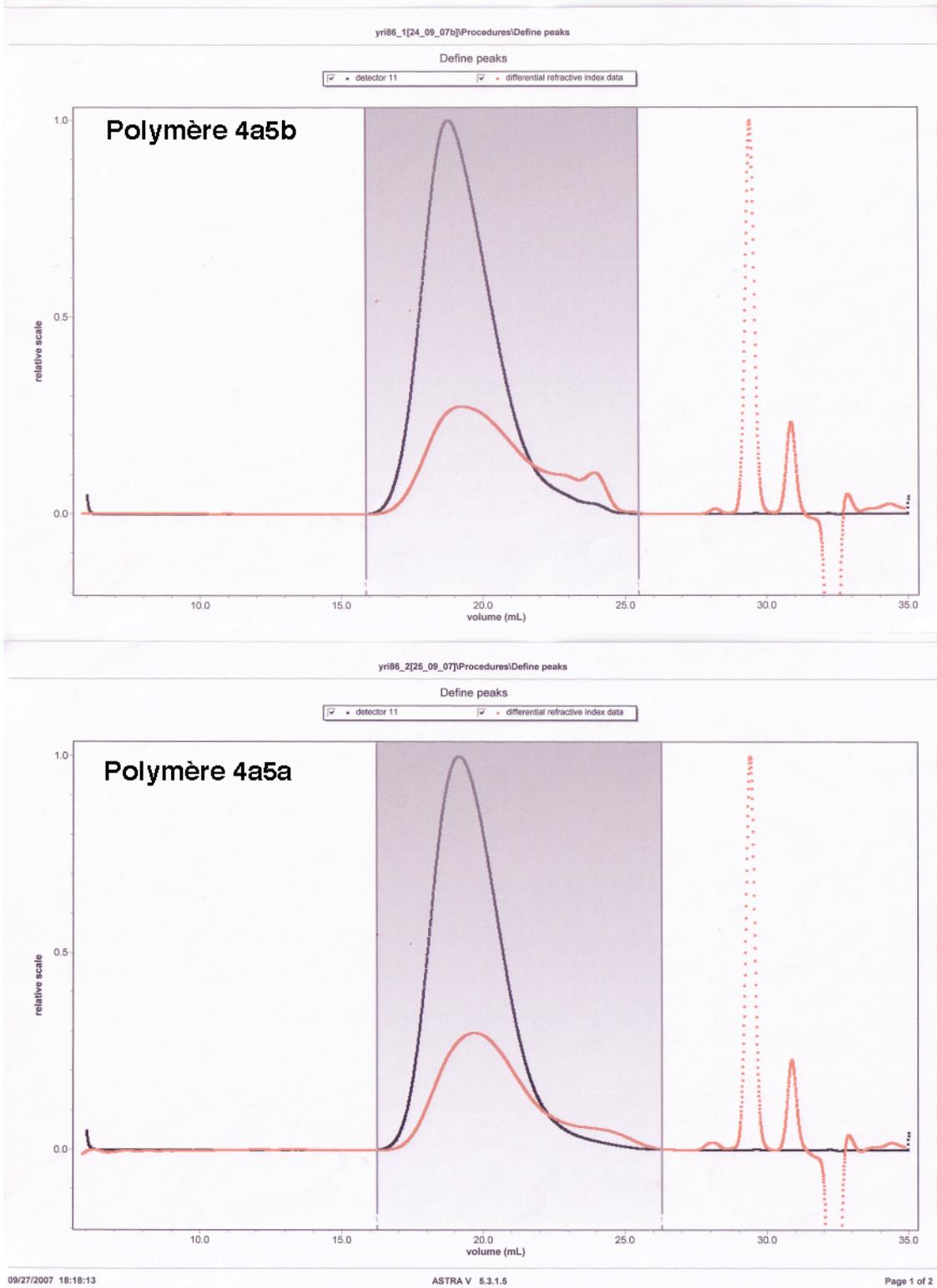
L'expérience a été réalisée sur un échantillon obtenu après dilution de 100 μ L d'une solution du polymère **4a5b** à une concentration en monomères de 10 mM à pD=4 dans 500 μ L de DMSO- d_6 .

Cette figure permet d'attribuer tous les signaux aromatiques de la chaîne principale du polymère **4a5b** comme indiqué figure III8 page 116.

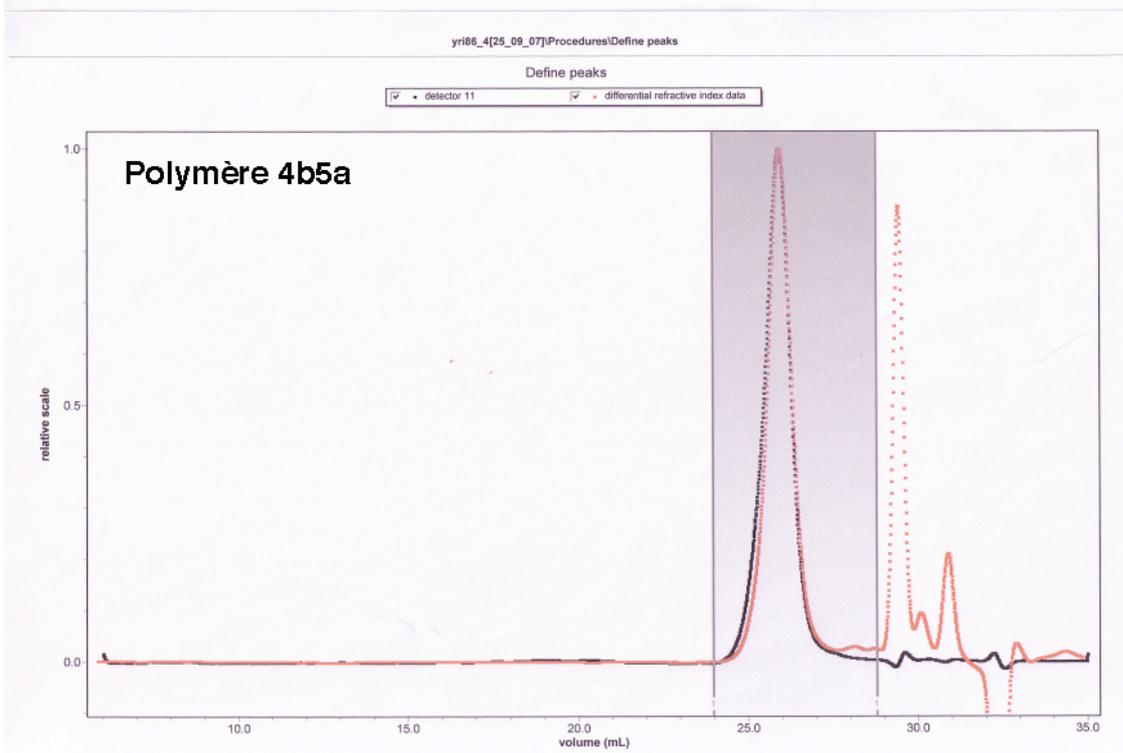
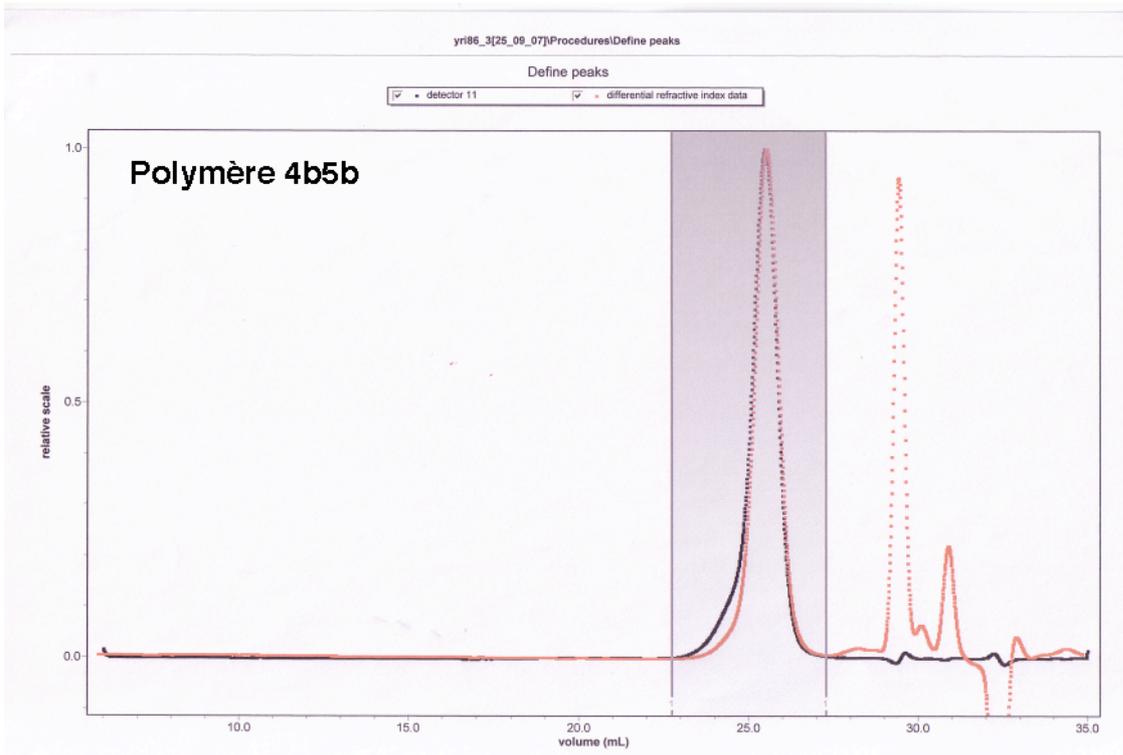


Annexe 3: Profils d'élution des glycopolymères 4a5a, 4a5b, 4b5a, et 4b5b.

Ces analyses GPC ont été réalisées sur des échantillons préparés à partir de solutions des monomères **4a**, **4b**, **5a**, et **5b** à une concentration initiale de 5 mM et à pD= 4 selon la méthode décrite dans la partie expérimentale du chapitre II.



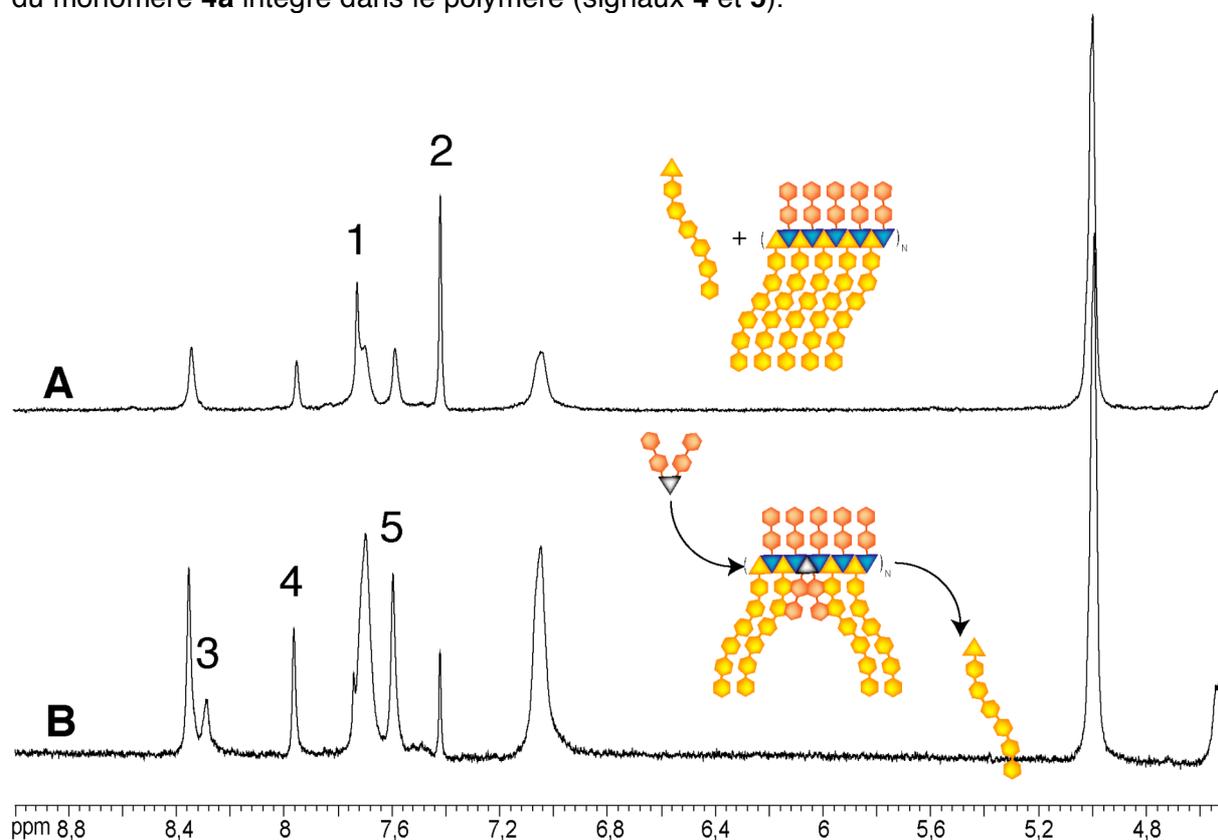
Annexes



Annexe 4: Attribution des signaux aromatiques de la chaîne principale lors du suivi des réactions d'échanges sur le polymère **4a5b** dans le DMSO-*d*₆/D₂O 5/1

L'attribution a été réalisée en comparant le spectre RMN du ¹H d'un échantillon obtenu après dilution de 100 μL d'une solution du polymère **4a5b** (à une concentration en monomères de 10 mM à pD=4) dans 500 μL de DMSO-*d*₆ après équilibration suite à l'addition de 1 équivalent de **4b** (**B**), et celui d'un échantillon de **4a5b** auquel un excès de **4a** libre a été rajouté avant dilution (**A**).

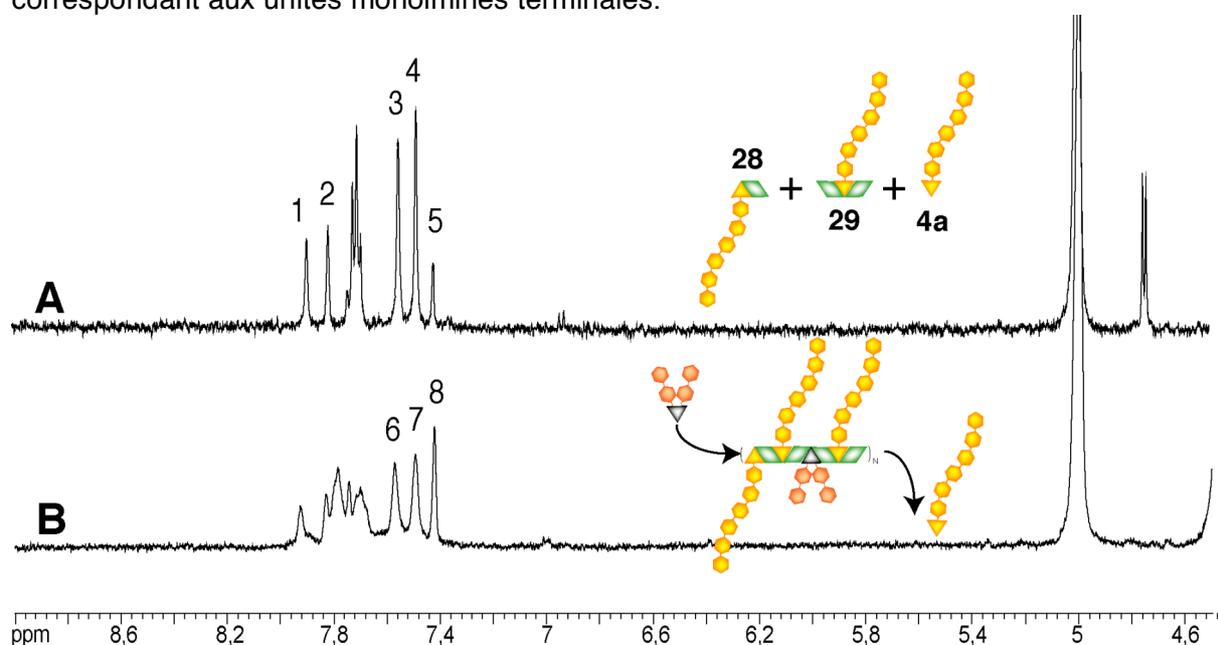
On peut alors clairement attribuer les signaux **1** et **2** au monomère **4a** libre dans le spectre **B** ainsi que les signaux **3** correspondant à la nouvelle imine formée lors de l'échange. Les signaux attribués au monomère **4a** libre se détachent très nettement de ceux du monomère **4a** intégré dans le polymère (signaux **4** et **5**).



Annexe 5: Attribution des signaux aromatiques de la chaîne principale lors du suivi des réactions d'échanges sur le polymère **4a25h** dans le DMSO- d_6 /D $_2$ O 5/1

L'attribution a été réalisée en comparant le spectre RMN du ^1H d'un échantillon obtenu après dilution de 100 μL d'une solution du polymère **4a25h** (à une concentration en monomères de 10 mM à pD=5) dans 500 μL de DMSO- d_6 après équilibration suite à l'addition de 1 équivalent de **4b** (**B**), et celui obtenu après dilution de 100 μL d'un échantillon du mélange obtenu après réaction entre **27h** (10mM) et **4a** (5mM) à pD= 5 dans 500 μL de DMSO- d_6 (**A**).

Par comparaison avec le spectre du même mélange réalisé dans le D $_2$ O pur (Figure III34) les signaux **1** et **3** sont attribués à **29**, et les signaux **2** et **4** à **28**. Par comparaison avec le spectre du polymère **4a25h** dilué dans le DMSO- d_6 (Figure III50 **A**) on peut attribuer les signaux **5** et **8** au monomère **4a** libre dans le spectre **B** ainsi que les signaux **7** correspondant aux unités monoimines terminales.

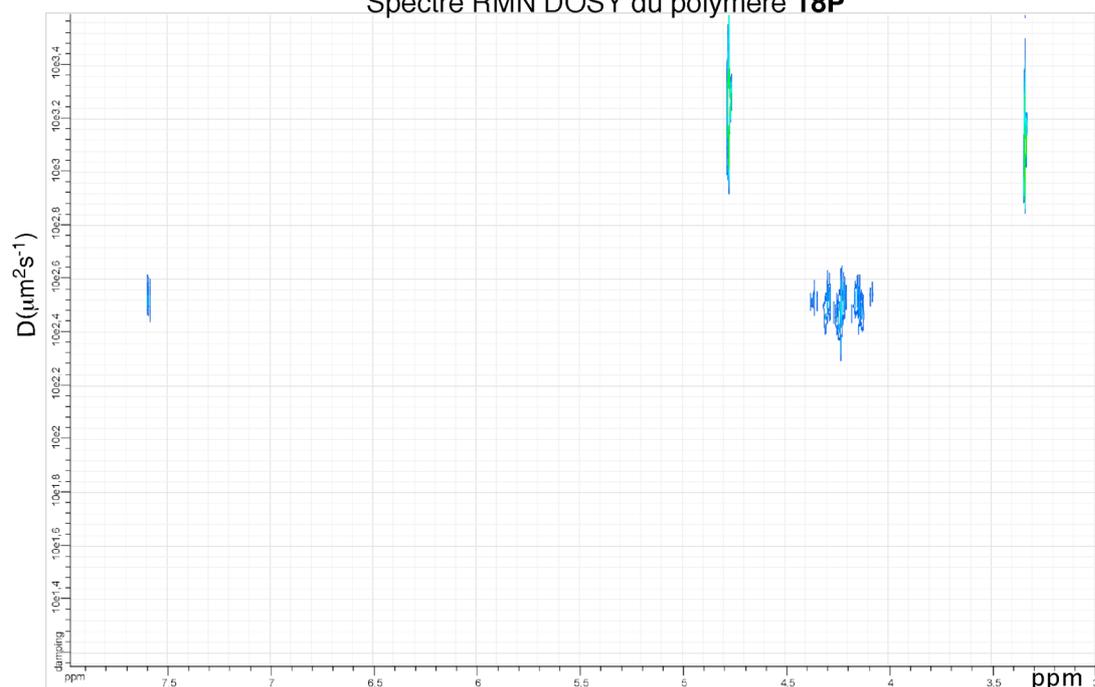


Annexe 6: Spectres RMN DOSY des polymères 18P et 19P

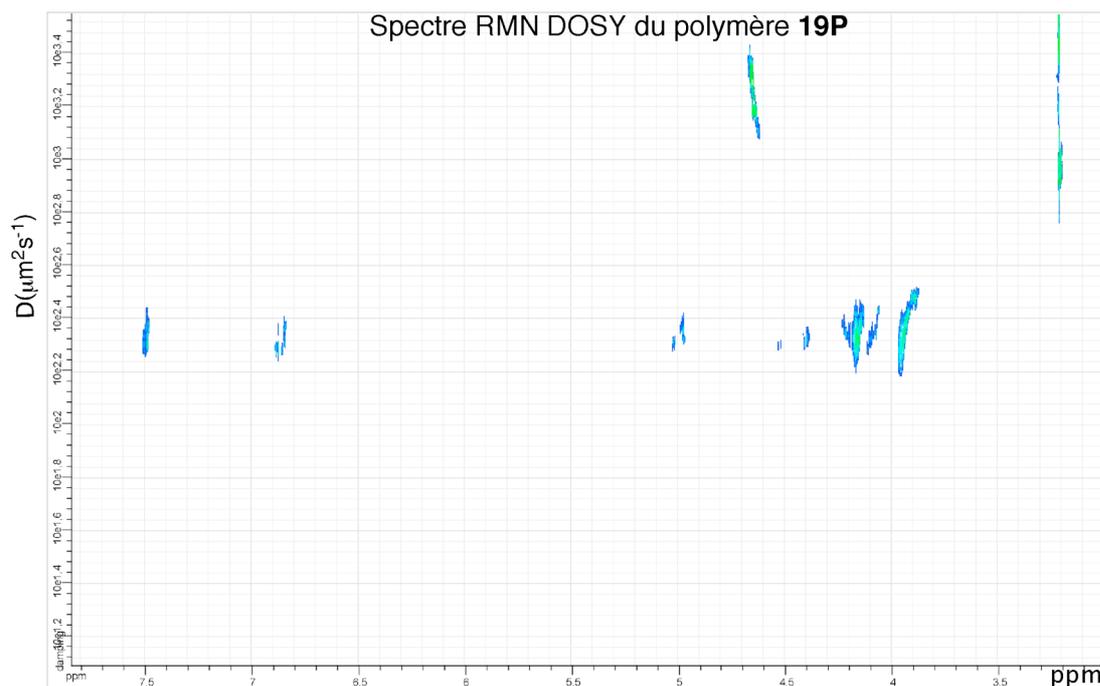
Ces analyses de RMN DOSY ont été réalisées sur un échantillon de **18P** préparé par deprotection et polymérisation *in situ* de **18** (20 mM) par la méthode décrite dans la section expérimentale du chapitre IV.

Le polymère **19P** a été préparé à partir de solutions des monomères **10h** et **14** à une concentration initiale de 20 mM et à pD= 4 selon la méthode décrite dans la partie expérimentale du chapitre IV. Le spectre obtenu après terminaison de chaîne dynamique du polymère **19P** a été réalisé sur un échantillon identique à celui décrit au chapitre IV pages 187 et 188: ajout de la *O-tert*butylhydroxylamine (20 mM) à une solution de **19P** (concentration initiale en monomères 20 mM) à pD= 4.

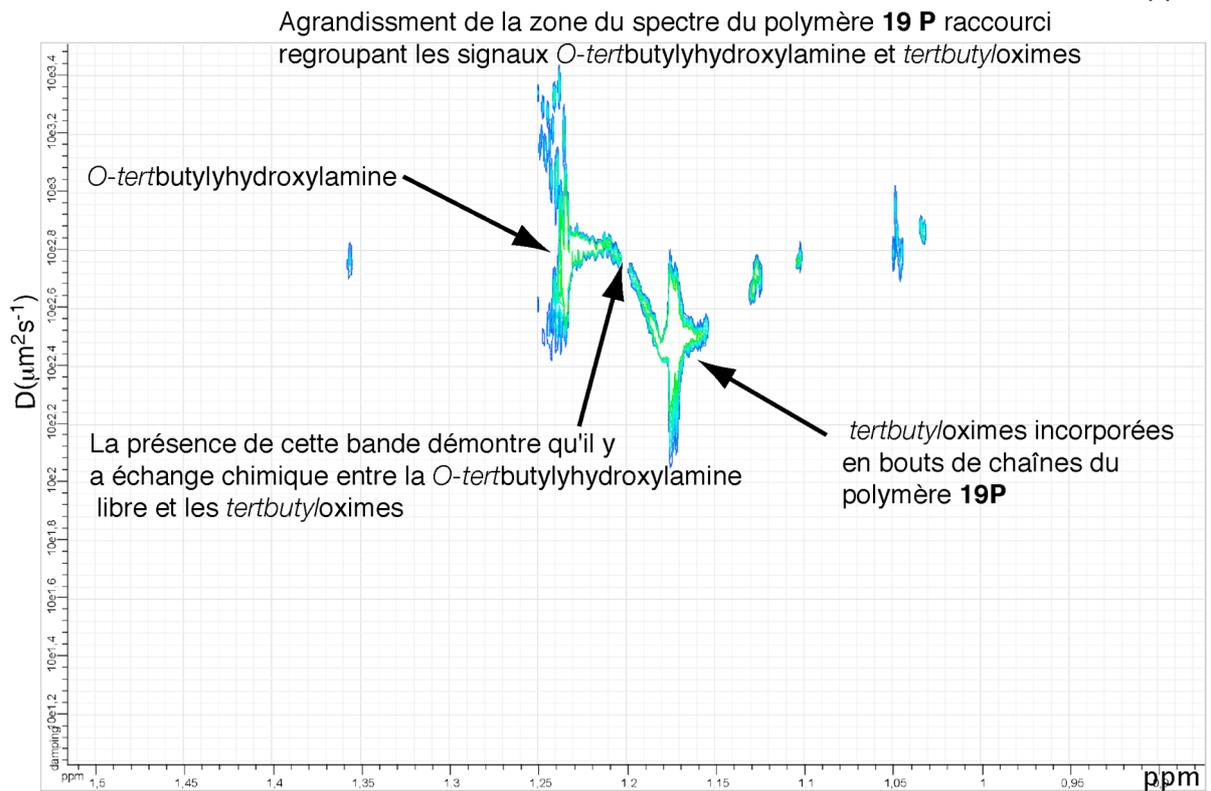
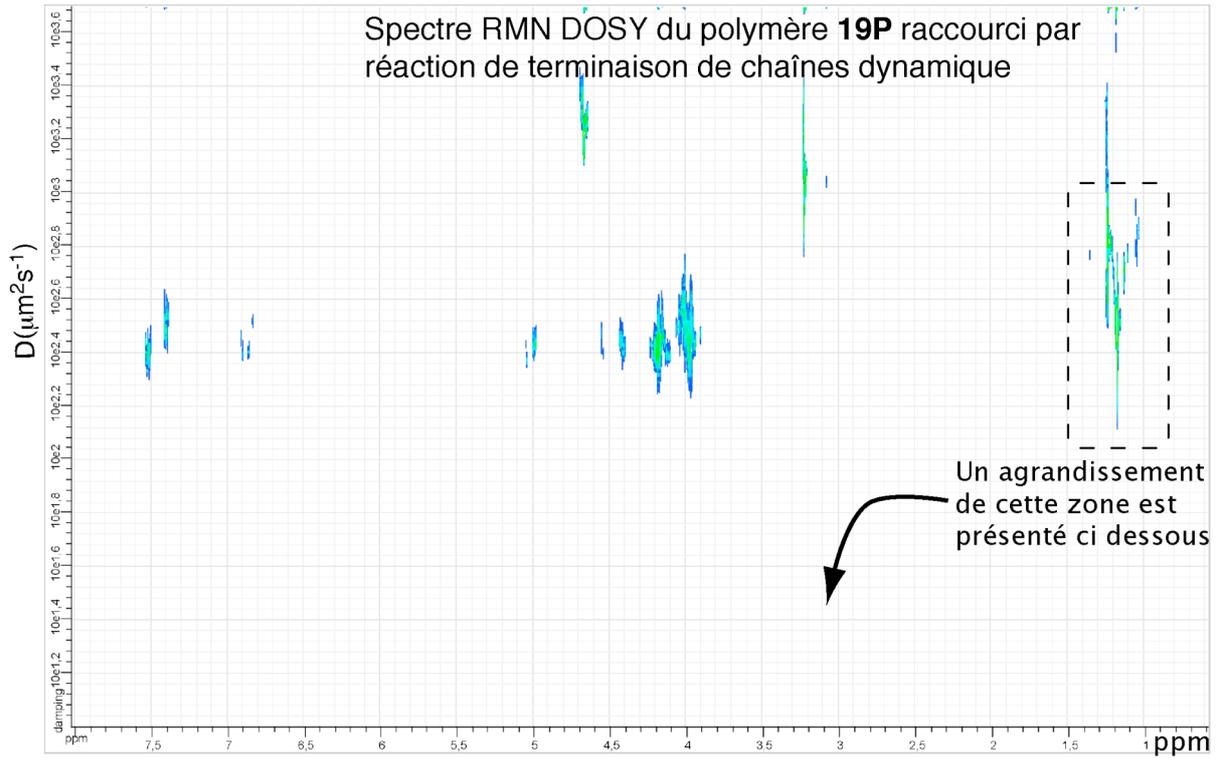
Spectre RMN DOSY du polymère **18P**



Spectre RMN DOSY du polymère **19P**



Annexes



Annexe 7: Spectres RMN DOSY du polymère 14P à différents pD

Ces analyses de RMN DOSY ont été réalisées sur un échantillon de **14P** préparé à partir de solutions des monomères **10h** et **14** à une concentration initiale de 20 mM et à pD= 5 ou 8.1 selon la méthode décrite dans la partie expérimentale du chapitre V.

